

Université de Lille
École Doctorale Biologie Santé de Lille

- THESE DE DOCTORAT -

En vue de l'obtention du grade de
Docteur d'Université

Soutenue publiquement par

Gianni ZARCONE

Le 5 décembre 2023

**Etude *in vitro* de la toxicité pulmonaire des émissions
de tabac chauffé et de cigarette électronique**

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Financement de la thèse : Institut National du Cancer et Institut pour la
Recherche en Santé Publique

Composition du jury :

Président : **Pr Olivier COTTENCIN**
PU-PH – Université de Lille – CHU de Lille

Rapporteurs : **Dr Véronique KEMMEL**
MCU-PH – Université de Strasbourg - CHU de Strasbourg

Pr Françoise PONS
PU - Université de Strasbourg

Examineurs : **Dr Sophie ACHARD**
MCU - Université Paris Cité

Pr Guillaume GARÇON
PU – Université de Lille

Directeur de thèse : **Dr Sébastien ANTHERIEU**
MCU – Université de Lille

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu le Pr Olivier COTTENCIN, le Dr Véronique KEMMEL, le Pr Françoise PONS, le Dr Sophie ACHARD et le Pr Guillaume GARÇON d'avoir accepté de faire partie des membres de mon jury et d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également le Pr. Armelle Baeza et le Dr. Julie Dumont, membre de mon comité de suivi de thèse, pour leurs précieux conseils.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers mes financeurs de thèse, l'Institut National du Cancer et l'Institut pour la Recherche en Santé Publique pour leur soutien financier qui a rendu cette recherche possible (Contrat n°INCa-IReSP_15748).

Je souhaite remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Dr. Sébastien Anthérieu, pour son engagement, son soutien constant, et les précieux conseils qu'il m'a prodigués tout au long de cette aventure de recherche. Sa direction éclairée a été essentielle pour le succès de ce travail.

Je remercie sincèrement le directeur du laboratoire IMPECS, le Dr. Jean-Marc Lo Guidice, pour m'avoir accueilli, depuis 7 ans maintenant, dès ma troisième année de licence. Il m'a offert l'opportunité de travailler 1 an en tant qu'ingénieur d'étude et m'a permis de poursuivre mes études doctorales au sein du laboratoire. Son accueil chaleureux et ses conseils ont grandement contribué à mon développement personnel et académique.

Un remerciement spécial au Pr. Guillaume Garçon, dont les discussions matinales ont été une source inestimable de conseils et d'inspiration tout au long de ma thèse. Ses idées et son expertise ont enrichi mon travail de recherche de manière significative.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude envers Ophélie Simonin pour son soutien tout au long de ma thèse. Son aide précieuse, que ce soit en tant que soutien moral lors des longues expositions ou des manipulations que j'ai entreprises, a grandement contribué à la réussite de cette aventure. Sa présence a été d'une grande aide, et je lui suis profondément reconnaissant pour son rôle dans ce parcours.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers les membres de mon bureau, en particulier le Dr. Émeline Barbier, ma co-doctorante, dont la présence a considérablement enrichi cette thèse. Je tiens également à remercier Florence Jacobs, co-doctorante également, ainsi que Jessica Carpentier, pour leur précieux soutien, et pour les moments agréables que nous avons partagés au sein de notre bureau.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à l'ensemble des membres de la « Team LUCK » et du laboratoire IMPECS pour leur soutien inestimable tout au long de mon parcours doctoral. Votre

présence et votre esprit d'équipe ont créé un environnement de travail exceptionnel pour réaliser cette thèse. Je suis reconnaissant d'avoir eu l'opportunité de faire partie de cette équipe de recherche.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le Dr. Romain Dusautoir pour m'avoir formé, que ce soit en culture cellulaire, sur le fonctionnement de la machine à fumer et bien d'autre chose encore, ainsi que d'avoir partagé ses connaissances pour que je puisse lui succéder. Ses précieux enseignements lors de mes stages de Master 1 et 2 ont construit des bases solides pour le début de ma thèse.

La réalisation de ce travail de thèse a été le fruit d'une collaboration précieuse avec de nombreux collègues et collaborateurs. Je souhaite exprimer ma reconnaissance envers le Dr. Anne Platel pour son aide tout au long de ma thèse ainsi que l'équipe du laboratoire de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille pour leur contribution essentielle aux expérimentations de génotoxicité. Mes remerciements s'étendent également au Pr. Jérôme Kluza et à William Laine pour leur soutien dans l'étude de la fonction mitochondriale et de la glycolyse. Malgré les nombreux obstacles rencontrés en cours de route, nous n'avons jamais baissé les bras, et nous réussissons à aller jusqu'au bout de ces expérimentations. Je suis honoré d'avoir pu collaborer avec vous tous.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers mes parents, qui ont joué un rôle inestimable dans mon parcours académique et personnel. Leur soutien indéfectible a été une source de motivation et d'inspiration constante, et je ne pourrais jamais assez les remercier pour leur encouragement et leur confiance. Leur conviction en mes rêves et leur encouragement constant ont été les fondations sur lesquelles j'ai pu bâtir mon parcours. Ils m'ont enseigné l'importance de suivre sa passion et de travailler dans un domaine que l'on aime profondément. Je suis incroyablement fier d'avoir des parents aussi exceptionnels, et je leur suis infiniment reconnaissant pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Ce travail de thèse est également le leur, car sans leur amour et leur soutien, rien de tout cela n'aurait été possible.

Un merci tout particulier s'adresse à mon frère jumeau, Anthony Zarccone. Notre lien fraternel est une source de soutien et de confiance depuis le premier jour. Bien que nos chemins professionnels aient pris des directions différentes, sa présence dans ma vie a toujours été importante. Chaque obstacle rencontré a été plus facile à surmonter grâce à lui. Merci pour cette relation précieuse qui perdure depuis toujours.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers ma famille, mes amis, et tous ceux qui ont été à mes côtés tout au long de ce voyage académique. Leur soutien moral a été un pilier fondamental.

Enfin, je termine ces remerciements en exprimant ma gratitude envers ma future épouse. Au fil de ces huit dernières années ensemble, elle a été mon soutien inébranlable, mon pilier dans les moments

de doute, et ma plus grande source d'inspiration. C'est grâce à elle que j'ai trouvé la force de poursuivre ma passion et d'entreprendre cette aventure de thèse. Son amour, sa confiance et son encouragement constants ont été les moteurs de mon parcours. Sans elle, je n'aurais jamais osé envisager de réaliser ce projet. Merci, du plus profond de mon cœur, pour ta présence et ton amour.

Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Valorisations scientifiques des travaux

✓ Articles dans des revues internationales avec comité de lecture

G Zarcone, M Lenski, T Martinez, S Talahari, O Simonin, G Garçon, D Allorge, F Nessler, JM Lo Guidice, A Platel and S Anthérieu, - Impact of electronic cigarettes, heated tobacco products, and conventional cigarettes on the generation of oxidative stress, genetic and epigenetic lesions in the human bronchial epithelial BEAS-2B cells **Toxics**. 2023 Oct 10;11(10):847. doi: 10.3390/toxics11100847 (**Présent à la fin du manuscrit**)

M Lenski, S Maallem, **G Zarcone**, G Garçon, JM Lo Guidice, S Anthérieu, D Allorge. Prediction of a Large-Scale Database of Collision Cross-Section and Retention Time Using Machine Learning to Reduce False Positive Annotations in Untargeted Metabolomics. **Metabolites**. 2023 Feb 15;13(2):282. doi: 10.3390/metabo13020282

R Dusautoir, **G Zarcone**, M Verrièle, G Garçon, I Fronval, N Beauval, D Allorge, V Riffault, N Locoge, JM Lo Guidice, S Anthérieu. Comparison of the chemical composition of aerosols from heated tobacco products, electronic cigarettes and tobacco cigarettes and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells. **J Hazard Mater**. 2021 Jan 5;401:123417. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123417

✓ Article en Français

G Zarcone et S Anthérieu. Comparaison de la composition chimique et de la toxicité in vitro des émissions de tabac chauffé, de cigarette électronique et de cigarette conventionnelle. **Lettre du RESPADD n°42** (Réseau de prévention des addictions), Avril 2022.

✓ Communications orales

Journée des doctorants de l'INCa 2023 - 25/09/2023 – 26/09/2023 à Paris

Étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la toxicité pulmonaire des émissions de tabac chauffé, cigarette électronique et cigarette conventionnelle

57th Congress of the European Societies of Toxicology - 10 au 13 /09/2023 à Ljubljana (Slovénie)

G Zarcone, M Lenski, T Martinez, S Talahari, O Simonin, G Garçon, D Allorge, F Nessler, JM Lo Guidice, A Platel and S Anthérieu. Impact of heated tobacco product, electronic cigarette and conventional cigarette emissions on the generation of oxidative stress, genetic and epigenetic lesions in human bronchial epithelial cells, **Toxicology Letters**. 2023; 384:S58-S59. doi: 10.1016/S0378-4274(23)00412-5

International conference on the E-Cigarette - 05 et 06 /12/2022 à Paris

G Zarcone, M Lenski, T Martinez, S Talahari, O Simonin, G Garçon, D Allorge, F Nessler, JM Lo Guidice, A Platel and S Anthérieu, Comparison of chemical composition and toxicity effects of emissions from electronic cigarettes, heated tobacco products and tobacco cigarettes in human bronchial epithelial cells.

Journée des doctorants de l'INCa 2022 - 15 et 16/09/2022 à Paris

Étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la toxicité pulmonaire des émissions de tabac chauffé, cigarette électronique et cigarette conventionnelle.

FHU RESPIRE : 2^{ème} Réunion Annuelle « Pathogènes, Environnement et Hôte : une approche intégrée en santé respiratoire », 10/05/2022 à Lille

Comparaison de la toxicité et des effets transcriptomiques des émissions de tabac chauffé, de cigarette électronique et de cigarette sur des cellules épithéliales bronchiques humaines.

Invitation à la Journée inter-associative de la Fédération Française d'Addictologie en partenariat avec la Société Francophone de Tabacologie - 15/11/2021 à Paris

Comparaison de la toxicité et des effets transcriptomiques des émissions de tabac chauffé, de cigarette électronique et de cigarette sur des cellules épithéliales bronchiques humaines.

Colloque GIS REFERtab - 26/02/2021 – Distanciel

Comparaison de la composition chimique et des effets toxiques *in vitro* des aérosols de tabac chauffé, de cigarette électronique et de cigarette conventionnelle.

✓ **Présentations sous forme de posters**

Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie – 23 et 24 novembre 2023 à Paris

G Zarcone, M Lenski, T Martinez, D Allorge, J-M Lo Guidice, G Garçon, S Anthérieu. Use of transcriptomic approach to compare the toxicity of heated tobacco product, electronic cigarette and tobacco cigarette in BEAS-2B cells

M Lenski, **G Zarcone**, S Maallem, JM Lo Guidice, G Garçon, D Allorge, S Anthérieu. Metabolomic approach for identification of early markers of toxicity of tobacco cigarette, electronic-cigarette and heated tobacco product

3ème Journée de la FHU RESPIRE - 21 novembre 2023 à Lille

G Zarcone, M Lenski, T Martinez, D Allorge, J-M Lo Guidice, G Garçon, S Anthérieu. Use of transcriptomic approach to compare the toxicity of heated tobacco product, electronic cigarette and tobacco cigarette in BEAS-2B cells

XVIth International Congress of Toxicology 2022 - 19 au 21 /09/2022 à Maastricht (Pays-bas)

M Lenski, **G Zarcone**, S Maallem, JM Lo Guidice, G Garçon, S Anthérieu, D Allorge. Metabolomic strategy to identify markers of exposure and toxicity of electronic cigarettes, heated tobacco products and tobacco cigarettes, **Toxicology Letters**. 2022; 368:S251. doi: 10.1016/j.toxlet.2022.07.668

EUROTOX Virtual Congress 2021 - 27/09/2021 au 01/10/2021- Distanciel

G Zarcone, M Lenski, T Martinez, S Talahari, O Simonin, G Garçon, D Allorge, F Nesslany, JM Lo Guidice, A Platel and S Anthérieu. Comparison of toxicity and transcriptomic effects of emissions from heated tobacco products, electronic cigarettes and tobacco cigarettes in human bronchial epithelial cells, **Toxicology Letters**. 2021; 350:S124-S125. doi: 10.1016/S0378-4274(21)00540-3

R Dusautoir, **G Zarcone**, , A Platel, G Kervoaze, W Laine, J Kluza, F Nesslany, P Gosset, G Garçon, S Anthérieu, JM Lo Guidice. Long-term respiratory impact of electronic cigarette, **Toxicology Letters**. 2021; 350:S78. doi: 10.1016/S0378-4274(21)00429-X

Table des matières

Remerciements	I
Valorisations scientifiques des travaux	IV
Liste des figures	X
Liste des tableaux	XII
Abréviations	XIV
CONTEXTE SCIENTIFIQUE	1
ETAT DE L'ART	4
1. Le tabagisme.....	5
1.1. Prévalence du tabagisme	5
1.2. Pathologies associées au tabagisme	8
1.2.1. Cancer du poumon	9
1.3. Prise en charge du sevrage tabagique.....	10
2. La cigarette électronique.....	13
2.1. Historique	13
2.2. Usage de l'e-cig.....	15
2.3. Fonctionnement d'une e-cig	19
2.4. Toxicité de l'e-cig.....	22
2.4.1. Composition chimique des émissions d'e-cig.....	22
2.4.2. Etudes de toxicité générale	23
2.4.3. Etudes des effets génotoxiques et mutagènes	26
2.4.4. Etudes des altérations épigénétiques	33
2.4.5. Etudes des effets transcriptomiques et analyses fonctionnelles	37
3. Le tabac chauffé	44
3.1. Usage du tabac chauffé en France et dans le monde	44
3.2. Fonctionnement des systèmes de tabac chauffé.....	47
3.3. Toxicité du tabac chauffé	49

3.3.1.	Composition chimique des émissions de tabac chauffé	49
3.3.2.	Etudes de toxicité générale	51
3.3.3.	Etudes de génotoxicité et mutagénicité.....	56
3.3.4.	Etudes des altérations épigénétiques	60
3.3.5.	Etudes des effets transcriptomiques et analyses fonctionnelles	65
PROBLEMATIQUE DE LA THESE		74
MATERIELS ET METHODES		77
1.	Produits de tabac et de vapotage	78
1.1.	Tabac chauffé : IQOS®	78
1.2.	Cigarette électronique : modèle Mod Box TC®	79
1.3.	Cigarette de référence : 3R4F.....	79
2.	Génération des fumées et aérosols	79
3.	Culture cellulaire	81
4.	Mesure de la viabilité cellulaire par un test ATP.....	81
5.	Tests de génotoxicité et de mutagénicité	81
5.1.	Test des comètes.....	81
5.2.	Test du micronoyau.....	83
6.	Etude des effets épigénétiques	83
6.1.	Méthylation globale de l'ADN	83
6.2.	Modifications d'histones	84
6.3.	Evaluation de l'expression de microARN par RTqPCR.....	84
7.	Analyses transcriptomiques	85
7.1.	Analyse de l'expression génique par puces à ADN _c pangénomiques.....	85
7.2.	Analyse fonctionnelle via Ingenuity Pathways Analysis (IPA®)	86
7.3.	Analyse fonctionnelle via Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).....	87
7.4.	Analyses transcriptomiques par RTqPCR.....	88
7.5.	Analyse de l'expression protéique par Western Blot.....	89
7.5.1.	Dosage protéique	89

7.5.2. Western blot.....	89
8. Evaluation de l'activité de NRF2.....	91
8.1. Extraction des protéines nucléaires	91
8.2. Dosage Bradford adapté pour les protéines nucléaires.....	91
8.3. Mesure de l'activité de NRF2	91
9. Évaluation de la sénescence par marquage de la β -galactosidase	92
10. Évaluation de la fonction mitochondriale et de la glycolyse.....	92
10.1. Etude de la fonction mitochondriale : mesure du taux de consommation en oxygène (OCR)	92
10.2. Évaluation de la glycolyse : Mesure du taux d'acidification extracellulaire (ECAR)	93
11. Analyses statistiques	94
RESULTATS & DISCUSSION	95
1. Comparaison de la cytotoxicité des émissions d'e-cig, d'HTP et de cigarette	96
1.1. Evaluation de la viabilité cellulaire par mesure de l'ATP intracellulaire	96
1.2. Discussion	97
2. Evaluation de la génotoxicité des différents dispositifs.....	99
2.1. Mesure des lésions primaires de l'ADN.....	99
2.2. Evaluation de l'induction d'aberrations chromosomiques	100
2.3. Discussion.....	101
3. Evaluation des altérations épigénétiques des différents dispositifs.....	103
3.1. Mesure de la méthylation de l'ADN	103
3.2. Evaluation des modifications d'histones.....	103
3.3. Évaluation de l'expression de microARN.....	104
3.4. Discussion.....	106
4. Impact transcriptomique de l'exposition à l'e-cig, au HTP ou à la cigarette : identification des principales voies de dérégulations et fonctions biologiques dérégulées	108
4.1. Comparaison des dérégulations transcriptomiques induites par l'e-cig, le HTP et la cigarette.....	108

4.2.	Comparaison des voies de signalisation et fonctions biologiques dérégulées	114
4.2.1.	Analyses avec Ingenuity Pathway Analysis.....	114
4.2.2.	Analyse des voies de signalisation par enrichissement (GSEA).....	119
4.3.	Discussion sur les analyses transcriptomiques.....	121
4.3.1.	Dérégulations transcriptomiques par les produits du tabac.....	121
4.3.2.	Dérégulations transcriptomiques par la cigarette électronique	122
4.3.3.	Dérégulations transcriptomiques communes entre les produits du tabac et du vapotage	124
4.4.	Validation des données transcriptomiques.....	125
4.4.1.	Evaluation de l'expression des ARNm par RTqPCR	125
4.4.2.	Etude de la réponse antioxydante médiée par NRF2.....	127
4.4.3.	Evaluation de l'activation d'ERK1/2 et d'AKT	129
4.4.4.	Etude de la sénescence	131
4.4.5.	Évaluation de la fonction mitochondriale et de la glycolyse.....	132
	DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	135
	BIBLIOGRAPHIE.....	142
	ANNEXES.....	172
1.	Heatmaps des voies canoniques (A) et des fonctions biologiques (B).....	173
2.	Heatmaps des régulateurs en amont : Prolifération cellulaire (A), Métabolisme lipidique (B) et inflammation (C).....	174
	ARTICLE.....	176

Liste des figures

Figure 1 : Prévalence européenne du nombre de fumeurs en 2020 (Commission Européenne, 2021).	6
Figure 2 : Evolution de la prévalence du tabagisme quotidien en France parmi les 18-75 ans entre 2000 et 2022 (Pasquereau, 2023).	7
Figure 3 : Evolution des niveaux d'expérimentation, d'usage récent, quotidien et intensif de tabac à 17 ans (%) en France (OFDT, 2023)	7
Figure 4 : Utilisation de la cigarette électronique en Europe en 2020 (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. et al., 2021)	16
Figure 5 : Evolution du vapotage parmi les adultes en France métropolitaines entre 2014 et 2022 (Pasquereau et al., 2023)	16
Figure 6 : Evolution de l'usage de la cigarette électronique dans les 30 derniers jours chez les élèves du secondaire aux Etats-Unis (OMS, 2021)	18
Figure 7 : Arôme utilisé par les élèves du secondaire aux US (OMS, 2021)	19
Figure 8 : Schéma d'une cigarette électronique	19
Figure 9 : Représentation des différentes générations d'e-cig (Di Cicco et al., 2020)	20
Figure 10 : Caractéristiques générales des quatre générations de cigarettes électroniques (Williams and Talbot, 2019)	21
Figure 11 : Utilisation de de tabac chauffé en Europe (+UK) (Adapté de European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. et al., 2021)	45
Figure 12 : Importation de PMI en 2022 (PHILIP MORRIS INTERNATIONAL INC., 2023a)	46
Figure 13 : Fonctionnement des différents systèmes de tabac chauffé (Adapté de British American Tobacco Research & Development, n.d.; Japan Tobacco International, n.d.; Mallock et al., 2019; Philip Morris International, n.d.)	47
Figure 14 : Evolution de l'IQOS et du système de chauffage (Philip Morris International Science, n.d.)	48
Figure 15 : Résumé graphique du projet de thèse	76
Figure 16 : Présentation du système de tabac chauffé IQOS® de Philip Morris International	78
Figure 17 : Présentation du modèle ModBox TC de Nhoss® (A) et du e-liquide (B)	79
Figure 18 : Schéma de l'exposition avec la machine à fumer VC1 de Vitrocell®	80
Figure 19 : Graphique d'enrichissement obtenu avec GSEA	88
Figure 20 : Interprétation des mesures du taux de consommation d'oxygène (OCR)	92
Figure 21 : Interprétation du test d'évaluation de la glycolyse (Hlozková and Starková, 2018)	94

Figure 22 : Viabilité cellulaire (exprimée en fonction du nombre de bouffées) après exposition à l'e-cig (Mb-18W et Mb-30W), le HTP et la cigarette 3R4F sur des cellules BEAS-2B.	96
Figure 23 : Viabilité cellulaire (exprimée en fonction de la quantité de nicotine) après exposition à l'e-cig (Mb-18W et Mb-30W), le HTP et la cigarette 3R4F sur des cellules BEAS-2B.	97
Figure 24 : Evaluation des dommages à l'ADN par le test des comètes	99
Figure 25 : Evaluation de la fréquence des aberrations chromosomiques par le test du micronoyau	100
Figure 26 : Evaluation de la méthylation globale de l'ADN	103
Figure 27 : Evaluation des modifications d'histones H3K9me3, H3K9ac, H3K4me3 et H3K27me3....	104
Figure 28: Mécanisme d'action des microARNs (Adapté de Ngoubo Ngangue-Courcot, 2012).....	105
Figure 29 : Evaluation de l'expression de 4 microARN d'intérêt par RTqPCR.....	106
Figure 30 : Analyse de l'expression génique par Volcano Plot après exposition à la Mb-18W	110
Figure 31 : Analyse de l'expression génique par Volcano Plot après exposition à la Mb-30W	110
Figure 32 : Analyse de l'expression génique par Volcano Plot après exposition au HTP.....	111
Figure 33 : Analyse de l'expression génique par Volcano Plot après exposition à la cigarette	111
Figure 34 : Comparaison des dérégulations transcriptomiques par des diagrammes de Venn	112
Figure 35 : Heatmap des gènes significativement dérégulés après une exposition de 120 bouffées à l'e-cig, au HTP ou à la cigarette	113
Figure 36 : Heatmaps représentant les voies canoniques (A) et les fonctions biologiques (B) dérégulées par une exposition aux émissions d'e-cig (Mb-18W et Mb-30W), de HTP et de cigarette 3R4F.....	114
Figure 37 : Heatmaps des prédictions de « régulateurs en amont » après une exposition de 120 bouffées d'e-cig, HTP et cigarette	118
Figure 38 : Heatmap de l'enrichissement de gènes par une exposition aux émissions d'e-cig (Mb-18W et Mb-30W), de HTP et de cigarette 3R4F	119
Figure 39 : Validation des données de microarray par RTqPCR pour 18 gènes d'intérêt.....	126
Figure 40 : Évaluation de l'activation de NRF2 dans les cellules BEAS-2B exposées aux émissions de HTP, d'e-cig et de cigarette.....	127
Figure 41 : Analyse de l'expression protéique des protéines HMOX1 et NQO1 par Western Blot	128
Figure 42 : Expression d'AKT et ERK évaluée par Western Blot.....	130
Figure 43 : Marquage de la β -Galactosidase dans les cellules exposées à la Mb-30W	132
Figure 44 : Mise au point de la mesure de la fonction mitochondriale (OCR).....	133
Figure 45: Mise au point de la concentration en FFCP pour la mesure de la fonction mitochondriale	134

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evolution de l'usage de la cigarette électronique chez les jeunes de 17 ans en France (%) (ESCAPAD) (OFDT, 2023, 2022)	17
Tableau 2 : Résumé des études <i>in vitro</i> citées sur la génotoxicité et la mutagénicité de la cigarette électronique	30
Tableau 3 : Résumé des études <i>in vivo</i> citées sur la génotoxicité et la mutagénicité de la cigarette électronique	32
Tableau 4 : Résumé des études <i>in vitro</i> citées sur les altérations épigénétiques de la cigarette électronique	35
Tableau 5 : Résumé des études <i>in vivo</i> citées sur les altérations épigénétiques de la cigarette électronique	35
Tableau 6 : Résumé des études chez l'Homme citées sur les altérations épigénétiques de la cigarette électronique	36
Tableau 7 : Résumé des études <i>in vitro</i> citées sur les modifications transcriptomiques induites par la cigarette électronique	40
Tableau 8 : Résumé des études <i>in vivo</i> citées sur les modifications transcriptomiques induites par la cigarette électronique	41
Tableau 9 : Résumé des études chez l'Homme citées sur les modifications transcriptomiques induites par la cigarette électronique	42
Tableau 10 : Résumé des études <i>in vitro</i> citées sur la génotoxicité et la mutagénicité du HTP	58
Tableau 11 : Résumé des études <i>in vivo</i> citées sur la génotoxicité et la mutagénicité du HTP	59
Tableau 12 : Résumé des études <i>in vitro</i> citées sur les altérations épigénétiques du HTP	62
Tableau 13 : Résumé des études <i>in vivo</i> citées sur les altérations épigénétiques du HTP	63
Tableau 14 : Résumé des études chez l'Homme citées sur les altérations épigénétiques du HTP	64
Tableau 15 : Résumé des études <i>in vitro</i> citées sur les modifications transcriptomiques induites par le HTP	68
Tableau 16 : Résumé des études <i>in vivo</i> citées sur les modifications transcriptomiques induites par le HTP	69
Tableau 17 : Résumé des études chez l'Homme citées sur les modifications transcriptomique induites par le HTP	73
Tableau 18 : Paramètres obtenus par la mesure de l'OCR.....	93
Tableau 19 : Nombre de transcrits dérégulés en fonction des doses d'exposition aux émissions des différents dispositifs.....	109

Tableau 20 : Gènes choisis pour la validation de l'analyse transcriptomique par RTqPCR	125
Tableau 21 : Comparaison des intensités relatives d'expression entre les résultats des microarray et de RTqPCR.	127

Abréviations

2-DG	2-désoxy-D-glucose
5-hmC	5-hydroxyméthyle-cytosine
8-oxoG	8-oxoguanine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNmt	ADN mitochondriale
AFNOR	Association Française de Normalisation
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
AKT	Protéine kinase B
ALDOC	Aldolase C
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Alimentaire
ApoE	Apolipoprotein E
ARN	Acide ribonucléique
ARNInc	longs ARN non codants
ATP	Adénosine-triphosphate
BAT	British American Tobacco
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
BSA	Albumine de sérum bovin
CBPC	Cancer broncho-pulmonaire à petites cellules
CBNPC	Cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules
CE ₅₀	Dose conduisant à 50% de viabilité cellulaire
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CRM	Chaîne respiratoire mitochondriale
CYP	Cytochromes p450
E-cig	Cigarette électronique ou e-cigarette
E-liquide	Liquide pour cigarette électronique
ECAR	Extracellular acidification rate
ENO1	Enolase 1
EPA	Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ETO	Etoposide
FC	Fold-change ou quantité relative
FDA	Food and Drug Administration
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GSH	Glutathion réduit
GSSG	GSSG Glutathion oxydé
HAS	Haute Autorité de Santé
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCI	Heath Canada Intensive
HCSP	Haut Conseil de la Santé Publique
HMOX1	Hème oxygénase 1

hOGG1	8-oxoguanine glycosylase
HRP	Péroxydase de raifort
HTP	Tabac chauffé – Heated tobacco Product
IAL	Interface air-liquide
IL1b	Interleukine
IMPECS	Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine
INCa	Institut National du Cancer
ISO	Organisation internationale de normalisation
IPA	Ingenuity pathway analysis
JTI	Japan Tobacco International
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LDH	Lactate Deshydrogénase
LDS	Dodécylsulfate de lithium
Mb-18W	Modèle Modbox réglé à la puissance 18W
Mb-30W	Modèle Modbox réglé à la puissance 30W
LINE-1	Long Interspersed Nucleotide Element 1
NQO1	NAD(P)H déshydrogénase quinone 1
NHBE	Normal human bronchial epithelial cells
OCR	Oxygen consumption rate
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pAKT	Protéine kinase B phosphorylé
pERK	Kinases extracellulaires régulées par le signal phosphorylé
PMI	Philip Morris International
PG	Propylène glycol
p-value	valeur de probabilité
RPD	Doublement relatif de la population
RQ	Quantité relative
RTqPCR	Real-time Quantitative polymerase chain reaction
SLC7A11	Solute Carrier Family 7 Member 11
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline avec 0,1% de Tween®20
TFRC	Transferrine
TIMP1	Tissue Inhibitor of Metalloprotease-1
TNS	Les traitements nicotiques de substitution
TP53	Tumor protein 53
TPM	Total particule matter – Particules totales
VG	Glycérol végétale

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Le tabagisme constitue un problème majeur de santé publique puisqu'il est responsable de près de 8 millions de morts par an dans le monde (WHO, 2020). En particulier, la consommation de cigarettes est à l'origine de 90 % des cancers du poumon et représente le facteur de risque le plus important pour la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et les maladies cardiovasculaires, constituant ainsi la première cause de mortalité évitable (Hill, 2012). Le tabagisme a également un coût économique considérable pour la société. La prise en charge des maladies liées à la consommation de tabac coûterait en France 25,9 milliards d'euros par an en hospitalisations, en soins et en médicaments (Kopp, 2015). La prévalence du tabagisme a diminué en France ces dernières années, notamment grâce à la mise en place de plans nationaux de lutte contre le tabagisme, passant de 28,5% de fumeurs quotidiens en 2014 à 24,5% en 2022 (Pasquereau et al., 2023).

Le sevrage tabagique est actuellement la seule mesure efficace pour ralentir le développement des pathologies associées au tabac et diminuer le risque de décès. En effet, il a été observé une diminution significative du risque de cancer du poumon chez les individus ayant arrêté de fumer, cette diminution étant d'autant plus importante pour ceux arrêtant plus tôt (Doll et al., 2004). Malgré cela, les taux de réussite de sevrage tabagique sont faibles (environ 5%) surtout en l'absence d'aide pharmacologique. En effet, la majorité des personnes ayant essayé d'arrêter de fumer continue à consommer du tabac en alternant des périodes d'abstinence et de rechute. Les traitements nicotiques de substitution (TNS) tels que la gomme à mâcher et les timbres transdermiques ont prouvé leur efficacité, mais leur utilisation est limitée. Bien que la prévalence de fumeurs en France ait diminué entre 2014 et 2022, d'autres alternatives aux TNS pourraient aider la diminution voire l'arrêt de la consommation de cigarette. Depuis quelques années, de nouveaux produits alternatifs à la cigarette sont apparus sur le marché avant même qu'il n'y ait suffisamment de preuve scientifique de leur innocuité : la cigarette électronique ou e-cigarette (e-cig) et plus récemment le tabac chauffé (c.-à-d., heated tobacco products (HTP)). C'est dans ce contexte que l'équipe IMPECS (ULR 4483) s'est intéressée depuis 2013 à l'étude de la toxicité de l'e-cig, puis plus récemment du tabac chauffé. L'équipe de recherche mène des recherches multidisciplinaires dans le but d'étudier la composition chimique de ces émissions puis d'évaluer leurs potentiels effets toxiques dans des modèles *in vitro* humains et dans des modèles animaux.

Au cours de mon stage de Master, nous avons comparé la composition chimique des émissions du HTP, de l'e-cig et de la cigarette. Nous avons montré que le HTP émettait des quantités plus faibles de composés carbonylés et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) que la cigarette conventionnelle, mais qu'il en produisait en quantités plus élevées que l'e-cig (Dusautoir et al., 2021). Malgré cette réduction d'émission de composés nocifs par rapport à la cigarette, une réduction proportionnelle du risque pour les utilisateurs de HTP ou d'e-cig ne peut être garantie. Les niveaux de

composés toxiques produits peuvent encore être significatifs et constituer un risque pour la santé, en particulier la présence de produits chimiques cancérigènes génotoxiques, tels que le formaldéhyde, l'acétaldéhyde et le benzo[a]pyrène. Ces composés peuvent entraîner des risques génotoxiques et cancérigènes chez l'homme, même à de très faibles concentrations.

Le développement du cancer du poumon est un processus complexe, impliquant une série d'altérations génétiques et épigénétiques. Le tabagisme induit directement un stress oxydatif et peut activer des proto-oncogènes normalement inactifs, inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs et induire des mutations dans les gènes de réparation de l'ADN (Caliri et al., 2021). Ces changements génétiques peuvent se produire seuls ou en combinaison avec des modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et l'expression anormale d'ARN non-codants, y compris les microARN (Shukla et al., 2013; Wen et al., 2011). On a constaté que l'exposition à la fumée de tabac était associée à des modifications épigénétiques dans les voies respiratoires (Xie et al., 2021). Ces altérations génétiques et épigénétiques interagissent à tous les stades du développement du cancer, facilitant la progression du cancer (Sharma et al., 2010).

Alors que le potentiel cancérigène de la cigarette est bien connu, cette thèse a pour objectif d'évaluer l'impact génétique et épigénétique des émissions d'e-cig et de HTP, puis d'étudier, grâce à des analyses transcriptomiques, les voies de signalisation et fonctions biologiques dérégulées en réponse à des expositions à l'e-cig ou au HTP.

ETAT DE L'ART

1. Le tabagisme

1.1. Prévalence du tabagisme

- Dans le monde

Entre 2007 et 2019, les taux de tabagisme ont diminué à l'échelle mondiale, passant en moyenne de 22,7 % à 17,5 %, soit une réduction relative de 23 % sur 12 ans. Cependant, les pays à faible revenu ont des taux de tabagisme deux fois moins importants que ceux des pays à revenu élevé, et ce rapport n'a pas changé au fil du temps. La réduction relative du taux de tabagisme entre 2007 et 2019 était de 20 % dans les pays à revenu élevé et de 19 % dans les pays à faible revenu. Dans les pays à revenu intermédiaire, qui abritent les trois quarts de la population mondiale, la réduction relative n'était que de 12 %. Les pays à revenu élevé ont encore en 2019 le taux de tabagisme moyen le plus élevé parmi tous les groupes de revenus (21,6 %) même si les taux de tabagisme diminuent en moyenne le plus rapidement. De plus, le taux de tabagisme chez les hommes a diminué de 37,5 % à 29,6 %, tandis que le taux de tabagisme chez les femmes a diminué de 8,0 % à 5,3 %. Cependant, en 2019, les taux de tabagisme chez les femmes des pays à revenu élevé étaient toujours les plus élevés de tous les groupes de revenu des pays, à 16,4 %, soit plus de quatre fois le taux moyen des pays à revenu faible et intermédiaire (3,5 %). À l'inverse, les taux les plus élevés chez les hommes ont été observés dans les pays à revenu intermédiaire (35,3 %), où ils sont presque deux fois plus élevés que le taux moyen constaté dans les pays à faible revenu (20,2 %) (OMS, 2021).

- En Europe

Selon l'Eurobaromètre 2020, moins d'un quart (23 %) de la population européenne fumait, une diminution de trois points de pourcentage depuis 2014. En Europe, plus de deux personnes sur dix (22 %) sont d'anciens fumeurs, tandis que la majorité (55 %) n'ont jamais fumé. Les proportions de fumeurs varient considérablement d'un pays à l'autre, allant de plus d'un tiers en Grèce (42 %), en Bulgarie (38 %) et en Croatie (36 %) à seulement 7 % en Suède et 12 % aux Pays-Bas et au Royaume-Uni (Figure 1). Tout comme les données mondiales précédemment présentées, les hommes (26 %) sont plus susceptibles de fumer que les femmes (21 %). De plus, les répondants les plus jeunes (20 %) et les plus âgés (18 %) sont moins susceptibles de fumer que les personnes âgées de 25 à 54 ans (27-30 %).

Parmi ceux qui fument la cigarette, la consommation quotidienne moyenne est de 14,2 cigarettes en Europe. Ce chiffre a légèrement augmenté depuis mars 2017 (+0,5). La consommation quotidienne moyenne varie considérablement d'un pays à l'autre, allant de 9,1 en Suède à 18,7 cigarettes par jour en Grèce et 11,8 cigarettes par jour en France (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. et al., 2021)

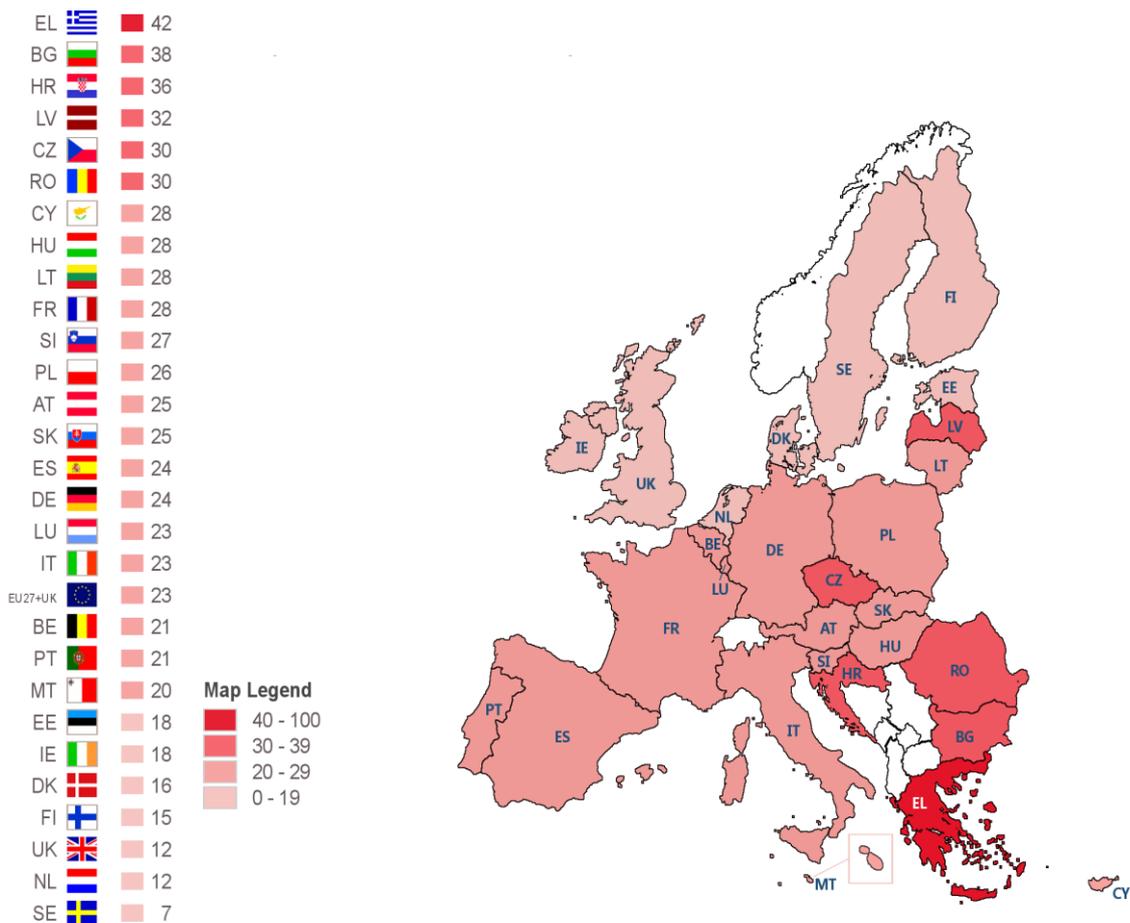


Figure 1 : Prévalence européenne du nombre de fumeurs en 2020 (Commission Européenne, 2021)

En Europe, la proportion de jeunes fumeurs (âgés de 15 à 24 ans) a diminué de neuf points de pourcentage depuis 2017. En effet, le taux de tabagisme chez les jeunes est tombé à 20 % en 2020, contre 25 % en 2014, après avoir culminé à 29 % en 2017 (Commission Européenne, 2021).

- En France

En France, la prévalence du tabagisme a diminué ces dernières années, notamment grâce à la mise en place de plans nationaux de lutte contre le tabagisme (Pasquereau et al., 2020). Entre 2016 et 2019, on observe une baisse importante du taux de tabagisme quotidien en France métropolitaine, passant de 29,4 % à 24,0 %, mais depuis 2019, la prévalence est restée constante (Figure 2). Malgré cela, le tabac reste la première cause de mortalité évitable en France, avec 75 000 décès en 2015 directement attribués au tabagisme, soit 13 % de l'ensemble des décès. Selon santé publique France, en 2022, 31,8% des individus âgés de 18 à 75 ans en France métropolitaine déclarent fumer, et 24,5 % fument quotidiennement (Santé Publique France, 2023a).

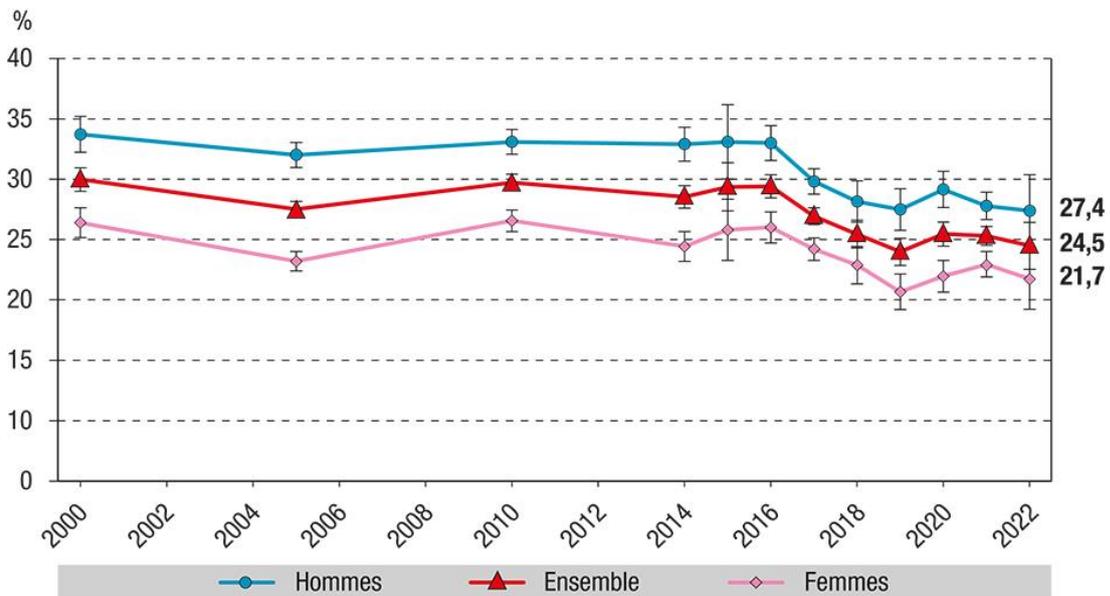
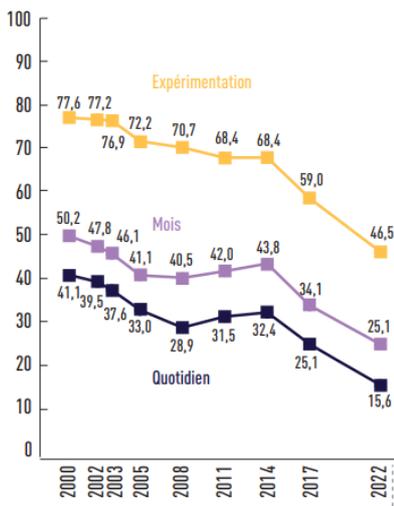


Figure 2 : Evolution de la prévalence du tabagisme quotidien en France parmi les 18-75 ans entre 2000 et 2022 (Pasquereau, 2023).

La proportion de jeune fumeur quotidien est en baisse depuis 2000. Après une augmentation entre 2007 et 2014 (32,4%), celle-ci a diminué jusqu'à atteindre 15,6% en 2022 (Tableau 19). Toutefois, l'utilisation de produits émergents, en particulier des cigarettes électroniques, chez les jeunes est en très nette progression entre 2017 et 2022 (Cf partie 2.2). Cette situation est préoccupante compte tenu de l'objectif de protection des jeunes.



Produit	Usage	Garçons 2022	Filles 2022	Sex ratio		Ensemble 2022	Ensemble 2017	Évolution (en points)	Évolution (en %)
Tabac	Expérimentation	46,2	46,9	0,99	ns	46,5	59,0	-12,5	-21 %
	Récemment (au moins un usage dans le mois)	25,5	24,6	1,03	ns	25,1	34,1	-9,0	-26 %
	Quotidien	17,0	14,2	1,20	***	15,6	25,1	-9,5	-38 %
	Intensif (plus de 10 cig/jour)	5,0	2,3	2,19	***	3,7	5,2	-1,5	-29 %

Figure 3 : Evolution des niveaux d'expérimentation, d'usage récent, quotidien et intensif de tabac à 17 ans (%) en France (OFDT, 2023)

1.2. Pathologies associées au tabagisme

Suite à plusieurs études de cohorte rétrospectives et prospectives dans les années 1950 et 1960, l'administrateur de la santé publique des États-Unis a conclu que le tabagisme était une cause majeure de cancer du poumon (Murin et al., 1997; U.S. Department of Health, Education, and Welfare, 1964).

En 1992, l'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (EPA) a classé la fumée de tabac comme l'un des agents cancérigènes les plus dangereux chez l'homme, un cancérogène du groupe A. La fumée de tabac se compose de plus de 4 000 composés chimiques et d'environ 60 agents cancérigènes connus. La moitié de ces composés se trouve naturellement dans la feuille de tabac, le reste est généré lors de la combustion du tabac. Le mélange complexe de produits chimiques dans la fumée de tabac comprend du monoxyde de carbone, du cyanure d'hydrogène, du benzène, du formaldéhyde, de la nicotine, du phénol, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des nitrosamines spécifiques au tabac (TSNA) (Engstrom et al., 2003). La nicotine, deuxième constituant le plus abondant de la fumée de tabac, est responsable des propriétés addictives du tabac et représente une source majeure de TSNA. La nicotine est présente à la fois dans la fumée principale et secondaire et est rapidement absorbée par les alvéoles pulmonaires. La nicotine se concentre dans les veines pulmonaires et circule dans tout le corps (Engstrom et al., 2003).

La fumée de tabac a été définie selon 3 classes distinctes : principale, secondaire ou tertiaire. La fumée principale est celle qui est inhalée par le fumeur à travers la cigarette. La secondaire est la fumée émise par une cigarette allumée entre les bouffées et inhalée par les fumeurs mais également par les non-fumeurs (tabagisme passif). Bien que la composition chimique de la fumée principale et secondaire soit similaire, la concentration de nombreux constituants est plus élevée dans la fumée secondaire ou « passive » (Engstrom et al., 2003). Récemment, une autre voie d'exposition a été définie : la fumée tertiaire. Elle est constituée de gaz de fumée de tabac résiduels et de particules qui se déposent sur les surfaces et la poussière qui "dégazent" dans l'air pendant des jours, des semaines et des mois. Ce concept est relativement nouveau dans le domaine de la santé environnementale et publique, cette notion a été inventée en 2009 par Winickoff *et al.*, (2009) (Winickoff et al., 2009).

Les changements dans la conception des cigarettes au fil des ans et l'introduction de cigarettes filtrées ont entraîné des changements dans les habitudes de tabagisme et une altération de la distribution anatomique des constituants de la fumée. En principe, l'utilisation de cigarettes à filtre réduit les niveaux de goudron et de nitrosamines dans la fumée principale. Bien que les fumeurs actuels soient généralement moins exposés que par le passé aux goudrons et aux substances cancérigènes qu'elles contiennent (tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)), le besoin de nicotine semble inciter les fumeurs à inspirer plus intensément pour satisfaire l'envie de nicotine. Par exemple, d'après Gabrielson, (2006), des études ont montré que les fumeurs de cigarettes filtrées ont une fréquence de bouffée plus élevée et augmentent le

volume inspiré à chaque bouffée, ce qui expose les poumons périphériques à un niveau proportionnellement plus élevé de substances cancérigènes. Le résultat de ces changements (conception de la cigarette et mode d'inhalation de la fumée) aboutit à une transformation de la distribution anatomique des composés carcinogènes (voies respiratoires périphériques vs voies respiratoires centrales). Ces modifications semblent être responsables d'un changement dans la pathologie du cancer du poumon, avec une augmentation des adénocarcinomes et une diminution des carcinomes épidermoïdes (Gabrielson, 2006). Les estimations globales suggèrent que le tabagisme actif est responsable d'environ 90 % des cas de cancer du poumon (Alberg and Samet, 2003).

En plus de la grande importance du cancer du poumon en termes de sensibilisation du public, la fumée de cigarette est associée à d'autres maladies et troubles chroniques, notamment la bronchite chronique, l'emphysème pulmonaire, les infections récurrentes, l'œdème pulmonaire et les maladies cardiovasculaires (Bhalla et al., 2009) ainsi qu'à d'autres cancers (Gandini et al., 2008). La bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO) est l'une des principales causes de mortalité (Mannino & Buist, 2007) et touche 25 % des fumeurs (Roth, 2008).

1.2.1. Cancer du poumon

Le cancer du poumon est la principale cause de mortalité liée au tabagisme. Sur la base de l'histologie, il est divisé en deux sous-types principaux : le cancer broncho-pulmonaire à petites cellules (CBPC) et le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBNPC), représentant respectivement 15 et 85 % de tous les cas.

1.2.1.1. Les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC)

Le CBNPC est en outre classé en trois types : le carcinome épidermoïde (qui se développe habituellement dans les grosses bronches situées dans la partie centrale du poumon), l'adénocarcinome (qui prend souvent naissance en périphérie des poumons) et le carcinome à grandes cellules (qui peut siéger dans toutes les parties du poumon) (Institut national du cancer (INCa), 2017). Le carcinome épidermoïde représente 25 à 30 % de tous les cas de cancers pulmonaires. Il provient de cellules squameuses des cellules épithéliales des voies respiratoires dans les bronches situées dans la partie centrale du poumon. Le type le plus courant de cancer pulmonaire est l'adénocarcinome, qui représente environ 40 % de tous les cancers pulmonaires. Les adénocarcinomes pulmonaires se développent à partir de petites cellules épithéliales alvéolaires de type II, qui sécrètent du mucus et d'autres substances. Le carcinome à grandes cellules (indifférencié) représente 5 à 15 % des cancers pulmonaires. Il prend son nom des grandes cellules cancéreuses qui sont visibles au microscope. Ce type de carcinome ne montre aucun signe de maturation squameuse ou glandulaire et, par conséquent, est souvent diagnostiqué par défaut en excluant d'autres possibilités (Denisenko et al., 2018; Planchard et al., 2019).

1.2.1.2. Les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC)

Le cancer à petites cellules est ainsi dénommé du fait de la petite taille des cellules qui le composent à l'examen au microscope. On sait depuis trois décennies que le cancer à petites cellules est un cancer du poumon particulier, car il est lié à la cancérisation de certaines cellules sécrétrices du poumon que l'on appelle cellules neuroendocrines. Il est une forme très maligne de carcinome bronchogénique qui survient le plus souvent dans une localisation centrale du poumon, dans une bronche principale. La principale cause connue de CBPC est le tabagisme, qui représente environ 95 % des cas. De plus en plus de preuves ont impliqué des boucles de croissance autocrines, des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs dans la pathogénèse. Plusieurs anomalies chromosomiques et oncogènes ont été identifiées dans les tissus et lignées cellulaires de CBPC telles que des délétions sur le bras court du chromosome 3 trouvées dans plus de 95% des cas de CBPC. (Sher et al., 2008).

1.3. Prise en charge du sevrage tabagique

En Europe, des études ont mis en évidence que la majorité des fumeurs actuels (51 %) ont tenté d'arrêter de fumer à un moment donné, dont 15 % au cours des 12 derniers mois. Environ les trois quarts (76 %) de ceux qui ont arrêté, ou ont essayé d'arrêter, n'ont utilisé aucune aide. En France, 68% des interrogés affirment avoir essayé d'arrêter de fumer, dont 18% au cours des 12 derniers mois. De plus, 69% ont essayé d'arrêter de fumer sans aide, 17% avec des TNS (la gomme à la nicotine, les timbres ou les inhalateurs...) ou autres médicaments et 19% à l'aide de la cigarette électronique (Directorate General for Health and Food Safety et al., 2021). Différentes méthodes de sevrage existent, certaines ayant prouvé leur efficacité, tandis que d'autres nécessitent encore d'être évaluées.

D'une part, l'accompagnement psychologique par un professionnel de santé joue un rôle essentiel. Il se décline en deux types d'approches (Santé Publique France, 2023b) :

- Thérapies comportementales et cognitives : ces interventions psychologiques aident les fumeurs à modifier leur comportement. Elles peuvent atténuer les déclencheurs de la cigarette, comme éviter de fumer en présence d'autres fumeurs ou rompre les associations habituelles entre la cigarette et certaines activités. Les thérapies comportementales et cognitives permettent également de gérer le stress et les émotions sans recourir à la cigarette.
- Entretien motivationnel : cette approche vise à renforcer la motivation du patient à changer son comportement. L'entretien motivationnel repose sur une collaboration entre le professionnel de santé et le patient. Axé sur l'autonomie, cet entretien favorise l'expression du désir de changement et valorise les bénéfices attendus. Contrairement à la confrontation, il encourage la coopération. Comparé au simple conseil d'arrêt du tabac, l'entretien motivationnel a démontré une augmentation de la probabilité d'abandon du tabac.

D'autre part, les traitements substitutifs nicotiques peuvent être utilisés en complément. Ils visent à atténuer les symptômes de sevrage en apportant de la nicotine de manière contrôlée. Petit à petit, le besoin diminue jusqu'à ne plus se manifester (en moyenne, le traitement peut durer de 3 à 6 mois et peut être prolongé si nécessaire). Ces traitements peuvent être classés en deux catégories principales qui peuvent s'utiliser seules ou se combiner entre elles (Santé Publique France, 2023b) :

- Substituts à libération continue : Les patchs ou timbres délivrent une dose constante de nicotine à travers la peau, évitant les pics et les chutes de nicotine dans le corps.
- Substituts à action rapide : Ces formes orales ou nasales, comme les gommes à mâcher, les comprimés, les inhalateurs et les sprays nasaux, fournissent une dose de nicotine plus rapidement par la bouche ou le nez.

Les substituts nicotiques sont disponibles à des dosages variés, et les professionnels de santé peuvent conseiller sur le dosage adapté en fonction du degré de dépendance. Ils sont généralement remboursés par l'Assurance Maladie et peuvent être prescrits par différents professionnels de santé (Santé Publique France, 2023b).

En outre, des médicaments agissant sur le système nerveux central sont également disponibles. Le bupropion et la varénicline aident les fumeurs à arrêter en réduisant les symptômes de manque. Cependant, ils sont soumis à prescription médicale et ne conviennent pas aux femmes enceintes ou allaitantes ni aux fumeurs de moins de 18 ans. Ils sont recommandés lorsque d'autres méthodes ont échoué. La varénicline est remboursée par l'Assurance Maladie.

D'autres approches comme l'hypnose et l'acupuncture peuvent être utilisées par certains, bien que leur efficacité ne soit pas universellement reconnue (Santé Publique France, 2023b).

Les médicaments de sevrage tabagique ont prouvé leur efficacité pour augmenter l'abstinence à court terme, mais leur efficacité à long terme reste sujette à débat. Une étude a examiné si les bénéfices des médicaments diminuent au cours de la première année. Les résultats ont montré que malgré une diminution, un pourcentage significatif de fumeurs reste abstinent à 12 mois (Rosen et al., 2018).

Des préoccupations concernant la sécurité neuropsychiatrique des médicaments bupropion et varénicline ont été soulevées. Bien que ces médicaments aient montré leur efficacité par rapport aux substituts nicotiques, il existe peu d'informations sur leur sécurité et leur efficacité chez les fumeurs souffrant de troubles psychiatriques (Anthenelli et al., 2016). Le traitement par substituts nicotiques et bupropion permet d'atteindre des taux d'abstinence d'environ 25 à 26 % à 6 mois et 20 % à 1 an, avec des taux d'abstinence légèrement plus élevés pour la polythérapie que pour la monothérapie. Il a été démontré que la varénicline surpasse le bupropion, toutes les formes de thérapie de remplacement de la nicotine et le placebo, avec un taux d'abstinence de 26 % sur 24 semaines de suivi chez les participants sans diagnostic psychiatrique (Borrelli and O'Connor, 2019).

L'utilisation de la cigarette électronique ou du tabac chauffé comme méthode de sevrage suscite des débats. Bien que certaines études aient vanté l'efficacité des e-cigs, d'autres soulignent des préoccupations comportementales non résolues. Le tabac chauffé, en tant qu'alternative, peut entraîner un double usage chez la plupart des fumeurs, ce qui peut augmenter leur consommation de tabac (Stone et al., 2022). Les opinions sur l'efficacité de ces dispositifs varient et restent influencées par les perceptions personnelles des utilisateurs. En effet, la grande majorité de ceux qui n'ont pas ou peu d'expérience avec les cigarettes électroniques pensent que les e-cigs (70 %) ou les produits du tabac chauffés (76 %) n'aident pas les fumeurs à arrêter de fumer. Le rapport de la commission européenne montre que plus de la moitié des utilisateurs d'e-cig ont adopté les cigarettes électroniques pour tenter de réduire leur consommation de tabac (57%), tandis que plus d'un tiers mentionne le fait qu'ils pensent que le vapotage est moins nocif que l'usage du tabac (37%). À l'inverse, les utilisateurs de produits de tabac chauffé mentionnent le plus souvent le fait qu'ils pensaient que ces produits étaient moins nocifs que le tabac à fumer (39%), alors que seulement 28% ont commencé pour arrêter ou réduire le tabagisme (Directorate General for Health and Food Safety et al., 2021). Selon une publication dans le *New England Journal of Medicine*, les e-cigs ont été présentées comme l'aide la plus efficace pour arrêter de fumer, basée sur les résultats d'un essai mené dans les services "Stop Smoking" du National Health Service au Royaume-Uni (Hajek et al., 2019). D'autres études ont obtenu des résultats proches en comparant l'utilisation de l'e-cig aux TNS (Lindson et al., 2023; Myers Smith et al., 2022). Les aides les plus efficaces étaient les e-cigs avec de la nicotine, la varénicline et la cytisine, ainsi que les thérapies de remplacement de la nicotine utilisées en combinaison (Lindson et al., 2023). Cependant, deux éditoriaux (Borrelli and O'Connor, 2019; Drazen et al., 2019) soulèvent des préoccupations sur l'étude de Hajek *et al.*, (2019) concernant des aspects comportementaux que cette étude n'a pas réussi à résoudre. Bien que le taux d'abstinence à un an de 18% dans le groupe utilisant des e-cigs soit supérieur à celui du groupe utilisant des substituts nicotiques traditionnels (9,9% dans cet essai), il est similaire à d'autres combinaisons de substituts nicotiques associés à un soutien psychologique. De plus, à la fin de l'essai, 80% des participants du groupe e-cig utilisaient encore des e-cigs, tandis que seulement 9% des participants du groupe substituts nicotiques avaient encore besoin des substituts. Le taux de réussite du sevrage nicotinique avec les e-cigs n'était que de 3,7% dans cet essai, ce qui suggère clairement que les e-cigarettes pourraient ne pas être une aide efficace pour le sevrage nicotinique. Ainsi, il est suggéré que bien que les e-cigs puissent aider certains fumeurs à arrêter, leur efficacité à long terme est discutable (McAlinden et al., 2019). Les avantages et inconvénients des méthodes de sevrage doivent être soigneusement évalués en fonction des besoins individuels et des preuves disponibles.

2. La cigarette électronique

Depuis quelques années, des nouveaux systèmes électroniques permettant de délivrer de la nicotine sont apparus sur le marché. La cigarette électronique (e-cig) ou dispositifs de vaporisation de nicotine (ou ENDS pour « Electronic nicotine delivery systems ») fait partie de ces nouveaux dispositifs. L'e-cig permet de délivrer de la nicotine mais aussi de mimer la gestuelle de la cigarette conventionnelle. Les consommateurs d'e-cig ou vapoteurs inspirent un aérosol constitué de fines particules issues du chauffage d'un « e-liquide ». Ce liquide est constitué principalement de propylène glycol (PG), de glycérol (c.-à-d. glycérol végétale (VG)) et d'arôme additionnés ou non de nicotine à différentes concentrations (Delrieu et al., 2013).

En France, le point de vue des responsables de santé publique sur le vapotage reste prudent, comme l'a rappelé le Haut Conseil de la santé publique dans son dernier rapport de 2022. Son efficacité pour arrêter de fumer n'est pas encore démontrée, et son impact sur les jeunes est questionné (effet « passerelle »). Les e-cig contiennent de la nicotine, qui est le composant hautement addictif du tabac. Leurs utilisations présentent un risque de dépendance à la nicotine, y compris chez les enfants et les adolescents. Les résultats de recherche montrent que les utilisateurs sont plus susceptibles de devenir des fumeurs de cigarettes, ce qui les expose aux effets nocifs du tabagisme (OMS, 2021). Pourtant, depuis le début des années 2010, les e-cig ont été largement essayées par les fumeurs (Pasquereau et al., 2022).

2.1. Historique

En 1963, Herbert A. Gilbert a développé pour la première fois l'idée d'une cigarette électronique, pour laquelle il a déposé un brevet en 1965. Son brevet décrivait une cigarette électronique qui utilisait de l'air chauffé et aromatisé pour remplacer le tabac et le papier (Gilbert, 1965).

En 2003, Hon Lik, un ancien pharmacien et ingénieur chinois, a créé le premier appareil destiné à simuler l'expérience de fumer une vraie cigarette.(Dutra et al., 2017) . L'appareil a d'abord été commercialisé en Chine sous les auspices des exploitations Golden Dragon. Le nom de la société a ensuite été modifié en 2010 en « Ruyan », qui signifie "comme une cigarette" en chinois. La technologie de vaporisation par une résistance chauffante a été développée et commercialisée en tant que système électronique de distribution de nicotine (ENDS) par David Yunqiang Xiu en 2009 (Leduc and Quoix, 2015). Cette technologie est actuellement la seule disponible sur le marché des cigarettes électroniques.

La croissance initiale du marché des e-cigs a été largement tirée par des entreprises indépendantes des compagnies de tabac traditionnelles, telles que Pax Labs qui a développé la cigarette électronique Juul®. Cependant, presque toutes les grandes multinationales du tabac, telles que British American Tobacco, Philip Morris International et Altria, ont acheté des actions dans des sociétés d'e-cigs et/ou développé leurs propres marques (OMS, 2021).

L'introduction de l'e-cig sur le marché français s'est produite vers 2010, mais son véritable succès a été signalé à partir de 2012, caractérisé par une augmentation des ventes, la création de nombreux magasins spécialisés et l'émergence d'associations professionnelles et d'utilisateurs (Fontaine and Artigas, 2017). L'e-cig demeure controversée car son rapport bénéfice/risque est encore mal connu (Farsalinos, 2017). Cela a conduit plusieurs organisations sanitaires internationales à émettre des avis invitant à la prudence (Brady et al., 2019).

Dès 2014, l'Organisation mondiale de la santé recommandait de réguler le marché de l'e-cigarette par le biais de sa convention-cadre pour la lutte anti-tabac (World Health Organization, 2014). En France, en 2014, le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) a exprimé un avis réservé sur l'utilisation de la cigarette électronique. La Haute Autorité de Santé (HAS), de son côté, a précisé qu'elle ne recommandait pas l'utilisation de l'e-cig pour arrêter de fumer, mais qu'elle ne devait pas non plus être découragée chez les fumeurs qui ont commencé à vapoter et qui cherchent à arrêter de fumer. La HAS a également souligné le risque de dépendance à la nicotine associé à l'utilisation de l'e-cig (Pasquereau et al., 2019).

En 2015, les recommandations de Public Health England, basé sur des chiffres issus d'une expertise montrant que la cigarette électronique serait à 95% moins toxique que la cigarette de tabac, ont suscité une controverse scientifique. Ce chiffre a été remis en question par certains experts. En 2016, le HCSP a révisé son avis et considéré que l'e-cig pouvait être utilisée comme un outil d'aide au sevrage tabagique et de réduction des risques pour les personnes qui fumaient exclusivement des cigarettes. Cependant, dans son dernier avis en 2021, le HCSP a souligné le risque de re-normalisation du tabac et d'entrée dans le tabagisme et souligne aussi que les connaissances fondées sur les preuves sont insuffisantes pour proposer les e-cigs comme aide au sevrage tabagique (Haut Conseil de la santé publique, 2021).

En Europe, la directive européenne 2014/40/UE a été mise en place pour réglementer le commerce de l'e-cig, qui est considérée comme un produit connexe au tabac. Cette directive établit des critères de sécurité, de qualité et d'information que les e-cigs doivent respecter (Pasquereau et al., 2019). En France, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été désignée comme l'entité responsable de la collecte et de l'analyse de toutes les données transmises par les fabricants. À cette fin, une feuille de route a été élaborée en collaboration avec la Direction générale de la Santé. Ces déclarations des fabricants sont essentielles pour fournir une vue complète des ingrédients et des émissions associés aux produits du tabac et du vapotage. Elles visent à évaluer divers aspects, tels que l'attractivité de ces produits, leur potentiel addictif, leur toxicité, tout en contribuant à améliorer notre compréhension des risques qu'ils peuvent présenter pour la santé humaine. Entre mai 2019 et juin 2020, une déclaration a été faite pour la présence ou la mise sur le marché français de 3 173 produits du tabac et 33 813 produits de vapotage (ANSES, 2020).

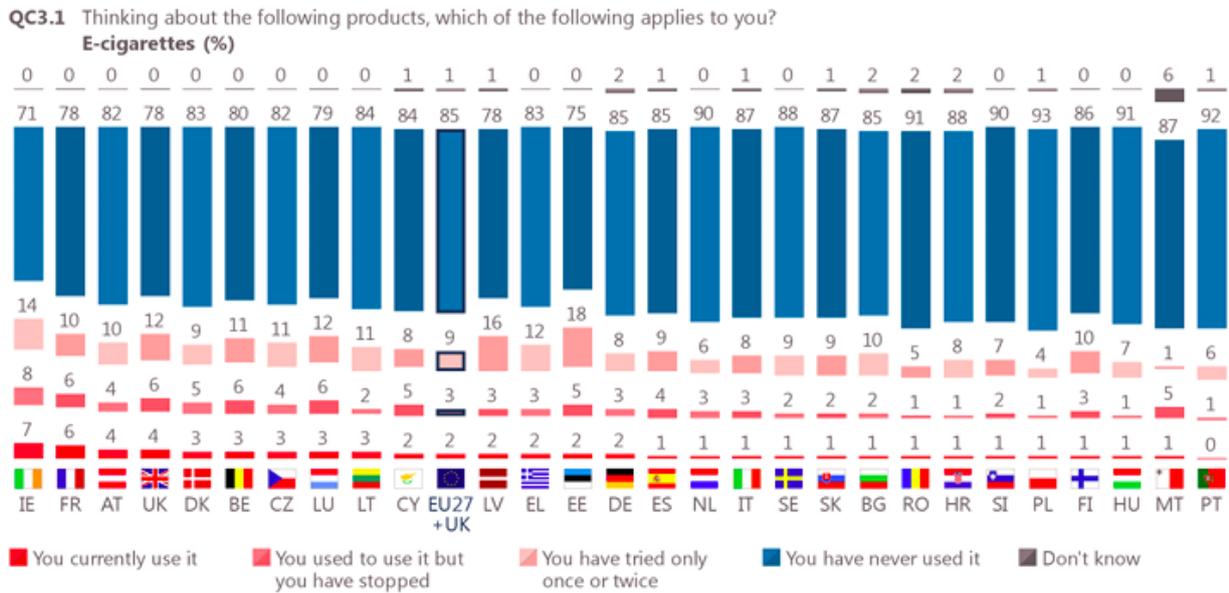
De plus, en France, la vente de produits de vapotage aux mineurs de moins de 18 ans est interdite depuis 2014, et l'utilisation des e-cigs est interdite dans certains lieux à usage collectif depuis 2016, tels que les établissements scolaires ou accueillant des mineurs, les moyens de transports collectifs fermés, ainsi que les lieux de travail fermés et couverts à usage collectif. Cependant, cette interdiction ne s'applique pas à l'ensemble des locaux qui accueillent du public, comme les bars, les restaurants, les hôtels ou les administrations, mais un règlement intérieur peut en interdire l'usage (République Française, 2021).

Enfin, l'association française de normalisation (AFNOR) a émis des recommandations sur la méthodologie à utiliser en laboratoire pour étudier l'e-cig, afin de se placer dans des conditions réalistes. Ainsi par exemple, la température de l'aérosol généré par les dispositifs ne doit pas dépasser 60 °C lors d'étude en laboratoire afin de ne pas se placer dans des conditions irréalistes par rapport aux conditions de vapotage chez l'Homme (AFNOR, 2016).

2.2. Usage de l'e-cig

En 2014, on estimait qu'il existait 466 marques d'e-cig dans le monde, avec des dépenses de 2,76 milliards de dollars US en 2013. Les experts prévoient une augmentation des ventes d'un facteur 17 d'ici 2030. En 2019, les ventes ont atteint 15 milliards de dollars avec désormais plus de 30 000 marques d'ENDS (appareils et e-liquides) vendues dans l'UE (OMS, 2021). Bien que les données sur l'utilisation des e-cigs soient limitées au niveau mondial et dans de nombreux pays, des données provenant principalement d'Amérique du Nord, de l'Union européenne (UE) et de la République de Corée indiquent un doublement de l'utilisation des e-cigs chez les adultes et les adolescents entre 2008 et 2012. Selon une enquête de l'OMS de 2014, les dispositifs de vaporisation de nicotine sont largement disponibles dans le monde. Plus de la moitié de la population mondiale vit dans un des 62 pays qui ont signalé la disponibilité des e-cigs dans leur juridiction, alors que seulement 4% des personnes vivent dans des pays où les e-cigs sont déclarés indisponibles. Le reste de la population vit dans des pays qui n'ont pas fourni d'information sur la disponibilité des e-cigs (World Health Organization, 2014). D'après l'OMS, l'utilisation des e-cigs devrait se remettre d'une brève période de déclin (2019-2020) et continuer d'augmenter à l'échelle mondiale. Certaines données provenant de l'industrie du tabac elle-même suggèrent que, compte tenu de la croissance du marché ces dernières années, il y a eu une augmentation du nombre total d'utilisateurs de nicotine (nouveaux utilisateurs) (OMS, 2021).

En Europe (Figure 4), la consommation de cigarettes électroniques est peu répandue et stable entre 2017 et 2020, avec une prévalence estimée à seulement 2 %, dont 1 % pour une utilisation quotidienne. Cela représente moins d'une personne sur vingt dans l'ensemble des pays à l'exception de l'Irlande (7 %) et de la France (6 %). Par ailleurs, la grande majorité de la population européenne n'a jamais essayé de cigarette électronique, soit 85 %. De plus, 3 % des répondants déclarent en avoir déjà utilisée par le passé, mais avaient finalement arrêté (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. et al., 2021).



Base: All respondents, N= 28,300

Figure 4 : Utilisation de la cigarette électronique en Europe en 2020 (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. et al., 2021)

En France, l'utilisation de la cigarette électronique chez les adultes a évolué depuis sa commercialisation. Les données sur le vapotage ont débuté en 2014 (Figure 5).

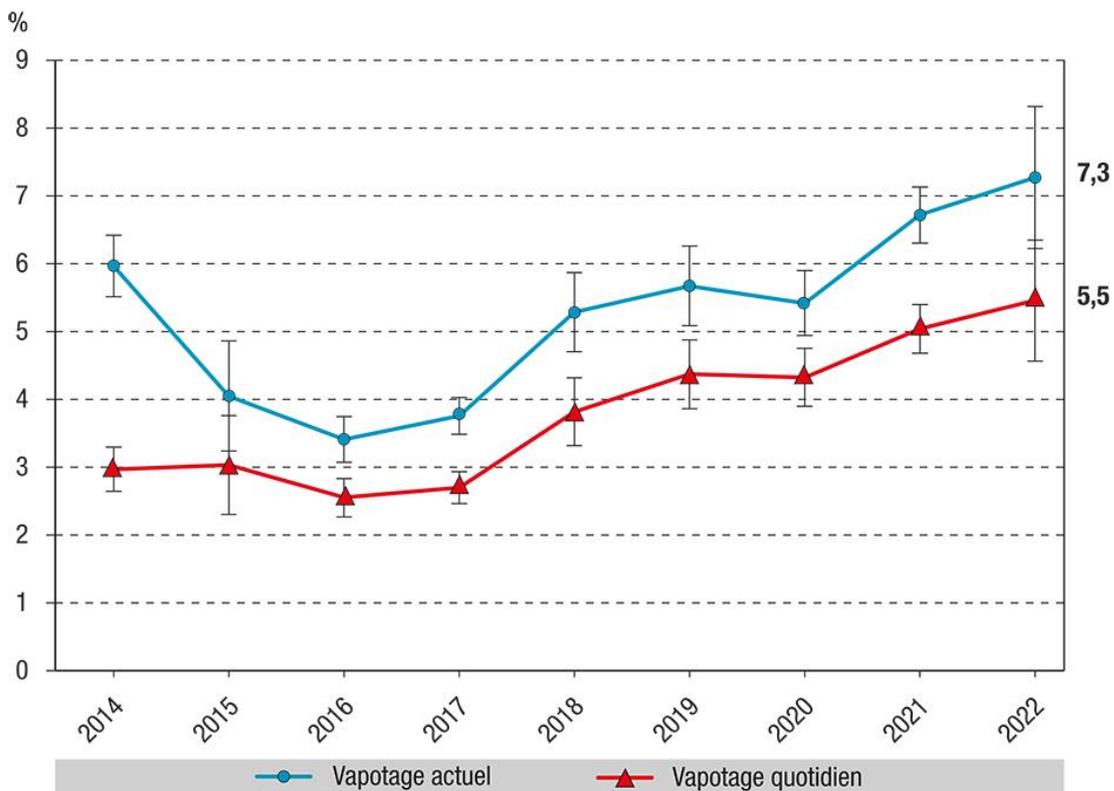


Figure 5 : Evolution du vapotage parmi les adultes en France métropolitaines entre 2014 et 2022 (Pasquereau et al., 2023)

Depuis 2014, l'utilisation quotidienne de la cigarette électronique à augmenter, en passant de 3% en 2014 à 5,5 % en 2022. De plus, en 2022, 41,2% des interrogés avait déjà expérimenté l'e-cig, chiffre en hausse par rapport à 2021. L'usage actuel d'une vapoteuse, c'est-à-dire ceux qui se considèrent comme vapoteur au moment de l'enquête, a été déclaré par 7,3% des sondés. (Pasquereau et al., 2023).

De plus, la quasi-totalité des vapoteurs quotidiens entre 18 et 75 ans ont eu, en 2021 comme en 2017, une expérience de tabagisme : 41,2 % ont un double usage (fument encore du tabac tous les jours), 14,3 % ont un double usage occasionnellement (Pasquereau et al., 2022). En 2022, le double usage est déclaré par 61% des vapoteurs interrogés par l'ANSES (ANSES, 2022). De plus, parmi les vapoteurs, 43,7 % sont d'anciens fumeurs, et moins de 1 % n'ont jamais fumé. Ainsi, la prévalence du vapotage quotidien chez l'adulte est en constante augmentation en France depuis son arrivée sur le marché (Pasquereau et al., 2022).

Des milliers de saveurs de e-liquide sont commercialisés, ce qui peut augmenter l'attrait du produit et aider à cibler spécifiquement les enfants et les jeunes adultes. L'utilisation d'e-cig imite l'action de la main à la bouche associée aux produits du tabac fumés conventionnels et peut donc risquer de renormaliser le comportement tabagique, en particulier chez les populations plus jeunes (17-19 ans) (OMS, 2021) .

En population adolescente, l'expérimentation du vapotage et l'usage dans le mois a connu une hausse entre 2015 et 2018, passant de 35% à 52% des lycéens pour l'un et de 10% à 17% des lycéens pour l'autre d'après les données de l'enquête EnCLASS (Spilka et al., 2020). De plus, l'usage de la cigarette électronique chez les jeunes de 17 ans est en constante progression depuis 2014 comme on peut l'observer avec les données de l'étude ESCAPAD (Tableau 1).

Tableau 1 : Evolution de l'usage de la cigarette électronique chez les jeunes de 17 ans en France (%) (ESCAPAD) (OFDT, 2023, 2022)

USAGE	2014	2017	2022
Expérimentation	53,3	52,4	56,9
Récent (au moins un usage dans le mois)	22,1	16,8	30,7
Quotidien	2,5	1,9	6,2

Selon ces données, plus de la moitié des adolescents de 17 ans ont expérimenté la e-cig, un chiffre qui est passé de 53,3 % en 2014 à 56,9 % en 2022. Malgré une diffusion importante de l'e-cig chez les adolescents, la plupart d'entre eux l'utilisent de manière occasionnelle et très peu d'entre eux vapotent quotidiennement sans fumer de tabac. Cependant, l'usage quotidien de l'e-cig a triplé depuis 2017, passant de 1,9 % à 6,2 % en 2022. Tant les garçons que les filles sont concernés par cette augmentation, mais les changements observés chez ces dernières sont particulièrement importants, avec une augmentation de 19% pour l'usage récent et une multiplication par six du niveau d'usage quotidien au cours de la période (6,3% contre 0,9%).

En 2022, dans ce contexte de hausse de l'expérimentation de l'e-cig, l'âge moyen d'initiation à la cigarette électronique est de 15,0 ans, contre 15,4 en 2017, ce qui est légèrement plus tardif que l'initiation au tabac (+6 mois). Il est important de noter que la proximité entre l'usage de la e-cig et celui du tabac est importante chez les jeunes de 17 ans. En effet, près de 45 % des adolescents ont expérimenté les deux produits, tandis que seulement 3,8 % ont essayé la e-cig sans avoir jamais fumé de tabac auparavant. De plus, la majorité des doubles utilisateurs ont commencé par tester la cigarette de tabac avant d'essayer l'e-cig. Enfin, la proportion de vapoteurs exclusifs a nettement augmenté, passant de 2,4 % en 2017 à 5,8 % en 2022. Cela montre que certains jeunes se tournent vers l'e-cig plutôt que vers le tabac, même si la majorité des vapoteurs quotidiens sont également des fumeurs quotidiens de cigarettes de tabac (55,4% en 2022). Ces chiffres soulignent la nécessité de sensibiliser les jeunes aux risques liés à l'usage de l'e-cig et de continuer à promouvoir des mesures de prévention efficaces pour prévenir la consommation de tabac et de nicotine chez les adolescents (OFDT, 2023, 2022).

Des études aux États-Unis d'Amérique ont montré que les arômes jouent un rôle majeur dans l'utilisation de la cigarette électronique chez les enfants et les adolescents. Depuis 2011, l'utilisation de l'e-cig (dans les 30 derniers jours) chez les lycéens aux États-Unis est passée de 1,5 % à 19,6% en 2020 (Figure 6). Bien qu'il y ait eu une baisse récente de la prévalence des utilisateurs, les taux continuent d'être inquiétants (OMS, 2021).

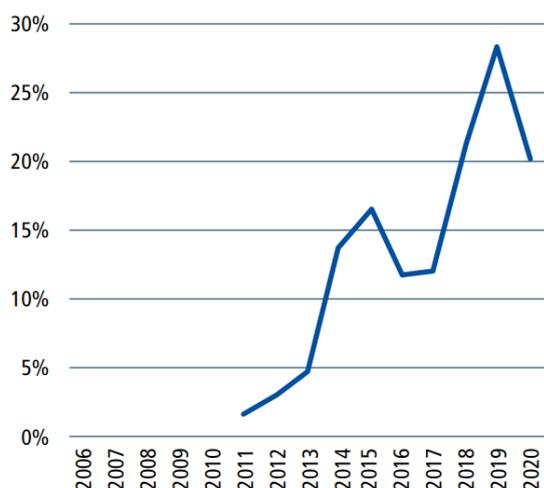


Figure 6 : Evolution de l'usage de la cigarette électronique dans les 30 derniers jours chez les élèves du secondaire aux Etats-Unis (OMS, 2021)

De 2014 à 2020, la proportion d'utilisateurs d'e-cigs utilisant des e-cigs aromatisées est passée de 65,1 % à 84,7 %. Parmi les élèves du secondaire, les types d'arômes les plus couramment utilisés étaient les fruits (73 %), la menthe (56 %), le menthol (37 %), et les bonbons, desserts ou autres sucreries (37%). 70 % des jeunes utilisateurs actuels de cigarettes électroniques (âgés de 12 à 17 ans) déclarent utiliser des cigarettes électroniques « parce qu'elles ont des saveurs que j'aime » (OMS, 2021).

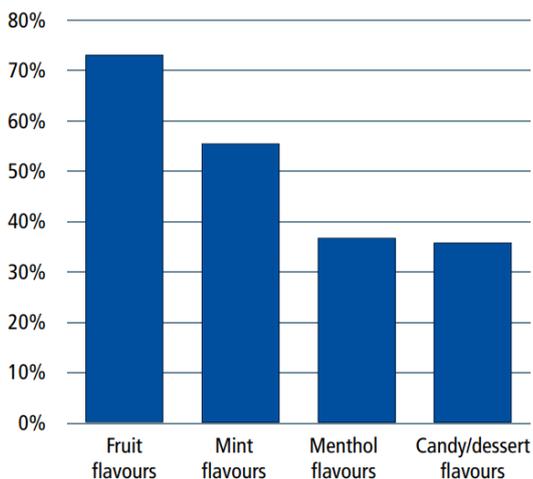


Figure 7 : Arôme utilisé par les élèves du secondaire aux US (OMS, 2021)

Des études ont étudié si l'e-cig pouvait aider à arrêter la consommation de tabac. Johnson et al ont montré que les e-cig peuvent servir de substitut aux cigarettes de tabac et peuvent être un meilleur substitut que la gomme à mâcher pour réduire la consommation de tabac (Johnson et al., 2017).

2.3. Fonctionnement d'une e-cig

La cigarette électronique (Figure 8) fonctionne grâce à une batterie qui fournit l'électricité à une résistance qui va chauffer (sans combustion) du « e-liquide » contenu dans le clearomiseur. Ce liquide est principalement constitué de propylène glycol, glycérol et d'arôme additionnés ou non de différentes concentrations de nicotine. Les consommateurs d'e-cig ou vapoteurs inspirent un aérosol constitué de fines particules, issu du chauffage du e-liquide. Les dispositifs évoluent rapidement depuis la création de l'e-cig : en forme, taille et fonctionnalité. Il existe également une variété de "générations" d'e-cig. Par exemple, il existe des systèmes ouverts avec des réservoirs rechargeables, tandis qu'il y a des systèmes fermés qui utilisent des cartouches ou des dosettes préremplies comme dans le cas d'e-cigs jetables. Au fil du temps, le développement de l'e-cig a d'abord impliqué une augmentation de la puissance électrique générée. La puissance électrique générée dans l'appareil et la température à laquelle la solution est chauffée peuvent augmenter la quantité de nicotine contenue dans l'aérosol et donc délivrée à l'utilisateur. Certains dispositifs peuvent être utilisés à plus de 250 W, augmentant ainsi le risque d'exposition des utilisateurs à des substances nocives (OMS, 2021). Puis l'évolution actuelle s'oriente vers la création de modèles plus compacts utilisant des sels de nicotine.



Figure 8 : Schéma d'une cigarette électronique

Les cigarettes électroniques peuvent être classées en plusieurs générations. Il en existe 4 à 5 en fonction des auteurs et de la méthode de classification utilisée.

Les dispositifs de première génération font référence aux dispositifs de cigarettes électroniques conçus pour imiter le plus possible l'expérience de fumer. Ces produits ont servi de substituts à la cigarette chez les usagers qui souhaitaient arrêter de fumer ou recherchaient un produit alternatif à la cigarette. Les cigarettes électroniques de première génération sont souvent conçues pour ressembler à une cigarette de tabac combustible, mais certaines sont conçues pour simuler un cigare ou une pipe. Ils sont aussi appelés cigalikes (cig-a-likes) ou « vape sticks ». Les e-cigs de deuxième génération se caractérisent par un clearomiseur (une cartouche transparente qui contient du e-liquide et un atomiseur) et une batterie fine. Les appareils de deuxième génération comprennent des produits qui ont la forme de stylos, sont plus grands que la génération précédente et cylindriques et généralement utilisés à des puissances faibles non-modulables. Les appareils de troisième génération représentent un ensemble diversifié de produits. Esthétiquement, ils ressemblent peu aux cigarettes, car beaucoup sont carrés ou rectangulaires et disposent de clearomiseur et de batteries changeables. De plus, sur ces dispositifs, la puissance d'utilisation peut être modifiée. Ces e-cig sont souvent appelées « mods » (Committee on the Review of the Health Effects of Electronic Nicotine Delivery Systems et al., 2018). Pour certains, les appareils de quatrième génération sont semblables à celle de troisième génération mais ont un système de contrôle de la température en plus (Di Cicco et al., 2020), pour d'autres ces dernières font partie de la troisième génération (Williams and Talbot, 2019).

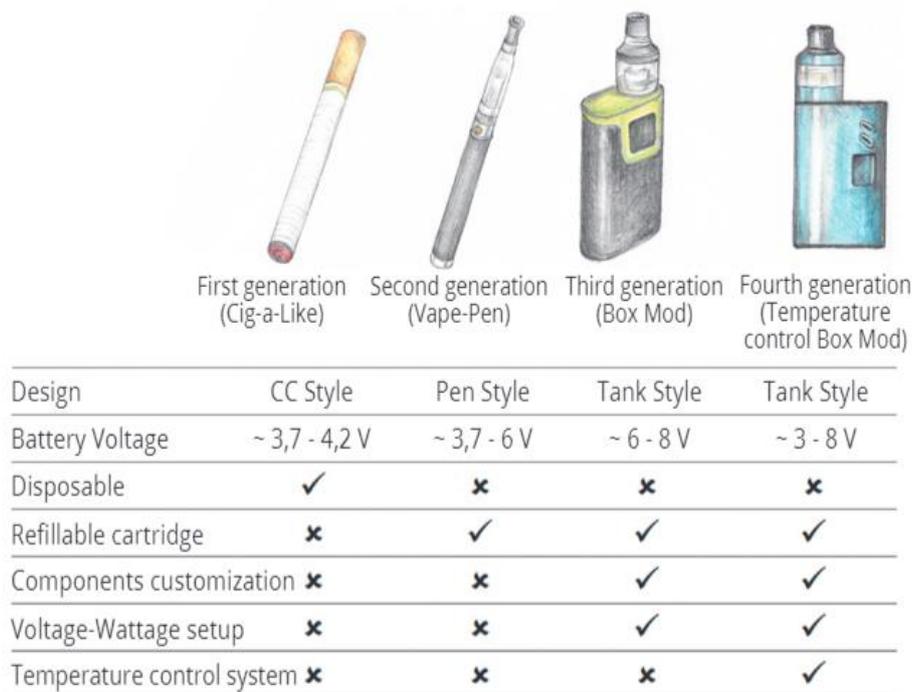


Figure 9 : Représentation des différentes générations d'e-cig (Di Cicco et al., 2020)

La quatrième génération, telle que classée dans la Figure 10 comprend le style pod (Ex : JUUL, PUFF) qui est livré avec une puissance fixe et des batteries de formes différentes, telles que des formes USB et utilise des e-liquides contenant des sels de nicotine. Cette dernière génération évolue rapidement et est en pleine essor.

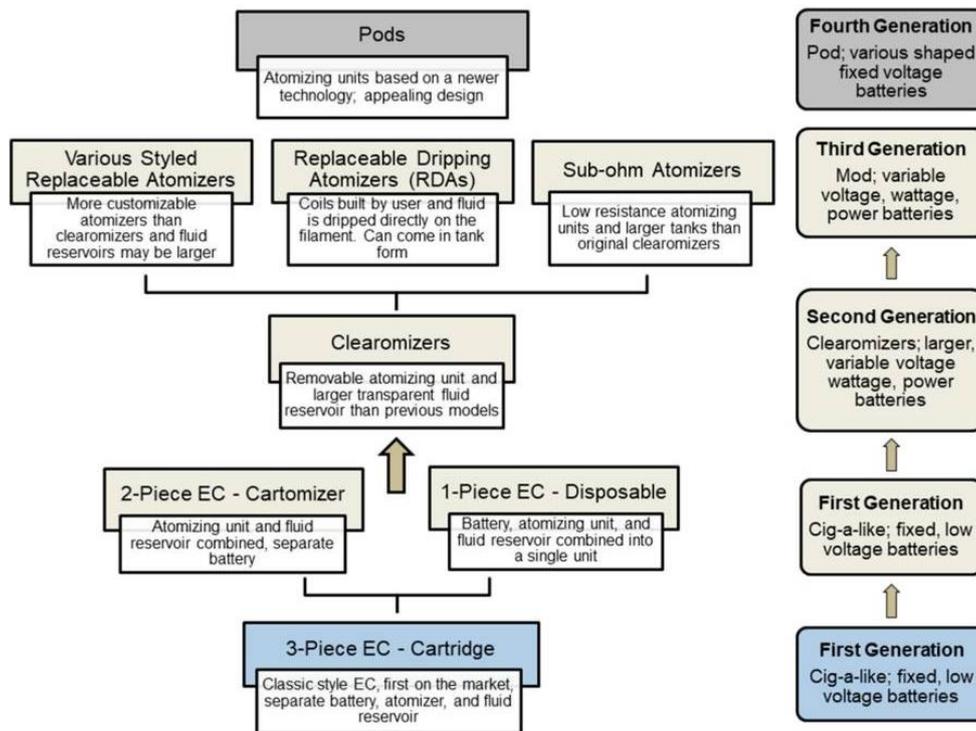


Figure 10 : Caractéristiques générales des quatre générations de cigarettes électroniques (Williams and Talbot, 2019)

Chaque année, de nombreux nouveaux dispositifs et produits de vapotage sont lancés sur le marché français, avec un total de 33 813 produits de vapotage répertoriés en France entre mai 2019 et juin 2020. À cette période, le marché comptait près de 70 000 références commerciales distinctes (ANSES, 2020). Actuellement en France, 62 % des vapoteurs utilisent une e-cig de troisième génération (ANSES, 2022).

2.4. Toxicité de l'e-cig

2.4.1. Composition chimique des émissions d'e-cig

Alors que plusieurs études s'accordent sur le fait que la nocivité globale des émissions d'e-cig est nettement inférieure à celle de la fumée de cigarette conventionnelle (Azzopardi et al., 2016; Delrieu et al., 2013; Goniewicz et al., 2014; Taylor et al., 2016), l'e-cig émet tout de même des composés dangereux. Des composés carbonylés ont également été détectés dans les aérosols, comme l'ont montré deux études menées au sein du laboratoire (Beauval et al., 2017; Dusautoir et al., 2021), ainsi que d'autres études antérieures (Bekki et al., 2014; Gillman et al., 2016; Goniewicz et al., 2014). Certains de ces composés, comme le formaldéhyde, l'acétaldéhyde sont classés comme dangereux et potentiellement dangereux par la FDA (Food and Drug Administration, 2012) ou classé respectivement dans les groupes 1 et 2B par le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) (IARC, 2018). Ces composés toxiques sont principalement dus à la dégradation du propylène glycol et du glycérol (Bekki et al., 2014). Un certain nombre de recherches a démontré la présence de composés carbonylés en quantité importante se rapprochant des quantités présentes dans la fumée de cigarette (Goniewicz et al., 2014; Kosmider et al., 2014). Cependant, ces études ont ensuite été critiquées (Farsalinos et al., 2015) car elles étaient réalisées dans des conditions de vapotage non-réalistes, avec par exemple des fréquences de vapotage élevées (une bouffée tous les 10 secondes) engendrant une surchauffe du e-liquide, et en conséquence une génération de composés toxiques plus importante (Farsalinos et al., 2015). Tout comme les composés carbonylés, des études de l'équipe IMPECS ont démontré la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) dans les aérosols d'e-cig. Des concentrations plus faibles ont été mesurées dans les émissions d'e-cig par rapport à ceux de la fumée de cigarette (Beauval et al., 2017; Dusautoir et al., 2021).

D'autre part, les e-cigs génèrent un aérosol en chauffant un e-liquide avec une bobine métallique. Or, on ignore si les métaux sont transférés de la bobine à l'aérosol. C'est pourquoi une étude du laboratoire a évalué la présence d'éléments traces métalliques dans les e-liquides et aérosols. De faibles concentrations de tous les éléments traces métalliques analysés ont été détectées dans les e-liquides, la plupart étant inférieures ou proches de leurs limites de quantification (LOQ). En ce qui concerne les aérosols, les concentrations en éléments traces métalliques mesurées étaient comparables aux concentrations de l'échantillon témoin expérimental (Al, Co, Mn, Ni et Pb) ou inférieures à la LOQ (Be, Cu, Hg, V et Zn) (Beauval et al., 2017). En revanche, les résultats d'une autre étude indiquent que les e-cigs sont une source potentielle d'exposition aux métaux toxiques (Cr, Ni et Pb) et aux métaux toxiques par inhalation (Mn et Zn). Des concentrations nettement plus élevées ont été mesurées dans les échantillons d'aérosol d'e-cig et dans le e-liquide du réservoir par rapport au e-liquide n'ayant jamais été en contact avec le filament. Cela démontre que le contact de la bobine pourrait induire une contamination du e-liquide (Olmedo et al., 2018).

Par ailleurs, le e-liquide pourrait contenir d'autres ingrédients potentiellement dangereux : des traces de pesticides ont été quantifiées dans certains e-liquides aromatisés, avec ou sans nicotine, ce qui suggère que les arômes constituent aussi bien une source probable de contamination aux pesticides que la nicotine (Beauval et al., 2017).

2.4.2. Etudes de toxicité générale

2.4.2.1. Etudes *in vitro*

Des études s'intéressent depuis quelques années à l'évaluation de la toxicité de l'e-cig, d'abord dans des modèles *in vitro* puis plus récemment dans des modèles animaux. Les études toxicologiques *in vitro* peuvent être réalisées avec plusieurs types de cultures cellulaires : elles peuvent être faites, d'une part, sur des cultures cellulaires classiques où les cellules sont immergées sous du milieu de culture ou, d'autre part, sur des cultures plus innovantes où les cellules sont cultivées en interface air/liquide (IAL), c'est à dire, en contact à la fois avec le milieu de culture (sous nageant) et l'air. Ce dernier mode de culture permet l'exposition directe des cultures cellulaires aux aérosols. Les premiers travaux étudiant la toxicité de l'e-cig ont été réalisés avec des cultures cellulaires immergées, soit avec du milieu de culture dans lequel du e-liquide est directement dissous (Gerloff et al., 2017; Sherwood and Boitano, 2016; Wu et al., 2014), soit avec du milieu de culture dans lequel on a fait « barboter » l'aérosol de l'e-cig (Husari et al., 2016; Misra et al., 2014; Schweitzer et al., 2015). Les études réalisées avec des cultures cellulaires immergées ont souvent obtenu des résultats contradictoires. En effet certaines études montrent une diminution de la viabilité cellulaire (Husari et al., 2016; Sherwood and Boitano, 2016), mais sont réalisées dans des conditions particulières avec des intervalles de bouffées courts (14 secondes) (Husari et al., 2016), contrairement aux profils standardisés (30 secondes ou 1 minute). D'autres travaux ne montrent aucun effet cytotoxique de l'e-cig (Misra et al., 2014; Taylor et al., 2016). Malgré tout, ces études ont toutes montré une réduction significative de la toxicité de l'e-cig en comparaison à la cigarette classique (Cervellati et al., 2014; Husari et al., 2016; Misra et al., 2014). En revanche, toutes ces études ont négligé l'effet de l'aérosolisation du e-liquide et sont donc peu représentatives des conditions réelles du vapotage puisque les échantillons n'ont pas été testés sous la forme consommée par les utilisateurs. L'exposition de cellules cultivées en IAL par la génération d'aérosol d'e-cig *via* une machine à fumer est donc plus pertinente pour étudier les effets des aérosols d'e-cig ou de produits du tabac.

Des résultats différents sont aussi retrouvés dans les études d'exposition aux aérosols d'e-cig avec des cellules en IAL. Certains montrent une diminution de la viabilité cellulaire suite à l'exposition à des aérosols d'e-cig (Leigh et al., 2016; Scheffler et al., 2015). D'autres n'observent aucun effet sur la viabilité cellulaire (Anthérieu et al., 2017; Dusautoir et al., 2021; Garcia-Arcos et al., 2016). Ces différences de toxicité pourraient s'expliquer notamment par la variabilité dans les modèles cellulaires utilisés. En revanche entre les travaux de Garcia-Arcos *et al*, (2016) et Scheffler *et al*,(2015) la différence s'opère au niveau du protocole

expérimental : d'un côté, les cellules sont exposées à 200 bouffées de 55ml sans arrêt entre les bouffées (Scheffler et al., 2015) alors que dans l'autre étude, les cellules sont exposées à 36 bouffées de 70 mL (Garcia-Arcos et al., 2016). Le choix du nombre de bouffées, du volume et de la fréquence entre 2 bouffées est donc important et peut modifier les résultats obtenus, c'est pourquoi il existe des profils normalisés (ISO 20768:2018 et HCl) afin de standardiser les pratiques.

Ces études *in vitro* ont par ailleurs mis en évidence différents mécanismes de toxicité associés à l'e-cig, avec par exemple une réduction de la fréquence des battements ciliaires et de la conductance ionique (Garcia-Arcos et al., 2016), une réponse pro-inflammatoire avec une augmentation notamment de l'interleukine 6 (Anthérieu et al., 2017; Leigh et al., 2016; Wu et al., 2014) ou de la cytokine chimio-attractrice IL-8 (Anthérieu et al., 2017; Gerloff et al., 2017). Leigh *et al.*, (2016) ont testé plusieurs saveurs d'e-liquides disponibles dans le commerce, ils ont remarqué qu'avec les arômes « menthol », « café » ou « fraise » une réduction significative de la viabilité et de l'activité métabolique était présente (l'arôme de fraise a provoqué une réponse similaire à celle observée avec l'exposition à la fumée de cigarette) (Leigh et al., 2016). Des travaux du laboratoire ont démontré que la puissance de l'e-cig pouvait jouer un rôle important sur la génération de stress oxydant dans des cellules bronchiques humaines exposées. En effet, l'e-cig réglée à une faible puissance ne provoque aucun changement du ratio glutathion oxydé/glutathion réduit (GSSG/GSH) (Anthérieu et al., 2017) alors qu'à plus forte puissance les émissions vont provoquer une augmentation de ce ratio, démontrant une génération de stress oxydant dans les cellules exposées (Dusautoir et al., 2021).

2.4.2.2. Etudes *in vivo*

Plusieurs études ont été réalisées grâce à des modèles *in vivo*. Ces études chez l'animal permettent de déterminer les effets des émissions d'e-cig à plus long terme et sur un organisme entier. Les e-cigs induisent une inflammation, augmentent le développement de l'inflammation allergique des voies aériennes dans les modèles asthmatiques, modifient le comportement des animaux et suppriment la défense pulmonaire de l'hôte (Chun et al., 2017; Garcia-Arcos et al., 2016; Hiemstra and Bals, 2016; Schweitzer et al., 2015). Une augmentation du stress oxydant a aussi été mise en évidence suite à l'exposition de rat Sprague Dawley (Canistro et al., 2017) ou de souris C57BL/6 (Glynos et al., 2018). Malgré tout, d'après la plupart des paramètres étudiés en toxicologie *in vivo*, les e-cigs semblent moins nocives que les cigarettes de tabac. Cependant, les études actuelles se limitent souvent à des expositions de quelques semaines. Il manque encore de données pertinentes, en particulier sur des expositions chroniques jusqu'à plusieurs mois. C'est pourquoi le laboratoire a entrepris des études *in vivo* pour étudier les effets du vapotage sur le long terme (Projet RESPIRE financé par l'INCa, 2018-2021). Ces travaux ont permis de suivre des souris exposées pendant 6 mois aux aérosols d'e-cig ou à la fumée de cigarette. Les données issues de cette étude ont mis en évidence la génération d'un stress oxydant associé à la formation de cassures de l'ADN ainsi que des altérations de la fonction mitochondriale aussi bien avec l'e-cig réglée à forte puissance qu'avec la cigarette conventionnelle.

De plus, des différences significatives apparaissent dans les analyses anatomopathologiques : alors qu'une inflammation diffuse alvéolaire et un épaississement modéré de l'épaisseur des parois alvéolaires est observé chez les souris exposées aux aérosols d'e-cig, une inflammation importante péribronchique et alvéolaire doublée d'un emphysème et d'un épaississement des parois alvéolaires, de même qu'une hyperplasie épithéliale avec quelques nodules associés, sont observés après 6 mois d'exposition à la fumée de cigarette.

2.4.2.3. Etudes chez l'Homme

Des recherches chez l'Homme, ont été menées pour évaluer les effets de la cigarette électronique sur la santé, notamment chez les non-fumeurs. Une étude longitudinale, la plus longue à ce jour, a suivi neuf utilisateurs d'e-cig, n'ayant jamais été fumeurs, pendant 42 mois (3 ans et demi). Les paramètres de santé examinés chez ces utilisateurs d'e-cig, tels que la pression artérielle, la fréquence cardiaque, le poids, la fonction pulmonaire, les symptômes des voies respiratoires, les taux d'oxyde nitrique et de monoxyde de carbone exhalés, n'ont montré aucune modification significative par rapport au groupe contrôle de non-fumeurs et non-vapoteurs (Polosa et al., 2017). Cependant, une étude distincte a examiné les effets aigus de l'inhalation d'aérosols d'e-cig sans nicotine sur des sujets sains n'ayant jamais utilisé de tabac. Dix participants ont été soumis à une exposition à l'e-cig, et des marqueurs d'inflammation (protéine C-réactive (CRP) et molécule d'adhésion intercellulaire soluble (sICAM)) ainsi que des métabolites de l'oxyde nitrique (NOx) ont été mesurés dans leur sérum. Cette étude a également évalué le stress oxydatif et l'activation endothéliale en mesurant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'expression d'ICAM-1 sur les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMVEC). Leurs résultats suggèrent que même en l'absence de nicotine, l'inhalation aiguë d'aérosols d'e-cig induit temporairement un stress oxydatif et une inflammation, pouvant potentiellement affecter le réseau endothélial vasculaire et augmenter le risque de pathologies vasculaires (Chatterjee et al., 2019). Des résultats similaires ont été montrés par Singh *et al*, (2019), les utilisateurs de cigarettes électroniques présentaient des niveaux accrus de biomarqueurs d'inflammation et de stress oxydatif, ainsi qu'une réduction des médiateurs anti-inflammatoires et un dysfonctionnement endothélial. Ces effets peuvent contribuer à augmenter la susceptibilité aux maladies systémiques, soulignant les préoccupations potentielles pour la santé des utilisateurs de cigarettes électroniques (Singh et al., 2019).

2.4.3. Etudes des effets génotoxiques et mutagènes

Les effets génotoxiques et mutagènes de la cigarette électronique ont été étudiés ces dernières années à différents niveaux :

- Mesure des dommages primaires de l'ADN (lésions réversibles qui peuvent être réparées)
- Evaluation des effets mutagènes (mutations géniques et aberrations chromosomiques) qui sont des effets irréversibles transmises à la descendance.

Une synthèse de ces travaux *in vitro* et *in vivo* est présentée dans le Tableau 2 et Tableau 3.

2.4.3.1. Etudes *in vitro*

- Lésions primaires de l'ADN

Tout d'abord, plusieurs études ont examiné les effets génotoxiques de la cigarette électronique avec le test des comètes. C'est une technique sensible qui permet de détecter, grâce à une électrophorèse, les cassures simples et doubles brins de l'ADN. La présence de cassures de l'ADN causées par des dommages génétiques rendent les brins d'ADN plus mobiles, créant ainsi un aspect en forme de "comète". Les comètes résultantes sont observées au microscope à fluorescence et sont classées en fonction de leur taille. Les comètes avec un pourcentage d'ADN dans la queue plus important indiquent un ADN plus endommagé. Al-Saleh *et al.*, (2020) ont observé des dommages à l'ADN (cassures simple et double brins) sur des cellules lymphoblastoïdes humaines et des cellules d'ovaires de hamster chinois exposés à des e-liquides contenant de la nicotine (Al-Saleh *et al.*, 2020). Deux autres études ont également rapporté des résultats similaires, montrant des dommages à l'ADN après l'exposition à différents aérosols de cigarettes électroniques (Khalil *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2016). Cependant, des résultats contradictoires ont été observés dans une autre étude qui a mis en évidence des tests de comète positifs pour la cigarette traditionnelle, mais négatifs pour l'e-cig, dans des modèles de cellules épithéliales orales (MOE1A and MOE1B (cellules immortalisées d'un épithélium buccale ordinaire) et une lignée cellulaire cancéreuse de leucoplasie buccale humaine (MSK-LEUK1)) (Tellez *et al.*, 2021).

Ganapathy *et al.*, (2017) ont évalué les dommages à l'ADN induits par des extraits d'aérosol d'e-cig et de fumée de cigarette. Ils ont constaté que ces extraits d'e-cig induisent des dommages à l'ADN de manière dose-dépendante, indépendamment de la concentration de nicotine. Cependant, les dommages à l'ADN étaient significativement moins importants que ceux induits par les extraits de fumée, tels que mesurés par le test q-PADDA. Ce test est une méthode quantitative par qPCR, ici réalisée sur le gène TP53, qui permet de mesurer avec précision un large spectre de lésions de l'ADN. En revanche, les auteurs ont noté que les niveaux de dommages oxydatifs à l'ADN, indiqués par la présence de 8-oxo-dG, une lésion de l'ADN hautement mutagène, étaient similaires ou légèrement supérieurs après exposition aux extraits d'aérosol de cigarette

électronique par rapport aux extraits de fumée (Ganapathy et al., 2017). Au contraire, une autre étude a observé aucun effet génotoxique avec des e-liquides aromatisés au tabac et contenant de la nicotine (purs ou sous forme d'extraits d'aérosols PBS) en utilisant le test ToxTracker. C'est un test de génotoxicité qui combine plusieurs biomarqueurs pour obtenir un aperçu du mode d'action des composés génotoxiques. Le test comprend non seulement des marqueurs de dommages à l'ADN en tant que prédicteurs pour les tests de génotoxicité standard, mais également des marqueurs non génotoxiques, notamment le stress oxydatif et le stress cellulaire général (Czekala et al., 2021).

- Mutations

Les aberrations chromosomiques ont été évaluées dans plusieurs études par le test du micronoyau, qui consiste à examiner les micronoyaux, formés de fragments d'ADN, qui se forment à l'intérieur d'une cellule lorsque son noyau est endommagé. Il permet de mettre en évidence des cassures de chromosome (clastogénéicité) et/ou une mauvaise ségrégation des chromosomes lors de la mitose (aneuploïdie) faisant apparaître ces micronoyaux. Plusieurs études ont investigué les effets mutagènes de l'e-cig en réalisant des tests du micronoyau. Al-Saleh *et al*, (2020) ont rapporté des résultats positifs avec certaines marques de e-liquide, montrant une augmentation du pourcentage de micronoyaux et indiquant ainsi des dommages chromosomiques. Cependant, ils ont noté que cette augmentation pourrait être influencée par une cytotoxicité élevée, bien que certaines marques aient présenté des viabilités cellulaires acceptables (Al-Saleh et al., 2020). Tellez *et al*, (2021) ont aussi observé des résultats positifs avec la cigarette traditionnelle et certains e-liquides utilisés avec l'e-cig (Tellez et al., 2021). En revanche, plusieurs études ont constaté des effets positifs de la cigarette traditionnelle avec le test du micronoyau, tandis que l'e-cig donnait des résultats négatifs (Misra et al., 2014; Rudd et al., 2020; Thorne et al., 2019a; Wieczorek et al., 2020). Wieczorek *et al*, (2020) ont aussi obtenus des résultats négatifs au test du micronoyau, que ce soit avec les aérosols d'e-cig ou directement les e-liquides (Wieczorek et al., 2020). En outre, Thorne *et al*, (2019) ont comparé la cigarette traditionnelle, l'e-cig et des produits de tabac chauffé. Leurs résultats ont montré que la cigarette traditionnelle était positive au test du micronoyau et au test de lymphome de souris, tandis que l'e-cig et les produits de tabac chauffés étaient négatifs dans ces tests (Thorne et al., 2019b).

De plus, Yu *et al*, (2016) ont réalisé des tests de survie cellulaire clonogénique avec la cigarette électronique. Ce test consiste à évaluer l'impact d'un agent sur la capacité des cellules à proliférer. Les cellules viables sont capables de se diviser et de former de nouvelles colonies, tandis que les cellules mortes ou endommagées ne proliféreront pas. Leurs résultats ont montré un effet positif, indiquant que l'utilisation de l'e-cig peut avoir un impact sur la survie cellulaire. Ils ont également observé des résultats positifs au test γ -H2AX, technique utilisée pour évaluer notamment les cassures double-brin, ce qui suggère des dommages à l'ADN (Yu et al., 2016).

Les effets mutagènes de l'e-cig et de la cigarette traditionnelle ont également été évalués par le test d'Ames. Le test d'Ames est une méthode visant à évaluer le potentiel mutagène des substances chimiques en utilisant des souches bactériennes sensibles aux mutations géniques (ajout, perte ou substitution de nucléotides). Les bactéries employées dans ce test sont généralement des souches mutantes incapables de se multiplier correctement, à moins qu'une mutation génique ne survienne pour rétablir leur capacité de croissance. Par conséquent, si la substance testée induit des mutations, cela entraîne une multiplication des bactéries, ce qui est interprété comme un indicateur de l'activité mutagène de la substance. Misra *et al*, (2014) ont effectué ce tests en utilisant différents types de cigarettes (3R4F, 1R5F, Marlboro gold) et des e-cigs avec et sans nicotine (Classic Tobacco and Magnificent Menthol). Leurs résultats ont montré que la cigarette traditionnelle était positive dans le test d'Ames, tandis que les e-cigs étaient négatives (Misra et al., 2014). Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres équipes (Rudd et al., 2020; Wieczorek et al., 2020).

En conclusion, ces études mettent en évidence des résultats contrastés concernant les effets génotoxiques et mutagènes de l'e-cig. En effet, des résultats clairement négatifs sont obtenus pour l'e-cig avec le test d'Ames, démontrant l'absence de potentiel à induire des mutations géniques. Par contre, les tests du micronoyau ont donné des résultats contradictoires, avec des études rapportant des aberrations chromosomiques pour certains e-liquides. Les tests de survie cellulaire et les évaluations des dommages à l'ADN ont également fourni des résultats positifs, avec la présence de dommages cellulaires et d'altérations de l'ADN associés à l'utilisation de l'e-cig.

2.4.3.2. Etudes *in vivo*

Il n'existe que très peu de données de génotoxicité *in vivo* sur les e-cigs avec seulement trois études publiées. Canistro *et al*, (2017) ont découvert que les aérosols d'e-cig augmentaient les dommages à l'ADN (cassures simple et double bien) et la formation de micronoyaux dans le sang périphérique des rats exposés pendant 4 semaines, et que l'urine collectée des animaux induisait des mutations géniques dans le test d'Ames (Canistro et al., 2017). En utilisant la méthode de marquage au ³²P, Lee *et al*, (2018) ont montré que les émissions d'e-cig induisaient des adduits à l'ADN dans les tissus pulmonaire, vésical et cardiaque des souris exposées (H.-W. Lee et al., 2018). Enfin, une étude du laboratoire IMPECS a réalisé le test des comètes, le test du micronoyau et le test de mutation du gène Pig-a après des expositions subaiguës (4 jours), subchroniques (3 mois) et chroniques (6 mois) avec une e-cig de troisième génération réglée à 2 puissances (18 et 30 W) chez des souris BALB/c. Les données ont été comparés à ceux obtenus avec une cigarette conventionnelle. Les résultats ont montré que seule l'e-cig à haute puissance et la cigarette pouvaient induire des dommages oxydatifs de l'ADN dans les poumons et le foie des souris exposées. En revanche, aucune augmentation significative des aberrations chromosomiques ou des mutations géniques n'a été constatée quel que soit le type de produit.

Ainsi, ces études *in vivo* démontrent que les e-cigs pourraient avoir un potentiel génotoxiques et/ou mutagène dans des modèles animaux exposés chroniquement. Toutefois, il est important de noter que ces résultats sont basés uniquement sur 3 études et que d'autres recherches sont nécessaires.

Tableau 2 : Résumé des études *in vitro* citées sur la génotoxicité et la mutagénicité de la cigarette électronique

Test	Dispositif	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Test des Comètes	68 e-liquide (33 marques) Nicotine (1 à 8 mg)	Lymphoblastoïde humain TK6 Cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO)	Exposition directs aux e-liquides 100 mg/ml de nicotine et e-liquide 24 h at 37 °C (+S9)	Positif	(Al-Saleh et al., 2020)
Test des Comètes	E-cigarette pen (5,5W) E-cigarette (40W)	A549	Exposition aux aérosols 30 bouffées d'un volume de 60 ml généré en 3s, toute les 20s(60 ml, 3s,20s)	Positif	(Khalil et al., 2021)
Test des Comètes	Cigarette 3R4F Joyetech eGo ONE (0,5 Ω) 11 e-liquides avec/sans nicotine (12 mg/ml) PG/VG 70%/30%	MOE1A (cellules épithéliales buccales) MOE1B (cellules épithéliales buccales) MSK-LEUK1 (lésion de leucoplasie dysplasique adjacente à un carcinome épidermoïde de la langue)	Exposition aux extraits des aérosols Cigarette : 100, 200, 300 et 400mg TPM/m ³ E-cig : 150, 250, 350 et 450mg TPM/m ³ (52 ml, 2.6 s,18 s)	Cigarette : Positif E-cig : Négatif	(Tellez et al., 2021)
Test des Comètes	E-cig brands V2 (e-liquide "Red American Tobacco", VaporFi (e-liquide "Classic Tobacco") 70% PG/30%VG avec/sans nicotine (12 mg/ml)	HaCaT, UMSCC10B HN30	Exposition aux extraits des aérosols de 48 heures à huit semaines.	Positif	(Yu et al., 2016)
Test d'Ames	Cigarette (3R4F, 1R5F, Malboro gold) E-cig (Classic Tobacco and Magnificent Menthol avec/sans nicotine) Smokeless tobacco (SLT) Nicotine replacement therapy (NRT)	S. typhimurium TA98 et TA100 avec/sans S9	Exposition aux extraits des aérosols Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) Cigarette : 0 – 0,5 mg/ml WTPM E-cig : 0–48 mg/ml (PBS) SLT/NRT : 0–3.2 mg/ml (PBS)	Négatif	(Misra et al., 2014)
Test d'Ames (OCDE471)	E-cig (pod, resistance 1.3 Ω) 3R4F	S. typhimurium TA98 et TA100 avec/sans S9	Exposition aux aérosols E-cig : 0 à 300 bouffées Profil CORESTA No.81 (55 ml, 3s, 30s) Cigarette : 1 à 5 cigarettes HCl (55 ml, 2s, 30s)	E-cig : Négatif Cigarette : Positif	(Rudd et al., 2020)
Test d'Ames (OCDE471)	blu GO™ (résistance, 3.05 Ω) blu PLUS+™ (résistance 3.5 Ω) E-liquide (Magnificent Menthol 2,4%, Base liquid 2.4%) 3R4F	S. typhimurium TA98, TA100, TA102, TA1535 et TA1537	Exposition aux aérosols E-cig : Profil CORESTA No.81 (55ml, 3s, 30s) 60 à 300 bouffées 3R4F : Profil HCl (55ml, 2s, 30s) 1 à 5 cigarettes (10 à 50 bouffées) Exposition directe aux e-liquides e-liquide : 1 à 5 mg/plaque	E-cig : Négatif Cigarette : Positif	(Wieczorek et al., 2020)
Test du micronoyau	68 e-liquide (33 marques) Nicotine (1 à 8 mg)	Lymphoblastoïde humain TK6 Cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO)	Exposition directe aux e-liquides 100 mg/ml de nicotine et e-liquide 24 h at 37 °C (+S9)	Positif	(Al-Saleh et al., 2020)
Test du micronoyau	Cigarette (3R4F, 1R5F, Malboro gold) E-cig (Classic Tobacco and Magnificent Menthol avec/sans nicotine) Smokeless tobacco (SLT) Nicotine replacement therapy (NRT)	A549	Exposition aux extraits des aérosols Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) Cigarette : 0 – 0,5 mg/ml WTPM E-cig : 0 – 20 mg/ml (PBS) SLT/NRT : 0 – 27 mg/ml (PBS)	Cigarette : Positif E-cig : Négatif SLT et NRT : Négatif	(Misra et al., 2014)

Test du micronoyau (OCDE 487)	E-cig (pod, resistance 1.3 Ω) 3R4F	Fibroblastes pulmonaires de hamster chinois V79	Exposition aux aérosols E-cig : 0 à 100 bouffées (+S9) CORESTA No.81 (55 ml, 3s, 30s) Cigarette : 1 à 5 cigarettes (dilution 1/6 air) (+S9) Profil HCl (55 ml, 2s, 30s)	Cigarette : Positif E-cig : Négatif	(Rudd et al., 2020)
Test du micronoyau	Cigarette 3R4F Joyetech eGo ONE (0,5 Ω) 11 e-liquides avec/sans nicotine (12 mg/ml) PG/VG 70%/30%	MOE1A (cellules épithéliales buccales) MOE1B (cellules épithéliales buccales) MSK-LEUK1 (lésion de leucoplasie dysplasique adjacente à un carcinome épidermoïde de la langue)	Exposition aux extraits des aérosols 3R4F : 100, 200, 300 et 400mg TPM/m ³ E-cig : 150, 250, 350 et 450mg TPM/m ³ (52 ml, 2.6 s, 18 s)	Cigarette : Positif E-cig : Positif avec plusieurs e-liquides	(Tellez et al., 2021)
Test du micronoyau (OCDE 487)	Cigarette 3R4F THP E-cig E-liquide	Fibroblastes pulmonaires de hamster chinois V79	Exposition aux extraits des aérosols 3R4F : 60 – 160 µg/ml de TPM Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) E-cig et THP : 300 – 500 µg/ml de TPM E-cig : Profil CORESTA No.81 (55 ml, 2s, 30s) THP : Profil HCl modifié (ventilation non bloquée) E-liquide : 300 – 500 µg/ml 3 + 21 h (+/-S9) 24 + 24 h (-S9)	Cigarette : Positif HTP : Négatif E-cig : Négatif	(Thorne et al., 2019a)
Test du micronoyau (OCDE 487)	blu GO™ (résistance, 3.05 Ω) blu PLUS+™ (résistance 3.5 Ω) E-liquide (Magnificent Menthol 2,4%, Base liquid 2.4%) Cigarette 3R4F	E-liquide : Lymphoblastoïde humain Suspension de cellules TK6 E-cig et cigarette : Fibroblastes pulmonaires de hamster chinois V79	Exposition aux extraits des aérosols E-Liquide : 1,25 – 5 mg/ml pendant 42 ± 4 h E-cig : Profil CORESTA No.81 (55ml, 3s, 30s) 0 – 100 bouffées Cigarette : HCl (55ml, 2s, 30s) 12 bouffées (dilution 1/4 et 1/5)	Cigarette : Positif E-cig et e-liquide : Négatif	(Wieczorek et al., 2020)
Test de survie cellulaire (Clonogénique)	E-cig brands V2 (e-liquide "Red American Tobacco", VaporFi (e-liquide "Classic Tobacco") 70% PG/30%VG avec/sans nicotine (12 mg/ml)	Kératinocytes épidermiques humains HaCaT), Cellules humaines de carcinome épidermoïde d'un ganglion lymphatique métastatique (UMSCC10B) Cellules humaines de tumeur du larynx HN30	Exposition aux extraits des aérosols de 48 heures à huit semaines.	Positif (Réduction de la survie cellulaire)	(Yu et al., 2016)
γ-H2AX	E-cig brands V2 (e-liquide "Red American Tobacco", VaporFi (e-liquide "Classic Tobacco") 70% PG/30%VG avec/sans nicotine (12 mg/ml)	Kératinocytes épidermiques humains HaCaT), Cellules humaines de carcinome épidermoïde d'un ganglion lymphatique métastatique (UMSCC10B) Cellules humaines de tumeur du larynx HN30	Exposition aux extraits des aérosols de 48 heures à huit semaines.	Positif	(Yu et al., 2016)
q-PADDA	Cigarette Malboro 100s NJoy (OneJoy) Traditional Flavor, PG/VG 50:50 (0-12-18 mg/ml de nicotine) eGo-T (OKC Vapes) Desert Sands Flavor, PG/VG 50:50, 6 W (0-12-18 mg/ml de nicotine)	Cellules bronchiques épithéliales humaines normales (Nuli1) Cellules kératinocytes de la muqueuse buccale dysplasique précancéreuse humaine (POE9n) Carcinome épidermoïde oral humain (UM-SCC-1)	Exposition aux extraits des aérosols Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) Cigarette : 10 bouffées/ 5 l (= 1 cigarette) E-cig : Exposition aiguë : 1h (1, 10 ou 100 bouffées/5 l) Exposition « chronique » : 10 bouffées/5 l /jour pendant 2 semaines	Cigarette : Positif E-cig : Positif Cigarette >>> E-cig	(Ganapathy et al., 2017)

8-oxodG	Cigarette Malboro 100s NJoy (OneJoy) Traditional Flavor, PG/VG 50:50 (0-12-18 mg/ml de nicotine) eGo-T (OKC Vapes) Desert Sands Flavor, PG/VG 50:50, 6 W (0-12-18 mg/ml de nicotine)	Cellules bronchiques épithéliales humaines normales (Nul1) Cellules kératinocytes de la muqueuse buccale dysplasique précancéreuse humaine (POE9n) Carcinome épidermoïde oral humain (UM-SCC-1)	Exposition aux extraits des aérosols Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) Cigarette : 10 bouffées/ 5 l (= 1 cigarette) E-cig : Exposition aiguë : 1h (1, 10 ou 100 bouffées/5 l) Exposition « chronique » : 10 bouffées/5 l /jour pendant 2 semaines	Cigarette : Positif E-cig : Positif	(Ganapathy et al., 2017)
Test ToxTracker (DNA damage, P53...)	Cigarette 1R6F E-cig (1.5 ml; 1.3 Ω coil resistance) E-liquides (0 ou 1,6% sel de nicotine) E-liquide (PG/VG)	Cellules mES de C57/Bl6 B4418 type sauvage	Exposition aux extraits des aérosols 0 - 10% pour l'aérosol e-cig bPBS et 1R6F-TPM/bPBS 0 - 1% pour les e-liquides purs	Cigarette : Positif E-cig : Négatif	(Czekala et al., 2021)

Tableau 3 : Résumé des études *in vivo* citées sur la génotoxicité et la mutagénicité de la cigarette électronique

Test	Dispositif	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Test des Comètes (<i>in vivo</i>)	Cigarette 3R4F Modbow 18W et 30W (0,5 Ω) E-liquide tabac blond 16 mg/ml	Souris Balbc (poumon et foie)	Exposition « Nose-only » Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) Pendant 4 jour ; 3 mois et 6 mois 1h/jour 5j/semaine	Cigarette : Positif E-cig : Positif avec hOGG1 à la plus forte puissance	(Platel et al., 2022)
Test du micronoyau (<i>in vivo</i>)				Cigarette : Négatif E-cig : Négatif	
Pig-a gene mutation assay (<i>in vivo</i>)				Cigarette : Négatif E-cig : Négatif	
Test des Comètes (<i>in vivo</i>)	Cigarette électronique 15 W (2 Ω) E-liquide arôme fruit rouge à 18 mg/ml de nicotine	Rats mâles Sprague Dawley (Leucocyte dans le sang)	Exposition corps entier 5 jours/semaine consécutifs et pendant 4 semaines consécutives. Les animaux ont été exposés afin de consommer 1 mL/jour de e-liquide contenant 18 mg/mL de nicotine. Un cycle de traitement consistait en une bouffée de 17 s (6 s allumée, 5 s éteinte, 6 s allumée) suivie d'un arrêt de 20 minutes.	E-cigs : Positif	(Canistro et al., 2017)
Test du micronoyau (<i>in vivo</i>)		Rats mâles Sprague Dawley (réticulocytes dans le sang)		E-cig : Positif	
Test d'Ames (<i>in vivo</i>)		Rats mâles Sprague Dawley (Urine)		E-cig : Positif	
Marquage au ³² P des adduits de l'ADN	Cigarette électronique NJOY avec un e-liquide à 10 mg/ml de nicotine PG/VG (50/50) (~1,96 A à 4,2 V)	Souris males FVBN (tissus pulmonaires, vésicaux et cardiaques)	Exposition aux aérosols (35 ml, 4s, 30s) 3 h/j, 5 j/semaine, pendant 12 semaines	E-cig : Positif	(H.-W. Lee et al., 2018)

2.4.4. Etudes des altérations épigénétiques

Le processus de développement du cancer est complexe, impliquant une série d'altérations génétiques mais également des mécanismes épigénétiques, tels que la méthylation de l'ADN, des modifications post-traductionnelles des histones, et des altérations dans l'expression d'ARN non codants, y compris les microARN.

Une synthèse de ces travaux *in vitro*, *in vivo* et chez l'Homme est présentée dans le Tableau 4, Tableau 5 et Tableau 6

2.4.4.1. Etudes *in vitro*

Une étude de l'industrie du tabac a montré que l'analyse d'expression des microARN n'a significativement modifié qu'aucun des microARN suite à une exposition aux aérosols d'e-cig dans des cultures buccales et des cellules des petites voies respiratoires à l'exception d'un microARN (miR-320b). En revanche, des altérations significatives de nombreux microARN ont été détectées suite à une exposition à la cigarette (Iskandar et al., 2019).

Des chercheurs indépendants ont mené une étude sur des fibroblastes du ligament parodontal humain. Ces cellules cultivées à l'IAL ont été exposées à des aérosols d'e-cig. L'e-cig entraînait une diminution des niveaux de l'enzyme Histone désacétylase 2 (HDAC2) dans les cellules épithéliales gingivales humaines. Cette enzyme est responsable de l'élimination de groupement acétyle des résidus de lysine au niveau de la région N-terminale des histones, entraînant la diminution de l'expression génique au niveau des zones où elle agit. De plus, cette exposition provoquait des réponses inflammatoires et pro-senescence (Sundar et al., 2016). Dans une autre étude, des cellules épithéliales bronchiques humaines primaires ont été soumises à différentes expositions pendant 48 heures. Cela incluait le traitement avec du e-liquide, de l'extrait d'aérosol d'e-cig (à une concentration de 2%), ainsi que du condensat de fumée de cigarette. Cette étude a porté sur les ARN non codants et a révélé que l'exposition à l'aérosol d'e-cig pouvait perturber 125 microARN. De plus, cette exposition induisait l'expression de gènes liés à la réponse au stress oxydatif (Solleti et al., 2017).

En conclusion, les résultats de l'étude de l'industrie du tabac suggèrent que l'exposition aux aérosols de cigarette électronique a peu modifié l'expression des microARN par rapport à la cigarette, où de nombreuses altérations significatives ont été détectées. Cependant, des recherches indépendantes ont révélé que l'exposition à l'aérosol d'e-cig provoque des réductions des niveaux de l'enzyme HDAC2 et a perturbé la régulation de 125 microARNs, suggérant un impact épigénétique de l'e-cig dans ces études *in vitro*.

2.4.4.2. Etudes *in vivo*

Deux études ont exposé des souris Balb/C à la cigarette électronique avec et sans nicotine avant l'accouplement, pendant la gestation et pendant l'allaitement. La progéniture a subi des tests épigénétiques

au niveau des tissus cérébraux et pulmonaires à 1 jour, 20 jours et 13 semaines après la naissance. La méthylation globale de l'ADN a augmenté dans le cerveau de la progéniture à 1 et 20 jours après la naissance (Nguyen et al., 2018). Cela s'est aussi accompagné d'une augmentation de la méthylation globale de l'ADN dans les poumons (Chen et al., 2018) pouvant entraîner la diminution de l'expression de gènes suppresseur de tumeur. Ainsi, avec un modèle murin, l'exposition maternelle aux aérosols d'e-cig a entraîné des changements épigénétiques chez la progéniture pouvant participer au processus de cancérogenèse.

2.4.4.3. Etudes chez l'Homme

Une étude s'est intéressée à l'association entre le vapotage et les changements épigénétiques. Ils ont évalué les niveaux de méthylation de l'ADN dans les niveaux de Long Interspersed Nucleotide Element 1 (LINE-1) et de l'hydroxyméthylation de l'ADN (5-hmC) dans le sang (leucocytes). Une diminution significative de la méthylation a été observée dans les éléments répétés de LINE-1 et de la 5-hmC avec la cigarette. Avec la cigarette électronique une diminution de la méthylation globale de l'ADN a été observée, pouvant mener à une augmentation de l'expression d'oncogènes. Ces résultats montrent que le vapotage peut avoir des effets épigénétiques, au même titre que la cigarette (Caliri et al., 2020).

Une étude a observé que les exosomes plasmatiques des fumeurs de cigarettes, des fumeurs de pipe à eau, des utilisateurs d'e-cig et des « doubles fumeurs » (utilisateurs simultanés de cigarette et de pipe à eau) avait une expression différentielle commune des microARN qui pourrait servir à distinguer les sujets fumeurs et vapoteurs des personnes non exposées. Pour l'e-cig, les auteurs ont rapporté 13 microARN spécifiquement induits et 4 microARN spécifiquement inhibés (Singh et al., 2020). De plus, une autre étude a comparé les profils des longs ARN non codants (ARNlnc) dans les exosomes plasmatiques chez les non-fumeurs, les fumeurs de cigarettes, les utilisateurs d'e-cig, les fumeurs de pipe à eau et les « doubles fumeurs ». La présence d'ARNlnc a été signalée dans les exosomes, ils sont impliqués dans la régulation de la communication intercellulaire dans les pathologies pulmonaires, notamment le cancer du poumon, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme et la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Les auteurs ont trouvé des altérations d'ARNlnc chez les sujets exposés à la e-cig, à la fumée de cigarette, à la fumée de pipe à eau et aux deux fumées. Pour l'e-cig, 13 ARNlnc ont été rapportés comme spécifiquement altérés. Les analyses d'enrichissement génique des ARNlnc exprimés de manière différentielle ont démontré un enrichissement en ARNlnc impliqués dans des processus biologiques cruciaux, notamment le métabolisme des stéroïdes, la différenciation et la prolifération cellulaires (Kaur et al., 2020). Ainsi, les profils d'ARNlnc et de microARN des exosomes du plasma pourraient servir de biomarqueurs pertinents pour les maladies pulmonaires liées au tabac et au vapotage.

Tableau 4 : Résumé des études *in vitro* citées sur les altérations épigénétiques de la cigarette électronique

Test	Dispositif	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
HDAC2	Cigarette électronique BLU® E-liquide tabac à 16 mg de nicotine ou arôme magnifique menthol contenant zéro ou 13 à 16 mg de nicotine	Clonetics™ Fibroblaste du ligament parodontal humain	2 bouffées de d'aérosol toutes les minutes, chaque bouffée durant de 4 à 5 secondes, suivie d'une pause de 25 secondes. Durées d'exposition : 5, 10 et 15 minutes	E-cig : Diminution	(Sundar et al., 2016)
MicroARN	Cigarette 3R4F E-cig MESH E-liquide MESH tabac classique (1,8% de nicotine)	Cellules épithélial buccal humain organotypique EpiOral™ Cellules épithélial des petites voies respiratoires SmallAir™	Cigarette : Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) - 112 bouffées E-cig : Profil CORESTA (55 ml, 3s, 30s) – 112 bouffées	E-cig : 1 microARN (mir-320b) dérégulé	(Iskandar et al., 2019)
MicroARN	E-cig : Nautilus Mini avec un atomiseur BVC de 1,8 ohm, Condensat de fumée de cigarette E-liquide : 0 % ou 2,4 % p/v de nicotine	Cellules épithéliales bronchiques humaines primaires (NHBE)	Expositions pendant 48 heures Au liquide d'e-cig Extrait d'aérosol d'e-cig (concentration de 2%), Condensat de fumée de cigarette.	E-cig : 125 microARNs dérégulés	(Solleti et al., 2017)

Tableau 5 : Résumé des études *in vivo* citées sur les altérations épigénétiques de la cigarette électronique

Test	Dispositif	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Méthylation globale	Cigarette électronique KangerTech NEBOX Avec et sans nicotine (18mg/ml)(50 % PG/VG)	Progéniture de femelle Balb/C (Cerveau)	Exposition aux aérosols 2 × 15 min d'exposition avec un intervalle de lavage sans aérosol de 5 min pendant 6 semaines avant la grossesse, pendant la grossesse et l'allaitement	E-cig : Augmentation	(Nguyen et al., 2018)
Méthylation globale	Cigarette électronique KangerTech NEBOX Avec et sans nicotine (18mg/ml)(50 % PG/VG)	Progéniture de femelle Balb/C (Poumon)	Exposition aux aérosols 2 × 15 min d'exposition avec un intervalle de lavage sans aérosol de 5 min pendant 6 semaines avant la grossesse, pendant la grossesse et l'allaitement	E-cig : Augmentation	(Chen et al., 2018)

Tableau 6 : Résumé des études chez l'Homme citées sur les altérations épigénétiques de la cigarette électronique

Test	Dispositif	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Méthylation globale	15 fumeurs, 15 vapoteurs et 15 non-fumeur et non vapoteurs	Sang périphérique	Les vapoteurs : utilise actuellement des cigarettes électroniques au moins 3 fois par semaine pendant au moins 6 mois, et aucune utilisation de cigarettes conventionnelles ou tout autre produit du tabac au cours des 6 derniers mois. Les fumeurs : fume actuellement des cigarettes de tabac au moins 3 fois par semaine pendant au moins 1 an, et n'avoir utilisé aucun autre produit du tabac, y compris les e-cigs, au cours des 6 derniers mois. Les témoins : utilise aucun produit du tabac (e-cig ou combustible) plus de 5 fois dans leur vie, sans utilisation au cours des 6 derniers mois.	Diminution significative de la méthylation dans les éléments répétés de LINE-1 et de la 5-hmC avec la cigarette et la cigarette électronique	(Caliri et al., 2020)
MicroARN	7 vapoteurs et 8 non-fumeur	Plasma	Les sujets témoins : n'avoir jamais utilisé de produits du tabac, Les vapoteurs : Ne pas avoir utilisé d'autres formes de produits du tabac ou d'appareils à fumer	13 microARN régulés positivement et 4 régulés négativement étaient significatifs entre les groupes.	(Singh et al., 2020)
Long ARN non codant	6 vapoteurs et 6 non-fumeur	Plasma	Les sujets témoins : n'avoir jamais utilisé de produits du tabac, Les vapoteurs : Ne pas avoir utilisé d'autres formes de produits du tabac ou d'appareils à fumer	13 ARNInc étaient spécifiquement altéré pour l'e-cig	(Kaur et al., 2020)

2.4.5. Etudes des effets transcriptomiques et analyses fonctionnelles

L'analyse transcriptomique joue un rôle essentiel dans la compréhension des mécanismes biologiques, en permettant d'explorer les niveaux d'expression génique de l'ensemble du génome. L'analyse fonctionnelle de ces données permet d'attribuer des fonctions biologiques aux transcrits modulés et de comprendre comment ces dérégulations contribuent aux processus cellulaires, moléculaires et aux pathologies.

Une synthèse de ces travaux *in vitro*, *in vivo* et chez l'Homme est présentée dans le Tableau 7, Tableau 8 et Tableau 9.

2.4.5.1. Etudes *in vitro*

Des études transcriptomiques sur des lignées cellulaires BEAS-2B en mode immergé ou en IAL (Anthérieu et al., 2017; L. Wang et al., 2021) ont montré un plus grand nombre de transcrits dérégulés avec la cigarette qu'avec l'e-cig. Alors qu'avec la cigarette conventionnelle, l'analyse fonctionnelle a montré des dérégulations de voies impliquées dans le stress oxydatif et la mort cellulaire ainsi qu'un enrichissement dans les catégories du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN, du cancer et des voies liées au métabolisme, l'e-cig (de deuxième génération) n'a montré que de très discrètes modulations (Anthérieu et al., 2017) ou seulement une voie significative pour la régulation des ribosomes (L. Wang et al., 2021). Sur des cultures primaires bronchiques et nasales cultivées en 3D, il a aussi été rapporté que l'e-cig altérait significativement moins l'expression génique par rapport à la fumée de cigarette (Banerjee et al., 2017; Haswell et al., 2017; Moses et al., 2017; Rayner et al., 2022; Shen et al., 2016). Les cellules nasales primaires MucilAir™ (Epithelix) ont été directement exposées à l'aérosol d'e-cig et à la fumée de cigarette de référence 3R4F, révélant que l'aérosol d'e-cig avait un effet réduit sur les voies et fonctions biologiques (Banerjee et al., 2017; Haswell et al., 2017). En effet, l'exposition à la cigarette a perturbé un grand nombre de voies (métabolisme des xénobiotiques, réponse au stress oxydatif, cancer du poumon, inflammation et fibrose...) alors que pour l'e-cig, ces perturbations n'étaient pas présentes (Banerjee et al., 2017) ou avec un indice de confiance bien plus faible qu'avec la cigarette conventionnelle (processus métaboliques/biosynthétiques, apoptose, hypoxie) (Haswell et al., 2017). Rayner *et al*, (2022) ont aussi montré qu'une exposition aiguë aux préparations de cigarettes régulaient de manière significative et différentielle de nombreux gènes et voies canoniques, alors que les préparations d'e-cig, contenant la même concentration de nicotine, avaient très peu d'effet sur l'expression génique dans des cultures primaires épithéliales bronchiques humaines (NHBE) entièrement différenciées (Rayner et al., 2022). Shen *et al*, (2016) ainsi que Moses *et al*, (2017) ont montré que l'exposition à l'e-cig pouvait moduler des voies identiques à celles dérégulées par la cigarette (hypoxie, régulation du cycle cellulaire, réponse aux substances organiques, inflammation et réponse immunitaire (Shen et al., 2016), métabolisme des xénobiotiques, stress oxydatif, dommages à l'ADN et apoptose (Moses et al., 2017). L'e-cig module aussi spécifiquement d'autres voies : biosynthèse cellulaire des glycérophospholipides (Shen et al., 2016), diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'assemblage et le mouvement des cils (Moses et

al., 2017) . De plus, les effets étaient plus prononcés avec les e-cigs contenant de la nicotine que ceux sans nicotine (Moses et al., 2017). Ainsi, l'ensemble de ces études transcriptomiques suggère que la cigarette conventionnelle a un impact plus important sur la régulation des transcrits que la cigarette électronique avec des effets réduits sur les voies moléculaires et les fonctions biologiques.

2.4.5.2. Etudes *in vivo*

Une étude a réalisé 3 semaines d'exposition « Nose-only » à la cigarette électronique et à la cigarette classique sur des souris femelles C57BL/6. A quantité similaire de nicotine, plus de gènes ont été dérégulés par la cigarette conventionnelle que par l'e-cig. De plus, l'analyse fonctionnelle de ces gènes montrait 94% de perturbations en moins avec l'e-cig par rapport à la cigarette (K. M. Lee et al., 2018). Une autre étude a évalué l'impact transcriptomique des principaux composants de l'e-cig en suivant la ligne directrice OCDE TG413. Ils ont exposé à de l'air filtré, à une solution saline nébulisée ou à trois concentrations de mélanges PG/VG, avec et sans nicotine pendant 90 jours des rats Sprague-Dawley pendant 6h/j (nose-only) 5j par semaine. Le PG/VG n'a montré que des effets biologiques très limités sans aucun signe de toxicité alors que l'ajout de nicotine aux aérosols de PG/VG a affecté plusieurs ensembles biologiques. Les gènes induits causaient des changements dans le métabolisme des xénobiotiques alors que les gènes inhibés étaient liés aux lymphocytes T (Phillips et al., 2017). Ces résultats suggèrent que la cigarette électronique pourrait avoir moins d'impact au niveau transcriptomique que la cigarette conventionnelle, avec une régulation réduite de gènes et une perturbation fonctionnelle moindre, malgré un potentiel effet sur le métabolisme et sur la réponse immunitaire.

2.4.5.3. Etudes chez l'Homme

Les données sur l'impact transcriptomique de la cigarette électronique chez l'homme sont encore contradictoires. L'étude de Song *et al*, (2020) sur des sujets non-fumeurs et en bonne santé utilisant l'e-cig pendant quatre semaines n'a pas révélé de changements significatifs dans l'expression des gènes sur cellules épithéliales bronchiques (Song et al., 2020). En revanche, l'étude de Tommasi *et al*, (2019) a révélé que les fumeurs présentaient près de 50% de transcrits significativement modulés de plus que les utilisateurs d'e-cig sur cellules buccales, avec des voies moléculaires principalement associées au cancer. Chez les fumeurs, les dérégulations étaient notamment liées à la voie de signalisation des intégrines, tandis que chez les utilisateurs d'e-cig, c'était la voie Wnt/Ca qui était modulée (Tommasi et al., 2019). Dans l'étude de Hamad *et al*, (2021), les échantillons buccaux de vapoteur ont montré une augmentation significative de cinq gènes liés aux dommages à l'ADN, à la réparation de l'ADN, au cycle cellulaire et au cancer, tandis que l'expression d'un seul gène dans les échantillons sanguins était diminuée (Hamad et al., 2021). De plus, une étude a rapporté qu'aussi bien la cigarette conventionnelle que l'e-cig ont entraîné une diminution de l'expression des gènes liés au système immunitaire. Ces résultats suggèrent que le vapotage peut entraîner une altération

de l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaires, ce qui soulève des préoccupations quant à son impact sur la fonction immunitaire de l'épithélium respiratoire (Martin et al., 2016).

En résumé, certaines études ont mis en évidence des effets négatifs potentiels de l'utilisation de la cigarette électronique sur le transcriptome. Ces effets comprennent une augmentation de la voie Wnt/Ca et de gène impliqués dans la réponse immunitaire, les dommages à l'ADN, à la réparation de l'ADN, au cycle cellulaire et au cancer.

Tableau 7 : Résumé des études *in vitro* citées sur les modifications transcriptomiques induites par la cigarette électronique

Dispositif	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Cigarette 3R4F E-cig (Lounge 2.8 Ω, 3.6 V) avec e-liquides (sans arôme, tabac blond, chlorophylle +/- 16 mg/ml de nicotine)	Cellules BEAS-2B	Exposition aux aérosols Cigarette: Profil ISO3308:2012 (35 ml, 2 s, 60 s), E-cig: Profil CORESTA (55 mL, 3 s, 30 s) Exposition de 8 ou 48 min et répété (6 x 8 min avec 1 expo/heure) dilué 1 l/min	+ gènes dérégulés avec la CS qu'avec l'e-cig Analyse fonctionnelle : Cigarette : les gènes impliqués dans le stress oxydatif et la mort cellulaire E-cig : provoquaient une modulation très discrète	(Anthérieu et al., 2017)
Cigarette 3R4F E-cig Vype ePen (4V) avec e-liquide ("Blended Tobacco" 18 mg/ml de nicotine)	Cellules nasales MucilAir® de 6 donneurs	Exposition aux aérosols Profil HCl (55 ml, 2 s, 30 s) dilué 1/20 4 x 5 min d'exposition avec 30 min de recouvrement arrêté 24 h ou 48 h après exposition	Cigarette : 9 et 123 gènes différentiellement exprimés (FC > 1,5 - pFDR < 0,05) + perturbations du métabolisme xénobiotique, de la réponse au stress oxydatif et des voies d'inflammation E-cig : 0 gène différentiellement exprimés (29 avec FDR = 0,5) + pas de voie dérégulées (trop petit nombre de transcrit)	(Banerjee et al., 2017)
Cigarette 3R4F E-cig Vype ePen avec e-liquide ("Blended Tobacco" 18 mg/ml de nicotine)	Cellules nasales Mucil Air (3 donneurs non-fumeur)	Exposition aux aérosols Cigarette : Profil HCl (55 ml, 2 s, 30 s) dilution 1/30 pendant 1 h E-cig : Profil CORESTA No.81 (55 ml, 3 s, 30 s) dilution 1/3 et 1/7 pendant 1 h Arrêt à 24h (+ 48h pour RNAseq)	+ de gènes dérégulés avec la CS L'analyse de l'enrichissement : Cigarette : gènes associés au cancer du poumon, à l'inflammation et à la fibrose E-cig : Les processus métaboliques/biosynthétiques, la membrane extracellulaire, l'apoptose et l'hypoxie ont été identifiés pour les expositions à l'e-cig, mais avec un score de confiance plus faible qu'avec la CS	(Haswell et al., 2017)
Cigarette 3R4F E-cig Blu-brand (mentholés ou aromatisés au tabac et avec et sans nicotine (24 mg par cartouche)	Cellules HBEC (cultures primaire)	Exposition aux aérosols Dilution 0,5 L/min Cigarette : Profil ISO (55 ml, 2 s, 27 s) 6 cigarettes (48 bouffées) E-cig : (80 ml sur 3 s, 30s) 400, 200, 100 et 50 bouffées Fixées dans RNALater (Ambion) et stockées congelées à 80 ° C	L'analyse de l'enrichissement : Cigarette ou e-cig induisait des modifications de l'expression génique spécifiquement liées au métabolisme xénobiotique, au stress oxydatif, aux dommages à l'ADN et à l'apoptose. Activation des voies de stress xénobiotique et oxydatif est nettement inférieure à celle observée avec une exposition à forte dose d'e-cig (400 bouffées) qu'avec une exposition à faible dose de cigarette (6 cigarettes) E-cig : diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'assemblage et le mouvement des cils. Effets plus prononcés dans les e-cig contenant de la nicotine que ceux sans nicotine.	(Moses et al., 2017)

<p>Cigarette 3R4F E-cig : un réservoir rechargeable de 10 watts avec une résistance de 1,5 Ω avec un liquide saveur tabac (1,8 % de nicotine)</p>	<p>Cellules NHBE (4 donneurs non-fumeur)</p>	<p>Cigarette : Profil ISO (35ml, 2 s, 60s) 3,6, 7,0 et 10,0 µg/mL Eq-Nic. E-cig : (55ml, 5s, 30s) 7,0, 14,0 et 28,0 µg/mL Eq-Nic. 4h et 24h d'exposition</p>	<p>+ de gènes dérégulés avec la CS Cigarette : Les principales voies canoniques affectées étaient la régulation à la hausse de la dégradation de la nicotine et les voies de réponse au stress oxydatif médiées par NRF2 E-cig : Pas de voie significative</p>	<p>(Rayner et al., 2022)</p>
<p>Cigarette 1R5F E-cig : MAGMA brand (0 mg/ml ou 16 mg/ml)</p>	<p>Cellules NHBE (2 donneurs non-fumeur)</p>	<p>Exposition aux aérosols Profil ISO (35 ml, 2s, 1 min) (mélange avec air ambiant) 1h d'exposition Arrêt : Directement (1h), 4h et 24 h après l'expo</p>	<p>Commune : Voie de la réponse à l'hypoxie, régulation du cycle cellulaire, réponse aux substances organique, réponse inflammatoire et réponses immunitaire. Cigarette : régulation positive du métabolisme des composés azotés et la régulation positive de la biosynthèse des macromolécules E-cig : les voies métaboliques des phospholipides et des triacylglycérols d'acides gras Nicotine dans l'e-vapeur provoque des altérations de la fonction du cytochrome P450, du métabolisme des rétinoïdes et du catabolisme de la nicotine.</p>	<p>(Shen et al., 2016)</p>
<p>Cigarette 2R4F E-cig "RELX Infinity-Menthol" (40 mg/ml de nicotine)</p>	<p>Cellules BEAS-2B</p>	<p>Exposition aux extraits des aérosols Profil ISO (55 ml, 2 s, 27 s) 0–32 µg/ml de CS et E-cig pendant 24 h</p>	<p>+ de gènes dérégulés avec la CS L'analyse de l'enrichissement : Cigarette : Principalement enrichis dans la catégorie du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN, du cancer et des voies liées au métabolisme. E-cig : une seule voie significativement enrichie dans la catégorie de régulation du ribosome</p>	<p>(L. Wang et al., 2021)</p>

Tableau 8 : Résumé des études *in vivo* citées sur les modifications transcriptomiques induites par la cigarette électronique

Dispositif	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
<p>Cigarette 3R4F MarkTenV (4% de nicotine)</p>	<p>Souris femelles C57BL/6</p>	<p>Exposition aux aérosols Profil CORESTA No 81 (55 ml, 3 s, 30s) (Nose only) 3 semaines d'exposition 4 heures/jour, 5j par semaine à 41 mg de nicotine /L</p>	<p>+ de gènes dérégulés avec la CS Analyse fonctionnelle : Perturbations des voies était de 94 % inférieure à celle du groupe 3R4F.</p>	<p>(K. M. Lee et al., 2018)</p>

Nébuliseurs	Rats Sprague-Dawley	Exposition aux aérosols (OECD TG413) 13 semaines d'exposition 5j par semaine, 6 h par jour (nose-only) Exposition à 3 doses de PG/VG avec et sans nicotine (0,023mg/L) et une solution saline nébulisée	Plusieurs ensembles biologiques affectés par l'ajout de nicotine à l'aérosol : Gènes régulés à la hausse reflétaient des changements dans le métabolisme des xénobiotiques (ex : « Xénobiotiques » et « Métabolisme des xénobiotiques par le P450 »). Les enzymes augmentées comprenaient Cyp1a1 et Fmo3. Gènes régulés à la baisse liés aux lymphocytes T (« voie TCR-activation » et « voie Thelper »).	(Phillips et al., 2017)
-------------	---------------------	---	---	-------------------------

Tableau 9 : Résumé des études chez l'Homme citées sur les modifications transcriptomiques induites par la cigarette électronique

Population	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Age : > 18,5 ans Non-fumeur ou ex-fumeur qui utilise e-cig depuis + de 2 mois et au moins 8 fois par jour Exclu si : problèmes médicaux importants, notamment des allergies respiratoires, des antécédents de maladie pulmonaire ou de l'asthme.	Echantillon buccal et de sang	Vapote 20 bouffées (bouffée de trois secondes toutes les 60 secondes, pour un total de 20 bouffées sur 20 min).	Echantillons buccaux : 5 gènes significativement (FC > 1,5 - FC < 0,66 p < 0,05) régulés à la hausse (FEN1, AIFM1, XRCC2, TREX1, TP53 ...) Echantillons de sang : 1 seul gène (MPG) significativement (p < 0,05) régulé à la baisse Analyse fonctionnelle : Impact sur l'expression de plusieurs gènes associés aux dommages à l'ADN, à la réparation de l'ADN, au cycle cellulaire et au cancer.	(Hamad et al., 2021)
Jeunes adultes de 18 à 50 ans : Non-fumeurs (groupe témoin) Les fumeurs de cigarettes actifs Des utilisateurs/vapoteurs de cigarettes électroniques actifs qui utilisaient régulièrement des e-cig depuis au moins 6 mois. Les doubles utilisateurs fumant plus de 5 cigarettes/semaine en plus d'utiliser des e-cigs ont été exclus de l'étude.	Biopsies de cellules nasales par grattage	Non-fumeurs (n = 13) Fumeurs (n = 14) Utilisateurs d'E-Cig (n = 12)	Fumer des cigarettes ou vapoter des e-cigs a entraîné une diminution de l'expression des gènes liés au système immunitaire. Tous les gènes dont l'expression était diminuée chez les fumeurs de cigarettes (n = 53) étaient également diminués chez les utilisateurs d'e-cig. Le vapotage était associé à la diminution d'un grand nombre de gènes (n = 305).	(Martin et al., 2016)

<p>Sujets, âgés de 21 à 30 ans, non-fumeurs et en bonne santé (n = 30) (avaient fumé moins de 100 cigarettes au cours de leur vie) et n'avaient pas utilisé d'e-cig ou de cigarette au cours de l'année écoulée E-cig : Innokin iTaste VV 4.0 avec e-liquides pour tank rechargeables contenant 50% de PG et 50% de VG, sans nicotine ni arômes.</p>	<p>Lavage broncho-alvéolaire (LBA) et cellules épithéliales bronchique.</p>	<p>4 semaines d'utilisation avec 20 bouffées pendant 60 minutes, au moins deux fois par jour</p>	<p>Il n'y avait pas de changements significatifs dans l'expression des gènes de l'ARNm</p>	<p>(Song et al., 2020)</p>
<p>Utilisateurs exclusifs d'e-cig (n = 42) Fumeurs de cigarettes (n = 24) Témoins non-fumeurs non-vapoteurs (n = 27).</p>	<p>Cellules Epithéliales Orales et prélèvement sanguin</p>	<p>Utilisateurs d'e-cig : vapote au moins 3 fois par semaine depuis au moins 6 mois, et aucune utilisation de cigarette combustible ou tout autre produit du tabac au cours des 6 derniers mois. Les fumeurs : fumer actuellement des cigarettes de tabac au moins 3 fois par semaine depuis au moins 1 an, et n'avoir utilisé aucun autre produit du tabac, y compris les e-cigs, au cours des 6 derniers mois. Témoins : n'avoir utilisé aucun produit du tabac (e-cig ou combustible) plus de 5 fois dans leur vie (consommation à vie : moins de 100 cigarettes ou moins de 5 séances de vapotage), sans utilisation au cours des 6 derniers mois</p>	<p>Les fumeurs avaient près de 50% plus de transcriptions exprimées de manière aberrante que les utilisateurs d'e-cig (1726 contre 1152) Voies moléculaires : Le « cancer » principale maladie associée utilisateurs d'e-cig et les fumeurs (~ 62 % contre 79 %). Voies canoniques les plus affectées : Fumeurs : voie de signalisation des intégrines E-cig : Voie Wnt/Ca</p>	<p>(Tommasi et al., 2019)</p>

3. Le tabac chauffé

Certains fumeurs ne se satisfont pas de l'e-cig comme alternative à la cigarette car ce dispositif n'utilise pas les véritables ingrédients du tabac et ne provoque pas la sensation de « hit » au niveau de la gorge, encourageant parfois à un retour à la cigarette. Les industriels du tabac ont récemment relancé le développement et la commercialisation des produits du tabac chauffé après un premier essai infructueux à la fin des années 1980 (Stapleton et al., 1998; Sutherland et al., 1993). Ces systèmes de tabac chauffé génèrent des émissions avec un goût très proche de celui des cigarettes conventionnelles tout en fournissant un taux de nicotine satisfaisant pour l'utilisateur. Parmi les fabricants de tabac chauffé, il y a Reynolds American (RAI) avec le système Eclipse, REVO et Core, Philip Morris International (PMI) avec le dispositif IQOS, British American Tobacco (BAT) avec Glo et Glo iFuse, et Japan Tobacco (JTI) avec la Ploom. Actuellement, le plus répandu est le système IQOS de Phillip Morris international. Il est actuellement disponible dans plus de 78 pays dans le monde (Philip Morris International, 2021a) et sa mise sur le marché avait débuté en 2014 en Italie et au Japon (Xiaoqiu Liu et al., 2018; Tabuchi et al., 2016).

3.1. Usage du tabac chauffé en France et dans le monde

- Dans le monde

Du fait de sa mise sur le marché récente, il existe peu de données détaillées sur l'utilisation du HTP. Cependant, certains pays ont déjà commencé à évaluer la part d'utilisateurs de HTP. La mise sur le marché de l'IQOS a débuté par le Japon et l'Italie en 2014, ces pays ont donc un recul plus important sur l'utilisation de ce dispositif. La part d'utilisateurs d'IQOS au Japon est passée de 0,3 % en janvier-février 2015 à 0,6 % en janvier-février 2016 et jusqu'à 3,6 % en janvier-février 2017 (Tabuchi et al., 2018). En 2020, l'usage actuel des HTP et de la cigarette était de 10,9 % et 25,9 % au Japon, respectivement. La marque de HTP la plus couramment utilisée était IQOS (5,7 %), suivie de Ploom TECH/Ploom TECH+ (5,4 %) et glo (2,6 %) (Odani and Tabuchi, 2022). Dans plusieurs pays, l'attrait pour le HTP est particulièrement important chez les populations jeunes. Ainsi, en 2017, alors que la proportion d'utilisateurs coréen de HTP (utilisation de HTP au cours des 30 derniers jours) était de 2,13 % de la population (Hwang et al., 2019), l'utilisation chez les jeunes adultes coréens (21-25 ans) étaient de 3,5 % (Kim et al., 2018). Dans une étude auprès de jeunes aux États-Unis, au Canada et en Angleterre, en moyenne 7% connaissaient l'IQOS (allant jusqu'à 9,1 % aux États-Unis), et 38,6% des jeunes ont exprimé leur intérêt à essayer l'IQOS (le plus élevé en Angleterre, où 41,8 % ont exprimé leur intérêt). Dans ces trois pays, la sensibilité des jeunes à essayer l'IQOS était de 25,1 %, ce qui les place en dessous des cigarettes électroniques (29,1 %), mais au-dessus de la cigarette conventionnelle (19,3 %) (Czoli et al., 2020).

Selon PMI, il y aurait actuellement 18,5 millions de fumeurs adultes qui sont passés au tabac chauffé IQOS et ont arrêté de fumer dans le monde (Philip Morris International, n.d.). Or, d'après les deux études coréennes précédemment citées, la totalité des utilisateurs de HTP (96,3% et 100%) ont une double ou triple utilisation

avec la cigarette et l'e-cig (Hwang et al., 2019; Kim et al., 2018). Cela suggère que le tabac chauffé est surtout utilisé en complément au tabagisme.

- En Europe

En Europe, d'après l'Eurobaromètre 2020 (Figure 11), 6 % des répondants ont essayé au moins une ou deux fois les produits à base de tabac chauffé. 1% des répondants sont des utilisateurs actuels de produits à base de tabac chauffé et 58% de ces répondants déclarent en consommer quotidiennement. Bien que 93% des interrogés n'ont jamais utilisé de tabac chauffé, dans huit pays de l'union européenne, au moins 10% l'ont essayé au moins une ou deux fois, les pourcentages les plus élevés étant enregistrés en République Tchèque (15%), en Lettonie (14%), ainsi qu'en Autriche, en Bulgarie et en Irlande (12% chacun). A l'opposé, moins d'une personne sur vingt avait utilisé le tabac chauffé en France (3%), en Pologne, à Malte et aux Pays-Bas (4% chacun) (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. et al., 2021).

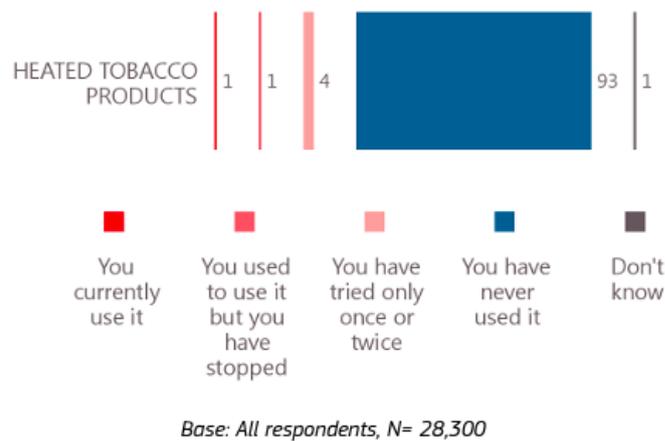


Figure 11 : Utilisation de de tabac chauffé en Europe (+UK) (Adapté de European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. et al., 2021)

En Italie, près de 3 ans après son lancement, l'utilisation d'IQOS est encore limitée dans la population italienne. Cependant, d'après Liu et al. (2019), il y aurait 739 000 Italiens (1,4% de la population italienne) qui auraient déjà essayé l'IQOS, dont 329 000 n'ayant jamais été fumeurs auparavant. De plus, 1 205 000 autres italiens adultes, dont 619 000 non-fumeurs (c'est-à-dire jamais ou ex-fumeurs) avaient l'intention d'essayer IQOS à l'avenir (Liu et al., 2019). En 2019, par comparaison, les utilisateurs actuels de cigarettes électroniques en Italie étaient de 2,1 %, alors que les utilisateurs actuels de HTP étaient de 1,1 % (Gallus et al., 2021).

L'utilisation plus importante chez les jeunes est aussi observée en Europe dans les données de l'eurobaromètre 2020. En effet, les jeunes européens âgés de 15 à 24 ans étaient nettement plus susceptibles de déclarer une utilisation (OR = 7,77 (6,56 ; 9,21) par rapport aux personnes âgées de ≥ 55 ans) (Laverty et al., 2021).

- En France

En France, en 2022, 15,5% des personnes interrogées avaient entendu parler du tabac chauffé, contre 9% en 2018 ($p < 0,001$). L'expérimentation du tabac chauffé a été déclarée par 2,6% des 18-75 ans, et 0,1% déclaraient l'utiliser actuellement, contre respectivement moins de 1% et moins de 0,1% en 2018 (évolutions non significatives) (Pasquereau et al., 2023). Pour mieux comprendre l'évolution de l'utilisation des HTP en France, examinons les données d'importation publiées par PMI (Figure 12). Entre 2017 et 2022, on note une légère augmentation des importations, atteignant environ 0,2 milliard d'unités en 2022 (une augmentation de 22,5% entre 2020 et 2021 et une hausse de 1,1% entre 2021 et 2022). Avant 2019, les importations étaient inférieures à 50 millions d'unités. Comparées à d'autres pays de l'Union Européenne, les importations de 2022 en France restent modestes : Italie : 12,3 milliards d'unités ; Pologne : 4,5 milliards d'unités ; Allemagne : 3,4 milliards d'unités ; Espagne : 0,9 milliards d'unités. Il est également intéressant de noter que, pour tous ces pays, les importations ont augmenté de 37,3% à 65,6%, entre 2021 et 2022 (Philip Morris International INC, 2022, 2023a). Enfin, les premiers chiffres publiés sur le premier quart de l'année 2023 montre une augmentation des importations avec une hausse de 23,6% des importations en France (Philip Morris International INC, 2023b). L'importation de tabac chauffé en Italie dépasse celle des autres pays européens, vraisemblablement en raison de la disponibilité de ce dispositif depuis 2014. Ces données témoignent de la croissance régulière de l'importation de tabac chauffé dans les pays européens, y compris en France, ce qui pourrait être lié à une augmentation de l'utilisation de ces dispositifs. Bien que les chiffres d'importation en France demeurent encore relativement faibles, il est probable que l'utilisation de ces produits continue de progresser dans un avenir proche.

Appendix 2

PHILIP MORRIS INTERNATIONAL INC. and Subsidiaries
Key Market Data

Market	Total Market, bio units			Years Ended December 31,									PMI Market Share, % (1)					
				Total			Cigarette			HTU			Total			HTU		
	2022	2021	% Change	2022	2021	% Change	2022	2021	% Change	2022	2021	% Change	2022	2021	PP Change	2022	2021	PP Change
Total (2)	2,626.4	2,620.5	0.2	731.1	719.9	1.6	621.9	624.9	(0.5)	109.2	95.0	14.9	27.6	27.2	0.4	4.1	3.5	0.6
European Union																		
France	32.5	34.3	(5.3)	14.0	15.2	(8.1)	13.7	15.0	(8.2)	0.2	0.2	1.1	43.6	43.9	(0.3)	0.7	0.7	—
Germany	70.3	74.1	(5.1)	28.2	28.6	(1.6)	24.8	26.3	(5.9)	3.4	2.3	47.9	40.1	38.6	1.5	4.8	3.1	1.7
Italy	72.8	70.4	3.4	40.8	38.6	5.8	28.6	29.7	(3.7)	12.3	8.9	37.7	54.1	53.0	1.1	14.6	11.5	3.1
Poland	55.7	49.3	13.0	21.7	18.4	17.6	17.1	15.3	11.8	4.5	3.1	46.6	38.9	37.3	1.6	8.2	6.3	1.9
Spain	44.6	42.7	4.5	13.6	13.2	3.2	12.7	12.6	0.7	0.9	0.5	65.6	30.0	31.1	(1.1)	1.7	1.2	0.5
Eastern Europe																		
Russia	208.9	216.8	(3.6)	64.7	68.8	(6.0)	49.3	52.5	(6.1)	15.4	16.3	(5.6)	31.1	31.7	(0.6)	7.6	7.4	0.2
Middle East & Africa																		
Egypt	93.6	93.4	0.3	21.0	19.5	8.2	20.0	19.2	4.2	1.0	0.2	+100	22.2	20.7	1.5	0.8	0.2	0.6
Turkey	117.2	125.1	(6.3)	56.1	55.7	0.7	56.1	55.7	0.7	—	—	—	47.9	44.5	3.4	—	—	—
South & Southeast Asia																		
Indonesia	309.6	296.2	4.5	86.8	82.8	4.8	86.8	82.8	4.8	—	—	—	28.0	28.0	—	—	—	—
Philippines	51.8	55.2	(6.1)	32.2	34.4	(6.3)	32.0	34.2	(6.5)	0.2	0.2	47.8	62.1	62.3	(0.2)	0.4	0.3	0.1
East Asia & Australia																		
Australia	8.9	9.7	(8.2)	3.0	3.1	(5.1)	3.0	3.1	(5.1)	—	—	—	33.4	32.3	1.1	—	—	—
Japan (2)	148.3	150.5	(1.5)	55.5	55.2	0.6	21.1	22.1	(4.6)	34.4	33.1	4.0	37.6	35.7	1.9	23.6	21.3	2.3
South Korea	72.6	71.7	1.3	13.9	14.1	(1.6)	9.4	9.4	(0.5)	4.5	4.7	(3.6)	19.2	19.7	(0.5)	6.2	6.5	(0.3)
Americas																		
Argentina	30.3	30.0	1.0	19.3	19.9	(2.8)	19.3	19.9	(2.8)	—	—	—	63.8	66.3	(2.5)	—	—	—
Mexico	32.2	31.9	1.0	21.0	20.5	2.5	20.8	20.4	2.3	0.1	0.1	45.8	65.1	64.1	1.0	0.4	0.3	0.1

(1) Market share estimates are calculated using IMS data

(2) Total market and market share estimates include cigarillos in Japan

Figure 12 : Importation de PMI en 2022 (PHILIP MORRIS INTERNATIONAL INC., 2023a)

Ainsi, comme pour les cigarettes électroniques, dans la plupart des pays d'Europe, l'utilisation de produits de HTP est le plus souvent occasionnelle, avec des proportions d'utilisateurs bien moins importantes que pour la cigarette conventionnelle (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. et al., 2021). En outre, certains auteurs alertent sur le fait que le HTP pourraient servir de porte d'entrée ou de complément au tabagisme plutôt que de le remplacer (Czoli et al., 2020; Hwang et al., 2019; Kim et al., 2018; Liu et al., 2019).

3.2. Fonctionnement des systèmes de tabac chauffé

Il existe plusieurs types de dispositifs de tabac chauffé, que l'on peut diviser en deux catégories (Figure 13) :

- Le premier utilise un chauffage par induction, permettant aux appareils d'atteindre des températures de fonctionnement d'environ 240 à 280 °C.
- Le second chauffe des bâtonnets de tabac via une lame chauffante à une température maximum de 350°C

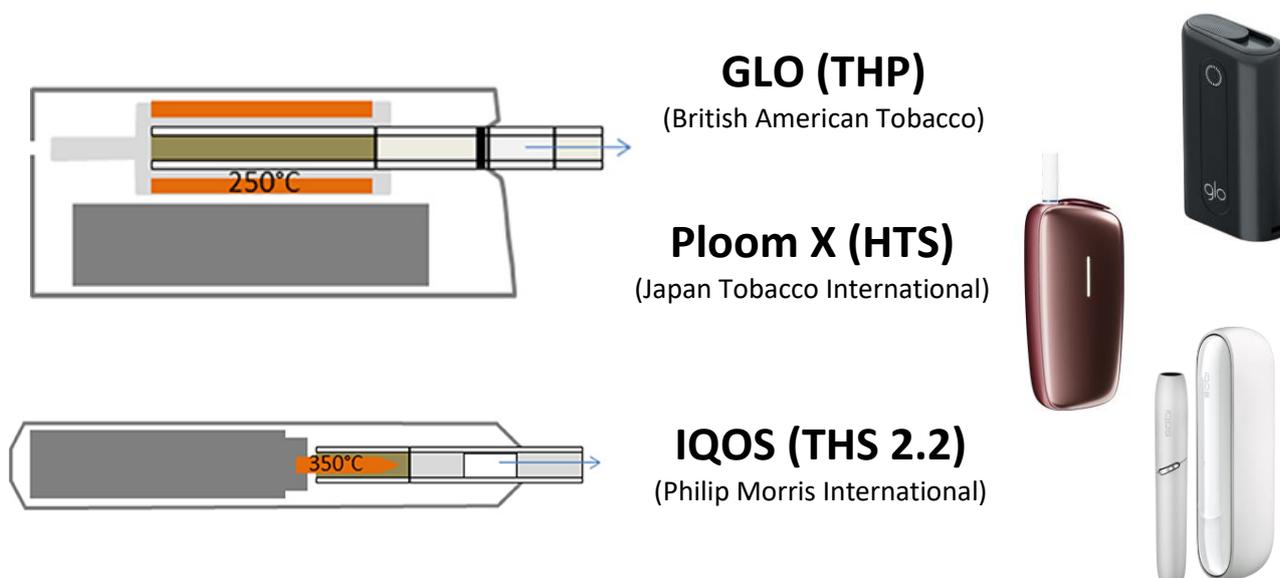


Figure 13 : Fonctionnement des différents systèmes de tabac chauffé (Adapté de British American Tobacco Research & Development, n.d.; Japan Tobacco International, n.d.; Mallock et al., 2019; Philip Morris International, n.d.)

Ploom X et Glo sont des dispositifs qui utilisent des sticks de tabac spécialement conçus. L'utilisateur insère un stick dans l'appareil, puis appuie sur un bouton pour l'activer. Le dispositif chauffe le stick de tabac à une température précise, libérant ainsi un « aerosol » qui peut être inhalé par l'utilisateur. Ces systèmes sont équipés de capteurs et de contrôles qui garantissent une chauffe régulière et uniforme du tabac.

IQOS est actuellement le seul dispositif disponible en France et est commercialisé par Phillip Morris international. C'est un système électronique qui chauffe des bâtonnets de tabac (appelé heets) via une lame chauffante à une température maximum de 350°C (contrairement à la cigarette, où le tabac est brûlé à 800-900 °C) afin de créer une émission imprégnée des arômes du tabac mais avec des niveaux réduits de

composés toxiques. L'IQOS fonctionne avec de sticks de tabac, appelés « heets » qui contiennent du tabac broyé et reconstitué en feuillets après l'addition d'eau, de glycérine, de gomme de guar et de fibres de cellulose (Smith et al., 2016). Ils sont disponibles en plusieurs arômes, exemple : Heets sélection bronze (saveur du tabac avec une pointe de cacao et de fruits sec), Heets turquoise sélection (arôme de menthe), etc (Buracool, 2020).

Philip Morris International fait régulièrement évoluer ses dispositifs avec un marketing semblable à celui des smartphones avec des sorties régulières de nouveaux modèles avec de nouvelles fonctionnalités. Par exemple, entre les modèle de 2014-2015 et ceux de 2016-2017, le Bluetooth a été ajouté. Il existe également une palette de couleur pour personnaliser la partie supérieure de son IQOS Figure 14 : Evolution de l'IQOS et du système de chauffage (Philip Morris International Science, n.d.) Figure 14). Récemment, PMI a présenté une version « améliorée » de l'IQOS original, l'IQOS ILUMA (pour l'instant non-disponible en France). Cette version offrirait une expérience améliorée, et plus robuste (comme il n'a pas de lame) et ne nécessite pas de nettoyer l'appareil. L'IQOS ILUMA utilise une technologie de chauffage par induction pour chauffer le tabac contenu dans les heets. Lorsque l'utilisateur insère un heet dans l'appareil, le système de chauffage par induction entre en action. Le dispositif comporte une bobine d'induction située à l'intérieur, près du compartiment du tabac. Lorsque le dispositif est activé, un courant électrique est envoyé à travers la bobine, générant un champ magnétique. Ce champ magnétique induit des courants électriques dans la partie métallique du heet, créant ainsi de la chaleur. Cette chaleur est transférée au tabac, provoquant sa vaporisation plutôt que sa combustion. Le tabac chauffé libère alors les arômes et la nicotine dans une « vapeur » qui peut être inhalée par l'utilisateur (Figure 14) (Philip Morris International, 2021b).



Figure 14 : Evolution de l'IQOS et du système de chauffage (Philip Morris International Science, n.d.)

Pour le moment, les heets du tabac chauffé sont classées parmi « les autres produits du tabac à fumer », échappant ainsi à certaines réglementations tel que le paquet neutre et la fiscalité appliqués au tabac fumé (Martinet et al., 2021). De plus, d'après PMI, un certain nombre d'organisations de santé publique, y compris la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis, ont examiné les données scientifiques fournies par PMI sur leurs dispositifs. Le 7 juillet 2020, la FDA a autorisé la commercialisation aux États-Unis de l'IQOS en tant que produit du tabac à risque modifié avec des informations sur l'exposition réduite (Philip Morris International Science, 2022).

3.3. Toxicité du tabac chauffé

Un focus a été fait dans ce paragraphe sur les études publiées avec l'IQOS, étant donné que c'est le seul dispositif actuellement disponible en France.

3.3.1. Composition chimique des émissions de tabac chauffé

La majorité des études sur ce nouveau produit du tabac ont été réalisées par les fabricants des produits eux-mêmes. Ainsi, selon Philips Morris International (PMI), ce dispositif permettrait de générer, sans combustion du tabac, un aérosol contenant en moyenne 90 à 95% de constituants nocifs et potentiellement dangereux en moins par rapport à la fumée d'une cigarette (Smith et al., 2016). PMI démontre également que les niveaux des principaux composés nocifs (monoxyde de carbone, composés organiques volatiles, composés carbonylés, amines aromatiques...) sont réduits de 90% par rapport à la cigarette de référence 3R4F (Schaller et al., 2016).

Les études indépendantes sur ces dispositifs sont aujourd'hui encore assez rares. En effet, une revue systématique de la littérature réalisée en 2019 a observé que 20 des 31 études publiées sur les émissions secondaires et l'utilisation de tabac chauffé étaient affiliées à l'industrie du tabac (Simonavicius et al., 2019). Une des premières études indépendantes publiée par Auer *et al.*, (2017) montre que le tabac chauffé, de par son mode de chauffage, provoque une combustion incomplète (ou pyrolyse) des heets, avec une production de composés chimiques potentiellement toxiques (des composés organiques volatiles, des hydrocarbures aromatiques polycycliques et du monoxyde de carbone). Les auteurs ont aussi montré que la fumée de l'IQOS contenait presque autant de nicotine que la fumée de cigarette conventionnelle (environ 84 %) (Auer et al., 2017). Li *et al.*, (2018) ont montré qu'à l'exception de certains carbonyles (formaldéhyde/ butanal), de l'ammoniac et de la N-nitrosoanabasine (NAB), les rejets de l'IQOS ont été inférieurs d'au moins 80% à ceux de la cigarette de référence 3R4F (Li et al., 2018). Mallock et al confirme des niveaux considérablement réduits d'aldéhydes (environ 80 à 95 %) et de COV (environ 97 à 99 %) (Mallock et al., 2018). Concernant les 6 carbonylés classés par la FDA (Formaldéhyde, Acétaldéhyde, Acétone, Acroléine, Crotonaldéhyde, Propanal), Farsalinos et al ont montré une réduction de ces composés allant de 85 à 91% par rapport à une cigarette du commerce (Marlboro Red). Ils concluent que l'IQOS émet des taux de composés carbonylés nettement inférieurs à ceux d'une cigarette du commerce mais supérieurs à ceux d'une e-cig (K. E. Farsalinos

et al., 2018). Des conclusions similaires ont été observées dans une étude réalisée par le laboratoire IMPECS. En effet, parmi les 23 hydrocarbures aromatiques polycycliques analysés, 21 ont été détectés dans les aérosols de HTP à des concentrations de 2 à 676 fois moins élevées que dans la fumée de la cigarette. Le benzo(c)phénanthrène est l'exception, avec une concentration plus élevée dans les aérosols de HTP que dans les autres dispositifs. De plus, parmi les 20 composés carbonylés étudiés, 15 ont été mesurés à des concentrations de 2 à 15 fois supérieures dans la fumée de cigarette par rapport aux aérosols de HTP. Seul l'hexanal a été trouvé en concentration plus élevée dans les aérosols de HTP par rapport à la fumée de la cigarette 3R4F. Globalement, les émissions de HTP présentaient des niveaux plus faibles d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et de carbonyles par rapport à la cigarette conventionnelle. Cependant, il est important de noter que toutes ces concentrations étaient malgré tout plus importantes que celles mesurées dans les aérosols de cigarettes électroniques (Dusautoir et al., 2021). Ruprecht *et al*, (2017) ont aussi observé des niveaux sensiblement différents en composés carbonylés par rapport à la cigarette 3R4F dans les fumées secondaires d'IQOS (Ruprecht et al., 2017). D'autres dosages réalisés dans la même étude ont montré des quantités en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) non détectables dans les émissions d'IQOS ainsi que des émissions de métaux réduites dans la fumée d'IQOS par rapport aux e-cigs et aux cigarettes conventionnelles (Ruprecht et al., 2017).

D'après Davis *et al*, (2019), les propriétés d'utilisation de l'IQOS augmenteraient le risque de dépendance à l'IQOS. En effet, il ne peut fonctionner que pendant environ 6 minutes d'utilisation ou 14 bouffées avant de devoir être rechargé. Cette contrainte de temps peut pousser les utilisateurs à diminuer le temps entre les bouffées pour tirer le maximum de nicotine de chaque heet, augmentant ainsi la quantité de nicotine inhalée à chaque bouffée. Une utilisation accrue en peu de temps peut provoquer une pyrolyse du tabac avec une carbonisation autour de l'élément chauffant après utilisation (Davis et al., 2019b).

PMI recommande que l'IQOS soit nettoyé après 20 utilisations. Le groupe de Davis a constaté que sans nettoyage régulier (après les 20 heets recommandés), la température dans la chambre de chauffage augmentait, entraînant davantage de pyrolyse et de carbonisation du tabac et une libération accrue de constituants toxiques (Davis et al., 2019b). De plus, les auteurs ont constaté que le filtre à film polymère utilisé pour refroidir l'aérosol avant qu'il ne soit inhalé fondait pendant l'utilisation. Cette fusion du plastique entraîne la libération de nombreux produits chimiques dont le formaldéhyde et la cyanohydrine. L'Agence de protection de l'environnement des États-Unis a classé ce dernier produit chimique comme "extrêmement toxique" et a averti que l'inhalation de ce produit peut provoquer une asphyxie, similaire à celle causée par le cyanure d'hydrogène (Davis et al., 2019b).

Comparé aux cigarettes, le tabac chauffé a délivré jusqu'à 83% de nicotine et réduit les niveaux de substances toxiques nocives et potentiellement nocives d'au moins 62% et de particules totales d'au moins 75%. Dans cette étude, il est conclu que le tabac chauffé réduit l'exposition humaine aux substances toxiques de 42 % à 96 % par rapport à la cigarette (Simonavicius et al., 2019).

Globalement, les données obtenues montrent que les émissions de tabac chauffé contiennent moins de composés toxiques que celles de la cigarette classique. Il existe actuellement peu d'études qui comparent les compositions chimiques du tabac chauffé à celle des e-cigs. La présence de composés potentiellement cancérigènes (formaldéhyde, acétaldéhyde, benzo(a)pyrène...) dans les émissions de HTP, même en bien plus faible quantité que dans la fumée de cigarette, n'exclut pas une absence de toxicité car il n'existe pas de seuil pour lesquels certains de ces composés seraient sans danger. D'autre part, certaines substances ont été retrouvées à des concentrations supérieures dans les émissions du tabac chauffé que dans la cigarette conventionnelle (Dusautoir et al., 2021; St.Helen et al., 2018). Il est alors nécessaire de mener des études toxicologiques afin d'évaluer l'impact réel de ces émissions de tabac chauffé au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire.

3.3.2. Etudes de toxicité générale

3.3.2.1. Études *in vitro*

Une revue systématique de la littérature réalisée en 2019 a observé que les études expérimentales sur le tabac chauffé était en majorité produite par l'industrie du tabac elle-même (75 sur 100) (Dautzenberg and Dautzenberg, 2019), il est donc intéressant de comparer les résultats obtenus par l'industrie et les études indépendantes. Selon des études de l'industrie du tabac, le HTP génère une cytotoxicité moins importante que la cigarette 3R4F dans plusieurs modèles *in vitro* : des cultures de tissus épithéliaux nasaux humains MucilAir, la lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c 3T3 et des cellules épithéliales gingivales humaines EpiGingival™ (Gin-100) (Iskandar et al., 2016; Schaller et al., 2016; Zanetti et al., 2017). De plus, des altérations de l'épithélium en culture et des sécrétions de médiateurs inflammatoires sont moins importantes avec le tabac chauffé qu'avec la cigarette (Iskandar et al., 2016; Zanetti et al., 2017). La comparaison des effets de la 3R4F à une faible concentration et de HTP à une forte concentration a révélé des changements similaires dans la dynamique et la biogenèse mitochondriale et la morphologie cellulaire de cellules BEAS-2B. Lors d'une exposition chronique avec le HTP (12 semaines), de nombreux paramètres ont été affectés de manière opposée par rapport à une exposition courte (1 semaine). Une forte augmentation du niveau de protéine NRF2, une réorganisation du réseau mitochondrial et une activation du processus de biogenèse mitochondriale a été observé avec le HTP (Walczak et al., 2020).

Des études *in vitro* ont montré des effets réduits d'un prototype de HTP par rapport à la cigarette 3R4F sur les mécanismes contribuant au développement de la plaque d'athérosclérose, comme l'adhésion monocyte-endothéliale (Poussin et al., 2016) et la migration transendothéliale (van der Toorn et al., 2015), et sur les processus favorisant le dysfonctionnement pulmonaire tels que l'inflammation, le stress oxydatif, le défaut de battement ciliaire étudiés dans des cultures organotypiques des voies respiratoires (Iskandar et al., 2016, 2017a). De plus, le gène de l'hème oxygénase 1 (HMOX1), impliqué dans la réponse antioxydante, était régulé positivement par le cigarette et diminué par l'aérosol d'HTP 4h après l'exposition (Zanetti et al., 2017). En

revanche, les cultures exposées aux aérosols HTP présentaient une activité enzymatique CYP1A1/1B1 plus élevée que la cigarette 3R4F, malgré une induction similaire de l'expression génique (Zanetti et al., 2017).

Malgré le consensus de ces études sur l'impact moins important du tabac chauffé par rapport à la cigarette, il est important de se rappeler qu'aucune d'entre elles n'est indépendante, il est donc nécessaire de s'intéresser aux études indépendantes pour vérifier ou non les résultats de l'industrie du tabac. Une revue de la littérature sur le tabac chauffé a conclu que ces produits ont le potentiel d'augmenter le stress oxydatif et d'augmenter les infections des voies respiratoires (Znyk et al., 2021) en augmentant l'adhérence microbienne aux voies respiratoires sur cellules épithéliales bronchique humaine (BEAS-2B) ou sur cellules primaires des muscles lisses des voies respiratoires humaines (ASM)(Sohal et al., 2019). Ainsi, les produits du tabac chauffé peuvent présenter un risque réduit pour les maladies chroniques, les maladies respiratoires et cardiovasculaires et le cancer par rapport au tabagisme traditionnel, bien que dans le cas des non-fumeurs, ils puissent présenter un risque d'apparition.

Des études indépendantes ont pu observer une cytotoxicité moins importante du HTP que de la cigarette conventionnelle (Chapman et al., 2023; Horinouchi and Miwa, 2021; Leigh et al., 2018). En revanche, une étude comparant le HTP à une e-cig et à la cigarette conventionnelle observe une cytotoxicité similaire des dispositifs sur plusieurs types cellulaires (BEAS-2B et ASM) (Sohal et al., 2019). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude qui a évalué la cytotoxicité sur 8 types cellulaires différents. Une cytotoxicité équivalente à celle des cigarettes Marlboro Red et 3R4F a été fréquemment observée avec les aérosols d'IQOS avec des tests MTT et NRU (Davis et al., 2019a). Ainsi le HTP pourrait augmenter le stress oxydatif et l'inflammation, l'adhérence microbienne, le remodelage cellulaire des utilisateurs de ces dispositifs (Ito et al., 2020; Leigh et al., 2018; Sohal et al., 2019).

Une des préoccupations qui émerge maintenant est l'utilisation croissante de plusieurs produits du tabac, c'est-à-dire la combinaison de la cigarette conventionnelle avec des cigarettes électroniques ou IQOS (double usage). C'est pourquoi, la double exposition cigarette et HTP a été étudiée par Saha et al, (2023) sur BEAS-2B. La cigarette ou le HTP seuls ont induit de manière significative une perte de viabilité cellulaire d'une manière dépendante de la concentration, qui a été encore renforcée par une double exposition. La double exposition a augmenté de manière significative le stress oxydatif et perturbé l'homéostasie mitochondriale par rapport à la cigarette ou au HTP seul. De plus, la double exposition a induit la signalisation de la transition épithéliale mésenchymateuse comme le montre l'augmentation des marqueurs mésenchymateux (actine du muscle lisse α et N-cadhérine) et la diminution des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine) par rapport à la cigarette ou au HTP seul. Les auteurs concluent que la double utilisation de la cigarette et de l'IQOS peut présenter une toxicité plus importante pour les cellules des voies respiratoires (Saha et al., 2023). Enfin, peu d'étude ont étudié simultanément le HTP et l'e-cig. Celles qui l'ont fait ont montré une cytotoxicité plus importante du HTP que l'e-cig (Leigh et al., 2018; Sohal et al., 2019). De plus, Sohal et al, (2019) ont montré que l'exposition au HTP induit les mêmes dommages (stress oxydatif, inflammation, augmentation des

infections, remodelage des voies respiratoires) sur les cellules épithéliales et musculaires lisses des voies respiratoires humaines que la cigarette et les e-cigs (Sohal et al., 2019).

3.3.2.2. Études *in vivo*

L'impact biologique *in vivo* de l'aérosol de HTP a été évalué par l'industrie du tabac. Il a été démontré des effets réduits par rapport à la fumée de cigarette, notamment sur les systèmes respiratoire et cardiovasculaire (Phillips et al., 2016, 2019; Szostak et al., 2020b). Une étude chez le rat par des expositions « nose-only » de 90 jours a été réalisée en combinant des approches toxicologiques classiques. Les groupes exposés au HTP avaient une réduction du volume respiratoire, un degré d'inflammation pulmonaire et des modifications histopathologiques significativement moins prononcés que les groupes exposés à la cigarette. (Wong et al., 2016). Une seconde étude confirme les résultats en terme d'inflammation mais en comparant l'IQOS utilisé avec des heets à la menthe à la cigarette 3R4F (Kogel et al., 2016). Plusieurs publications évaluant l'impact biologique des aérosols de HTP et d'un autre prototypique de HTP (au carbone) ont montré des effets réduits sur les pathologies pulmonaires et cardiovasculaires par rapport à la cigarette chez des souris (Phillips et al., 2016, 2015) et chez des rats dans une étude de 28 jours par inhalation (Kogel et al., 2014). Une étude plus récente a utilisé le modèle de souris ApoE - / - pour étudier l'impact de la fumée de cigarette et de l'aérosol de deux dispositifs de tabac chauffé sur le système cardiorespiratoire pendant une période de 6 mois. Les aérosols des deux dispositifs de HTP, comparés à la cigarette, ont eu un impact moindre sur le système cardiorespiratoire, notamment une inflammation pulmonaire et des modifications emphysémateuses faibles à absentes, ainsi qu'une réduction de la formation de plaques d'athérosclérose. Les analyses moléculaires ont confirmé une diminution des mécanismes pathologiques précédemment cités des aérosols des deux dispositifs HTP par rapport à la cigarette (Phillips et al., 2019). Une précédente étude de cet auteur indiquait que la cigarette accélérât le développement de plaques d'athérosclérose et d'emphysème. En revanche, l'exposition chronique des souris à un aérosol HTP (avec une concentration de nicotine équivalente) a eu un impact biologique minime (altérations de la morphologie tissulaire, sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, d'altération de la fonction ciliaire) et de faibles effets sur les paramètres moléculaires (transcriptomique, lipidomique et protéomique). Bien que l'exposition de 2 mois des souris à la cigarette ait entraîné des manifestations précoces d'emphysème et d'athérosclérose, le passage de la cigarette au tabac chauffé et l'arrêt ont tous deux entraîné une récupération partielle (fonction pulmonaire, surface de la plaque et morphométrie pulmonaire) ou même complète (inflammation pulmonaire) similaire au témoin négatif (Phillips et al., 2016).

L'ensemble des études précédemment citées sont issues de l'industrie du tabac et montrent une toxicité faible ou inexistante après des expositions *in vivo* au HTP. Une étude indépendante a été réalisée afin d'étudier les lésions pulmonaires et le recrutement des cellules immunitaires dans les poumons chez la souris (C57BL/6NCr) exposée à court terme aux aérosols de HTP. Les résultats montrent que le HTP génère des dommages et des changements pro-inflammatoires dans les poumons qui sont sensiblement similaires à

ceux provoqués par l'exposition à la cigarette (Bhat et al., 2021). Une conclusion similaire a été montrée par une autre étude indépendante de Vivarelli *et al*, (2021). En effet, l'exposition de rats Sprague-Dawley pendant 4 semaines aux émissions de HTP provoque de graves lésions pulmonaires et favorise des facteurs pro-cancérogènes (augmentation des radicaux réactifs dans les tissus ; lésions oxydatives et dommages primaires de l'ADN, stimulation de la voie MAPK) (Vivarelli et al., 2021). Des souris C57BL/6 ont été exposées à 5 heurts de HTP de 1 à 4 jours par Sawa *et al*, (2022). Le HTP a considérablement réduit la concentration de GSH dans les macrophages alvéolaires de manière dose-dépendante et a augmenté le pourcentage de GSSG dans les tissus pulmonaires. Ces résultats indiquent que l'exposition à l'IQOS augmente le stress oxydatif et que le GSH est consommé pour éliminer le stress oxydatif. En outre, des macrophages alvéolaires ont été observés dans le liquide de lavage alvéolaire bronchique après exposition au HTP. Bien que la concentration de cytokines inflammatoires, IL-6 et GM-CSF, dans le plasma ait augmenté de manière significative après l'exposition au HTP, il n'y a eu aucun changement significatif avec les autres cytokines. Ces résultats indiquent qu'une exposition à court terme aux aérosols de HTP peut augmenter le stress oxydatif et induire la sécrétion de cytokines inflammatoires (Sawa et al., 2022). D'autre part, Nitta *et al*, (2022) ont réalisé une exposition chronique de HTP sur des souris mâles C57BL6/J. Le nombre de neutrophiles et de lymphocytes a augmenté dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire des groupes IQOS et cigarette par rapport à ceux du groupe témoin. L'exposition chronique au HTP a induit un emphysème pulmonaire similaire à celui observé dans le groupe cigarette. De plus, les niveaux d'expression des gènes impliqués dans les voies liées à l'apoptose étaient significativement augmentés dans les poumons des souris exposées au HTP. Ainsi, l'exposition chronique à l'aérosol de HTP pourrait induire un emphysème pulmonaire principalement *via* des voies liées à l'apoptose (Nitta et al., 2022) .

Ainsi, les conclusions des études sont parfois contradictoires entre elles, suivant qu'elles soient indépendantes ou non. Il manque clairement d'études indépendantes sur le sujet, en particulier des études *in vivo* sur le plus long terme pour étudier les effets chroniques de ces nouveaux produits du tabac, en particulier leur potentiel cancérogène.

3.3.2.3. Études chez l'Homme

Plusieurs études cliniques ont examiné les effets du tabac chauffé, notamment le système IQOS, par rapport à la cigarette classique et à l'abstinence tabagique.

Une étude de PMI a été menée au Japon pour étudier le profil pharmacocinétique de la nicotine après utilisation de tabac chauffé ou de cigarettes classiques (régulières et mentholées). Les concentrations plasmatiques de nicotine ont été mesurées après une utilisation unique chez des fumeurs japonais. Les conclusions ont montré que la quantité maximale de nicotine dans le sang et la quantité totale sur une période étaient similaires entre le tabac chauffé et la cigarette. De plus, l'envie de fumer était semblable

entre les deux dispositifs, laissant entrevoir, d'après les auteurs, que le tabac chauffé pourrait être une option pour les adultes fumeurs souhaitant continuer (Brossard et al., 2017).

Des études chez l'Homme, réalisées par l'industrie du tabac, ont étudié le passage de la cigarette au tabac chauffé mentholé. Les auteurs ont montré une réduction significative de l'exposition aux constituants nocifs et potentiellement nocifs présents dans la fumée de cigarette, ainsi que des biomarqueurs d'exposition et d'effets : réductions de la 8-épi-prostaglandine F2 α (biomarqueur du stress oxydatif), du 11-déhydrothromboxane B2 (biomarqueur de l'activation plaquettaire), de la molécule d'adhésion intracellulaire soluble-1 (biomarqueur de la fonction endothéliale) et augmentation du cholestérol des lipoprotéines de haute densité (biomarqueur du métabolisme lipidique) et du volume expiratoire forcé en 1 seconde (biomarqueur de la fonction pulmonaire, concentrations de carboxyhémoglobine)(Lüdicke et al., 2018a, 2018b). Cela est corroboré par deux études cliniques qui ont été menées aux États-Unis. Les biomarqueurs d'exposition à des substances nocives étaient significativement réduits dans le groupe utilisant le tabac chauffé mentholé par rapport au groupe fumant des cigarettes mentholées sur une période de 90 jours. Le métabolisme lipidique, la fonction endothéliale, le stress oxydatif et d'autres facteurs cardiovasculaires étaient améliorés lors du passage de la cigarette au tabac chauffé. Ces études suggèrent que le passage du tabac classique au HTP réduit l'exposition aux substances nocives et conduit à des améliorations significatives, suggérant que le passage au tabac chauffé est associée à des avantages pour la santé et peut offrir une alternative aux fumeurs (Haziza et al., 2020, 2019). Cela a aussi été démontré par une étude clinique de 6 mois. En effet, Lüdicke *et al*, (2019) ont montré des changements favorables dans huit critères d'évaluation représentatifs de mécanismes tels que le stress oxydatif, l'inflammation, la dysfonction endothéliale, l'activation plaquettaire, le métabolisme des lipides, le transport de l'oxygène, la fonction pulmonaire et l'exposition à certains cancérogènes (NNK) lors du passage du tabac classique au tabac chauffé (Lüdicke et al., 2019).

Pour aller plus loin, une étude indépendante s'est intéressée aux effets sur la santé de l'utilisation à long terme (12, 24 et 36 mois) du HTP chez les patients atteints de BPCO. Des améliorations constantes des symptômes respiratoires, de la tolérance à l'effort, de la qualité de vie et du taux d'exacerbations de la maladie ont été observées chez ces patients qui se sont abstenus de fumer ou ont considérablement réduit leur consommation de cigarettes en passant à l'utilisation de HTP (Polosa et al., 2021).

Cependant, trois études indépendantes menées chez l'homme ont montré que l'utilisation de produits de HTP pourrait engendrer des effets négatifs sur la santé humaine, tels que la survenue d'une pneumonie aiguë à éosinophiles (PEA) (Aokage et al., 2018; Kamada et al., 2016) et des sensations de malaise, suivies de gênes oculaires et de maux de gorge (Tabuchi et al., 2018)

En conclusion, ces études présentent des résultats variés. Les investigations pharmacocinétiques ont mis en lumière des similitudes significatives entre la nicotine absorbée à partir du tabac chauffé et celle issue de la

cigarette traditionnelle, offrant aux fumeurs une alternative pour maintenir leur habitude de fumer. Une étude indépendante et les études cliniques réalisées par l'industrie du tabac, ont montré des améliorations de la santé cardiovasculaire et respiratoire lors de la transition de la cigarette vers le tabac chauffé. Ainsi l'industrie du HTP s'appuie sur ces découvertes pour promouvoir le passage au tabac chauffé qui présenterait ainsi des avantages pour la santé des fumeurs et pourrait potentiellement servir de solution de rechange plus sûre à la cigarette classique.

Toutefois, trois études indépendantes sont en contradiction avec ces travaux et montrent au contraire des effets négatifs du HTP, tels que des problèmes de santé respiratoire et des sensations de malaise. Ces constatations soulignent l'importance de rester prudent quant à l'utilisation de ces nouveaux produits.

3.3.3. Etudes de génotoxicité et mutagénicité

Une synthèse de ces travaux *in vitro* et *in vivo* est présentée dans le Tableau 10 et Tableau 11.

3.3.3.1. Études *in vitro*

Il est essentiel de comprendre les effets génotoxiques potentiels du tabac chauffé pour évaluer sa sécurité par rapport à la cigarette conventionnelle. Quelques études ont examiné les effets du tabac chauffé avec différents tests de génotoxicité.

Des tests du micronoyau ont été effectués afin d'étudier les aberrations chromosomiques (effet clastogène et/ou effet aneugène) : Chapman *et al.*, (2023) ont constaté des résultats positifs pour la cigarette traditionnelle et le HTP sur fibroblastes de poumon de hamster chinois V79. Il y avait 8 à 22 fois plus de micronoyaux avec la cigarette classique qu'avec le tabac chauffé (Chapman *et al.*, 2023). L'augmentation observée avec le HTP était faible par rapport au tabac mais significative par rapport au témoin négatif (Crooks *et al.*, 2018). En revanche, Thorne *et al.*, (2019, 2020) ont obtenu des résultats positifs pour la cigarette traditionnelle mais négatifs pour le tabac chauffé avec le test du micronoyau (Thorne *et al.*, 2020, 2019a).

Ensuite, des tests d'Ames ont été réalisés afin d'étudier le pouvoir mutagène de ces produits. Chapman *et al.*, (2023) ont rapporté des résultats négatifs pour le test d'Ames avec le HTP et la cigarette (Chapman *et al.*, 2023). De même, Crooks *et al.* ont observé des résultats négatifs avec le HTP et la cigarette, montrant l'absence d'effets mutagènes (Crooks *et al.*, 2018). Cependant ces résultats semblent surprenants étant donné que la fumée de cigarette est connue pour induire des mutations géniques.

Ensuite, des tests de lymphome de souris (MLA) ont été réalisés pour observer l'induction de mutation génique *in vitro* sur cellules de mammifères. Schaller *et al.* ont observé, pour le test MLA, des résultats positifs avec les deux dispositifs, bien que le nombre de mutants observés avec le tabac chauffé soient inférieurs à celui obtenu avec la cigarette conventionnelle (Schaller *et al.*, 2016). Au contraire, deux études ont effectué des tests MLA avec des extraits d'aérosol de HTP, cigarette et e-cig ainsi qu'avec un e-liquide.

Les résultats ont montré un effet positif pour la cigarette 3R4F et un effet négatif pour le tabac chauffé (Crooks et al., 2018), la e-cig et le e-liquide (Thorne et al., 2019b).

Enfin, Crooks *et al*, (2018) ont réalisé un test de transformation cellulaire Bhas42 qui permet de détecter les agents chimiques qui ont la capacité de provoquer des altérations géniques et de transformer les cellules normales en cellules tumorales. Ils ont montré un effet positif pour la cigarette 3R4F et un effet négatif pour le HTP (Crooks et al., 2018).

En conclusion, les études sur les effets génotoxiques du tabac chauffé ont montré des résultats contradictoires. Certaines études ont signalé des effets positifs, tels que des effets mutagènes (aberration chromosomique et mutations géniques), tandis que d'autres ont indiqué l'absence d'effets mutagènes. Cependant, il convient de noter que chaque étude a ses propres méthodologies et limitations, et il est donc important de considérer l'ensemble des résultats pour obtenir une image complète des effets génotoxiques et mutagènes des produits du tabac.

3.3.3.2. Études *in vivo*

Une seule étude *in vivo* s'est intéressée aux effets génotoxiques du tabac chauffé. Vivarelli *et al*, (2021) ont montré des résultats positifs avec le test des comètes, indiquant des dommages à l'ADN (cassures simple et double brins) chez des rats exposés à IQOS pendant 4 semaines. Les auteurs ont aussi constaté que l'ajout du S9 mix dans les urines testés produisait des dommages importants de l'ADN de *S. typhimurium*, comme en témoigne une augmentation des révertants bactériens avec le test d'Ames réalisé sur ces extraits d'urine (Vivarelli et al., 2021). Ces résultats démontrent que l'exposition au tabac chauffé peut entraîner des lésions primaires de l'ADN ainsi que des altérations géniques. Néanmoins, plus d'études sont nécessaires pour conclure sur la génotoxicité du tabac chauffé. Il est donc essentiel de poursuivre les recherches dans ce domaine pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes génotoxiques.

Tableau 10 : Résumé des études *in vitro* citées sur la génotoxicité et la mutagénicité du HTP

* Etude réalisée par un industriel du tabac

Test	Composé	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Test d'Ames	p-HTP Cigarette 1R6F	S. typhimurium TA98 et TA100 avec/sans S9	Exposition aux aérosols/fumées HTP : Profil ISO 20778 modifié (55 ml,2s,30s) Cigarette : Profil ISO 3308 (35 ml,2s,60s)	Négatif	(Chapman et al., 2023)*
Test d'Ames	THP Neostik (avec et sans arôme) Cigarette 3R4F	S. typhimurium TA98, TA100, TA1537, TA1535 et TA102 avec/sans S9	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) Ventilation non bloquée pour les THP 0 à 5000 µg/plaque de TPM	Négatif	(Crooks et al., 2018)*
Test du micronoyau (OCDE 487)	p-HTP Cigarette 1R6F	Fibroblastes de poumon de hamster chinois V79 (ECACC 86041102)	Exposition aux aérosols/fumées Profil HTP : 0 – 36 bouffées (+/- S9) Profil ISO 20778 modifié (55 ml,2s,30s) Cigarette : 0 – 2,5 bouffées (+S9) (Dilution 1/4 avec de l'air) 0 – 1,67 bouffées (-S9) (Dilution 1/6 avec de l'air) ISO 3308 (35 ml,2s,60s)	Cigarette : Positif HTP : Positif Cigarette >>> HTP (8 à 22 fois)	(Chapman et al., 2023)*
Test du micronoyau (OCDE 487)	THP Neostik aromatisées et non aromatisées 3R4F	Fibroblastes de poumon de hamster chinois V79	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée 0- 1500 µg/ml de TPM Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) modifié pour THP avec les ventilations non bloquées	Cigarette : Positif HTP : Positif (Faible) Cigarette >>> HTP	(Crooks et al., 2018)*
Test du micronoyau (OCDE 487)	Cigarette 3R4F THP E-cig E-liquide	Fibroblastes de poumon de hamster chinois V79	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée 3R4F : 60 – 160 µg/ml de TPM Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) E-cig et THP : 300 – 500 µg/ml de TPM E-cig : Profil CORESTA No.81 (55 ml, 2s, 30s) THP : Profil HCl modifié (ventilation non bloquée) E-liquide : 300 – 500 µg/ml 3 + 21 h (+/-S9) 24 + 24 h (-S9)	Cigarette : Positif HTP : Négatif E-cig : Négatif	(Thorne et al., 2019a)*
Test du micronoyau (OCDE 487)	Cigarette 3R4F THP1.0	Fibroblastes de poumon de hamster chinois V79 Cellules lymphoblastoïde humain TK6 Cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO)	Exposition aux aérosols/fumées 3R4F : HCl (55 ml, 2s, 30s) THP : Profil HCl modifié (ventilation non bloquée) 240 µg/ml and 500 µg/ml de TPM V79 : 3 h +/- S9 et 24 h - S9 TK6 : 3 h +/- S9 et 30 h - S9 CHO : 3 h + S9 et 24 h - S9	Cigarette : Positif HTP : Négatif	(Thorne et al., 2020)*
Test d'Ames (OCDE471)	THS2.2 (Regulier et Menthol) Cigarette 3R4F	S. typhimurium TA98, TA100, TA102, TA1535 avec/sans S9	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) 1 mg par plaque de TPM	HTP : Négatif Cigarette : Positif	(Schaller et al., 2016)*
Mouse Lymphoma Assay (MLA) OCDE 490)	THP Neostik aromatisées et non aromatisées Cigarette 3R4F	Cellules de lymphome de souris (L5178Y tk+/-)	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée 0 - 500 µg/ml de TPM Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) Modifié pour THP avec les ventilations non bloquées	3R4F : Positif HTP : Négatif	(Crooks et al., 2018)*

Mouse Lymphoma Assay (MLA) OCDE 490)	Cigarette 3R4F THS2.2	Cellules de lymphome de souris (L5178Y tk+/-) (sub-clone 3.7.2C (IVGT))	Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) 1 mg par plaque de TPM	3R4F : Positif HTP : Positif 3R4F >>> HTP	(Schaller et al., 2016)*
Mouse Lymphoma Assay (MLA) OCDE 490)	Cigarette 3R4F THP Neostick E-cig E-liquide	Cellules de lymphome de souris (L5178Y tk+/-)	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée 3R4F : 0 – 500 µg/ml de TPM Profil HCl (55 ml, 2s, 30s) E-cig et THP : 0 – 500 µg/ml de TPM E-cig : CORESTA No.81 (55 ml, 2s, 30s) THP : Profil HCl modifié (ventilation non bloquée) E-liquide : 0 – 500 µg/ml 3 + 21 h (+/- S9)	3R4F : Positif HTP, E-cig et E-liquide : Négatif	(Thorne et al., 2019b)*
Test de transformation cellulaire Bhas 42	THP Neostik aromatisées et non aromatisées Cigarette 3R4F	Bhas 42	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée 0- 250 µg/ml de TPM HCl (55 ml, 2s, 30s) Modifié pour THP avec les ventilations non bloquées	3R4F : Positif HTP : Négatif	(Crooks et al., 2018)*

Tableau 11 : Résumé des études *in vivo* citées sur la génotoxicité et la mutagénicité du HTP

Tests	Dispositifs	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Test Comet (<i>in vivo</i>)	IQOS	Leucocyte de rats Sprague-Dawley	Exposition corps entier 8 Heets 5 jours/semaine/4 semaines	Positif	(Vivarelli et al., 2021)
Test d'Ames (<i>in vivo</i>)		S. typhimurium TA100 +/- S9		HTP : Positif	

3.3.4. Etudes des altérations épigénétiques

Une synthèse de ces travaux *in vitro*, *in vivo* et chez l'Homme est présentée dans le Tableau 12, Tableau 13 et Tableau 14.

3.3.4.1. Études *in vitro*

Une étude réalisée par l'industrie du tabac s'est intéressée aux modifications d'expression des microARN après une exposition à des extrait de cigarette et de HTP sur des cultures de tissus épithéliaux nasaux humains MucilAir. Suite aux expositions aux aérosols de HTP, davantage de microARN étaient significativement modifiés 4 heures après l'exposition en comparaison à 24, 48 et 72h. L'inverse a été observé avec la cigarette. Par une analyse bio-informatique, les gènes cibles des microARN ont ensuite été identifiés et analysé par enrichissement. Les microARN du HTP étaient liés au métabolisme cellulaire, à la réponse à un facteur de stress environnemental, à l'interaction cellulaire et au métabolisme lipidique (Iskandar et al., 2016). D'autres études de l'industrie du tabac ont observé que les gènes cibles des microARN étaient impliqués dans le métabolisme des xénobiotique, la réponse inflammatoire (Zanetti et al., 2017) le stress oxydatif et l'inhibition de la voie AhR (Iskandar et al., 2017b). Bien que ces études aient montré un impact du HTP sur les microARN régulant certaines voies métaboliques, elles concluent toutes que cet impact est bien inférieur à celui de la cigarette. Une méta-analyse de l'industrie du tabac a montré que l'impact du HTP et de l'e-cig sur les microARN était moins important que celui de la cigarette, avec une réduction relative de 94 % de l'altération de l'expression des microARN par rapport à la cigarette (Iskandar et al., 2017a, 2017b, 2016; Zanetti et al., 2017). De plus, aucune voies spécifique des microARN liée à l'exposition aux aérosols de HTP ou de cigarette électronique communes à toutes les études n'a pu être identifiée (Sewer et al., 2020).

Une récente étude indépendante a évalué l'impact du HTP sur la méthylation de l'ADN dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain (Lignée A549). Les résultats de l'étude suggèrent que le HTP ainsi que les cigarettes conventionnelles peuvent modifier la méthylation des CpG et la transcription des gènes dans les cellules épithéliales pulmonaires. Les niveaux globaux de 5-mC et 5-hmC ont été diminués avec l'extrait de cigarette mais pas avec les extraits de HTP. Cependant, l'extrait d'HTP a modifié le schéma de méthylation des CpG et influencé l'expression de certains gènes spécifiquement (*VEGFA*, *GDF15*, *HMOX1*, *DKK1* et *RASSF9*), bien que de manière moins prononcée que la cigarette. En particulier, l'extrait d'HTP a affecté l'expression des gènes et la méthylation du promoteur du gène *CYP1A1*, associé au risque de cancer (Sato and Ishigami, 2023).

3.3.4.2. Études *in vivo*

Une étude, de l'industrie du tabac, a réalisé le séquençage au bisulfite du génome entier pour évaluer les effets de l'extrait de cigarette et de l'aérosol d'HTP sur la méthylation de l'ADN dans les tissus pulmonaires et hépatiques de souris *Apoe -/-* pendant une période d'exposition de huit mois. Ils ont constaté que dans

le tissu pulmonaire, la cigarette induisait principalement une hyperméthylation des amplificateurs (enhancers), ainsi que des promoteurs mais dans une moindre mesure. Dans les premiers mois (un, deux et trois mois), la cigarette a modifié les niveaux de méthylation de l'ADN d'environ 200 régions faiblement méthylées (LMR), et ce nombre a augmenté avec le temps, atteignant un maximum d'environ 1000 LMR à huit mois. La majorité des LMR affectées ont subi une hyperméthylation, tandis que seul un petit nombre a été hypométhylé. Cet effet a été fortement réduit lors de l'arrêt de la cigarette ou du passage à le HTP (A 1 mois : 75 LMR hyperméthylés et 74 hypométhylés) et décroissant avec le temps. À huit mois, seuls 53 LMR étaient hyperméthylés et 37 hypométhylés. En revanche, l'exposition chronique au tabac chauffé a eu un effet limité sur la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs et des amplificateurs (enhancers). Contrairement au poumon, la méthylation de l'ADN dans le foie était négligeable avec toutes les expositions étudiées. En résumé, les altérations de la méthylation de l'ADN liées à la cigarette sont spécifiques aux tissus, se produisent principalement au niveau des amplificateurs (enhancers) et sont fortement réduites lors de l'arrêt du tabac ou du passage au HTP (Choukrallah et al., 2019). Plusieurs études de l'industrie du tabac ont évalué l'impact du tabac chauffé sur les microARN. Dans le tissu cardiaque et respiratoire de souris exposées à des aérosols de HTP à des concentrations équivalentes en nicotine à celles de la fumée de cigarette, aucun microARN a été différentiellement exprimé par rapport aux groupes témoin (Phillips et al., 2019; Szostak et al., 2020a).

3.3.4.3. Etudes chez l'Homme

Une seule étude indépendante a examiné les effets de l'utilisation de HTP sur la méthylation de l'ADN dans une population japonaise. Les utilisateurs de HTP présentaient des modifications de la méthylation de l'ADN, bien que ces modifications soient moins prononcées que chez les fumeurs de tabac conventionnel. Certains gènes étaient particulièrement touchés, tels que AhRR, ALPPL2, F2RL3, GNG12, GPR15, LRRN3, MGAT3, MYO1G, PRSS23, RARA. Certains gènes étaient hypométhylés chez les utilisateurs de HTP par rapport aux non-fumeurs, mais moins hypométhylés que chez les fumeurs de tabac conventionnel. En outre, certains gènes étaient affectés de manière similaire chez les utilisateurs de HTP et de tabac conventionnel, suggérant certains mécanismes biologiques communs (Ohmomo et al., 2022).

Tableau 12 : Résumé des études *in vitro* citées sur les altérations épigénétiques du HTP

* Etude réalisée par un industriel du tabac

Test	Composé	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
MicroARN	Cigarette 3R4F THS 2.2	Cultures 3D de tissu épithélial nasal humain MucilAir™	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée Profil HCl (55 ml, 2 s, 30 s) 28 min d'exposition Cigarette : 0,15 et 0,25 mg de nicotine/l HTP : 0,15, 0,27 et 0,44 mg de nicotine/l Arrêt à 4 – 24 – 48 – 72h	THS2.2 : Les microARN étaient liés au métabolisme cellulaire, à la réponse à un facteur de stress environnemental, à l'interaction cellulaire et au métabolisme lipidique	(Iskandar et al., 2016)*
MicroARN	Cigarette 3R4F THS 2.2	Modèle de culture organotypique des petites voies respiratoires humaines SmallAir™	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée Profil HCl (55 ml, 2 s, 30 s) 28 min d'exposition Cigarette : 0,14 et 0,26 mg de nicotine/l HTP : 0,14, 0,30 et 0,45 mg de nicotine/l Arrêt à 4 – 24 – 48 – 72h	Plus de microARN ont été modifiés de manière significative après une exposition à la fumée 3R4F (0,15) qu'après une exposition à un aérosol THS2.2. THS2.2 a significativement modifiés : miR-4521, miR-92a, miR-27a et miR-29b (4 h après l'exposition) et miR-138 (48 h post-exposition).	(Iskandar et al., 2017a)*
MicroARN	Cigarette 3R4F THS 2.2	Epithélial bronchique organotypique humain des cultures (EpiAirway™ et MucilAir™ Bronchial)	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée Profil HCl (55 ml, 2 s, 30 s) 28 min d'exposition Cigarette : 0,13 et 0,25 mg de nicotine/l HTP : 0,14, 0,25 et 0,42 mg de nicotine/l Arrêt à 4 – 24 – 48 – 72h	L'expression des microARN n'a pas été modifiée après l'exposition au THS2.2 (0,14). Seuls deux microARN ont été significativement régulés à la baisse après une exposition au THS2.2 (0,25) : miR-4669 et miR4701, fonction inconnue. De plus, miR-320a/b (lié au stress oxydatif) et miR-378a/i (inhibition voie AHR, induction CYP1A1) étaient significativement régulés positivement 72 heures après l'exposition après THS2,2 (0,42)	(Iskandar et al., 2017b)*
MicroARN	Cigarette 3R4F THS2.2	Cultures organotypiques épithéliales gingivales humaines model Epi-Gingival™ (Gin-100)	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée Profil HCl (55 ml, 2 s, 30 s) 3 jours d'exposition pendant 28 min à deux concentrations Cigarette : 25% (faible, 4,94 mg/insert de nicotine) et 35% (forte, 8,46 mg/insert de nicotine) THS2.2 : 75% (faible, 5,46 mg/insert de nicotine) et 100% (forte, 10,04 mg/insert de nicotine)	L'analyse des microARN a mis en évidence 66 microARN exprimés différemment (FDR < 0,05), 41 régulés uniquement par la cigarette, un microARN régulé uniquement par l'aérosol THS2.2 et 21 communément régulés par les deux traitements. Les microARN étaient moins affectés dans les cultures exposées aux aérosols THS2.2 qu'avec la cigarette. Gènes cibles des microARN impliqués dans le métabolisme des xénobiotique, réponse inflammatoire)	(Zanetti et al., 2017)*
Méthylation de l'ADN	Ploom S (HTP1) and Ploom TECH+ Cigarette 1R6F	Cellules d'adénocarcinome du poumon humain (A549) avec épithélial alvéolaire de type II	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée Profil HCl (55 ml, 2 s, 30 s) 40 mg/mL de TPM pour l'extrait 1R6F	Niveaux globaux de 5-mC et 5-hmC diminués par l'extrait de cigarette mais pas par les extraits de HTP. HTP a modifié le schéma de méthylation des CpG et influencé l'expression de gènes (VEGFA, GDF15, HMOX1, DKK1 et RASSF9), mais moins prononcée que la cigarette.	(Sato and Ishigami, 2023)

			100 mg/mL de TPM pour les extraits HTP	L'extrait HTP a affecté l'expression des gènes et la méthylation du promoteur du gène CYP1A1	
--	--	--	--	--	--

Tableau 13 : Résumé des études *in vivo* citées sur les altérations épigénétiques du HTP

* Etude réalisée par un industriel du tabac

Test	Dispositifs	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Méthylation de l'ADN	Cigarette 3R4F THS2.2	Souris ApoE ^{-/-}	<p>Exposition corps entier HCl (55 ml, 2 s, 30 s)</p> <p>8 mois d'exposition 3 h par jour (1h d'expo, 30 min d'air, 1h d'expo, 1 h d'air, 1h d'expo) 5 j par semaine (Corps entier)</p> <p>Cigarettes : 29,9 mg nicotine/m³ (600mg TPM/m³), HTP m : 29,9 mg/m³ nicotine</p> <p>3R4F et THS2.2 : 29,9 mg nicotine/m³</p> <p>Cessation : 2 mois d'exposition 3R4F + 6 mois d'exposition à l'air</p> <p>Switch : 2 mois d'exposition 3R4F + 6 mois d'exposition THS2.2</p> <p>Arrêt à 1, 2, 3, 6 et 8 mois d'exposition</p>	<p>Cigarette : une hyperméthylation principalement au niveau des amplificateurs (enhancers) et sont fortement réduites lors de l'arrêt du tabac ou du passage au tabac chauffé</p> <p>Tabac chauffé : effet limité sur la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs et des amplificateurs (enhancers).</p>	(Choukrallah et al., 2019)*
MicroARN	Cigarette 3R4F THS2.2 CHTP1.2	Souris ApoE ^{-/-} Tissus respiratoires, cardiaque et aorte thoracique	<p>Exposition corps entier HCl (55 ml, 2 s, 30 s)</p> <p>6 mois d'exposition, 3 h par jour, 5 j par semaine.</p> <p>Cigarettes : 28 µg nicotine/L (équivalent 600 µg TPM/L)</p> <p>CHTP 1.2 : 28 µg/ L</p> <p>THS 2.2 28 µg/L</p>	THS 2.2 et CHTP1.2 : aucune modification significative des microARN	(Phillips et al., 2019)*

MicroARN	Cigarette 3R4Ff CHTP1.2 THS2.2	Souris ApoE -/- Tissus cardiaque et aorte thoracique	Exposition corps entier HCl (55 ml, 2 s, 30 s) 6 mois d'exposition, 3 h par jour, 5 j par semaine 3R4F : 28 µg/L de nicotine (600 µg/L de TPM) CHTP 1.2 and THS 2.2 : 28 µg/L de nicotine Cessation : 3 mois d'exposition 3R4F puis 3 mois d'exposition à l'air filtré Switch : 3 mois d'exposition 3R4F puis 3 mois d'exposition à CHTP 1.2 Arrêt à 2, 3, 4 et 6 mois	THS 2.2 et CHTP1.2 : pas d'effet sur microARN	(Szostak et al., 2020a)*
----------	--------------------------------------	--	---	--	-----------------------------

Tableau 14 : Résumé des études chez l'Homme citées sur les altérations épigénétiques du HTP

Population	Système d'essai	Résultats	Références
Non-fumeurs (52 participants) Fumeurs de tabac classique (52 participants) Anciens fumeurs (52 participants) Utilisateur de HTP (52 participants)	Echantillons sanguins	Les utilisateurs de HTP présentaient des modifications de la méthylation de l'ADN mais moins prononcées que chez les fumeurs de tabac conventionnel. Certains gènes étaient particulièrement touchés, tels que AHRR, ALPPL2, F2RL3, GNG12, GPR15, LRRN3, MGAT3, MYO1G, PRSS23, RARA. Certains gènes étaient hypométhylés chez les utilisateurs de HTP par rapport aux non-fumeurs, mais moins hypométhylés que chez les fumeurs de tabac conventionnel	(Ohmomo et al., 2022)

3.3.5. Etudes des effets transcriptomiques et analyses fonctionnelles

Une synthèse de ces travaux *in vitro*, *in vivo* et chez l'Homme est présentée dans le Tableau 15, Tableau 16, Tableau 17.

3.3.5.1. Études *in vitro*

Les résultats de plusieurs études *in vitro* suggèrent que le tabac chauffé a un impact transcriptomique réduit par rapport à la cigarette conventionnelle sur différents modèles cellulaires. Haswell *et al*, (2018) ont constaté que l'exposition à la cigarette et au HTP a entraîné une dérégulation significative des gènes dans l'épithélium respiratoire humain 3D reconstitué. Cependant, la cigarette a provoqué une dérégulation plus importante avec un maximum de 2800 gènes, tandis que le HTP a eu un impact moins prononcé avec un maximum de seulement 66 gènes dérégulés. L'analyse fonctionnelle a révélé que la cigarette activait principalement des voies liées à la réponse inflammatoire, la réponse aux blessures, la migration cellulaire et la réponse aux produits chimiques/xénobiotiques, tandis que le HTP avait un effet limité sur des voies telles que la réponse immunitaire, la réponse au stress, l'angiogenèse et le cycle cellulaire (Haswell et al., 2018). De même, Iskandar *et al*, (2016) ont utilisé des cultures de tissu épithélial nasal humain pour comparer les effets du HTP et de la cigarette. Ils ont observé que les deux produits provoquaient une dérégulation des transcrits, mais l'analyse fonctionnelle a montré que la cigarette avait un impact plus important sur les réseaux biologiques par rapport au HTP. Les voies perturbées par la cigarette comprenaient la sénescence, la réponse au dommage de l'ADN, l'apoptose, les voies de signalisation MAPK et Jak/Stat, ainsi que la perturbation du métabolisme des xénobiotiques et du stress oxydatif. Le HTP avait un impact transitoire, avec une disparition des perturbations significatives 48 à 72 heures après l'exposition contrairement à la cigarette avec qui les effets observés perduraient dans le temps (Iskandar et al., 2016). L'effet transcriptomique du HTP par rapport à la cigarette a également été étudié dans un modèle de culture organotypique des petites voies respiratoires humaines. La cigarette a entraîné une dérégulation plus importante des gènes par rapport au HTP sauf quatre heures après les expositions, à des concentrations en nicotine 2 et 3 fois supérieures à la cigarette, où plus de gènes étaient dérégulés avec le tabac chauffé. De plus, à des concentrations similaires de nicotine, l'exposition au HTP avait un impact moins important que la fumée de cigarette sur la plupart des réseaux biologiques (Iskandar et al., 2017a). Ces résultats sont soutenus par les conclusions de Zanetti *et al*, (2017) dans leur étude sur des cultures épithéliales gingivales humaines exposées à la cigarette et au HTP. Le HTP avait un impact biologique réduit par rapport à la cigarette, avec une réduction d'environ 79% pour la concentration élevée de HTP par rapport à la cigarette. Les voies biologiques dérégulées par la cigarette, telles que le stress oxydatif, la réponse du métabolisme des xénobiotiques, la lésion tissulaire, la signalisation NRF2, l'apoptose, l'autophagie, la nécroptose, la sénescence, le cycle cellulaire et les facteurs de croissance, étaient plus fortement affectés par la cigarette que par le HTP (Zanetti et al., 2017). En conclusion, ces études convergent pour montrer que le HTP a un impact transcriptomique réduit par rapport à la cigarette sur différents modèles cellulaires. Le HTP entraîne

des effets biologiques réduits par rapport à la cigarette. Cependant, il est important de noter que ces études ont été réalisées par l'industrie du tabac elle-même. Il serait donc très intéressant d'observer des résultats issus de travaux indépendants. De plus, il n'y a actuellement aucune étude comparant l'impact transcriptomique du HTP et de l'e-cig.

3.3.5.2. Études *in vivo*

Plusieurs études *in vivo* ont montré que la cigarette provoque des dérégulations transcriptomiques importantes, affectant des gènes liés à la différenciation cellulaire, à l'inflammation, à la réparation tissulaire, au stress cellulaire et à la prolifération cellulaire. En revanche, le tabac chauffé semble avoir moins d'effets sur ces gènes. En effet, la cigarette perturbe davantage le transcriptome de certains tissus, comme l'épithélium nasal, le tissu pulmonaire, le ventricule cardiaque et l'aorte thoracique, tandis que le tabac chauffé a un impact moins significatif voire inexistant sur ces tissus (Kogel et al., 2016; Oviedo et al., 2016; Phillips et al., 2016; Szostak et al., 2020a; Wong et al., 2016). Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres études, où les altérations transcriptomiques étaient moins importantes dans les groupes exposés au tabac chauffé (Phillips et al., 2019; Titz et al., 2020, 2018). Des altérations dans le foie ont été étudiées par Lo Sasso *et al.*, (2016), chez des souris exposées à la fumée de cigarette conventionnelle ou au tabac chauffé. Les résultats ont montré des altérations significatives dans le métabolisme des lipides, l'homéostasie du fer et le stress oxydatif. En revanche, les altérations étaient moins importantes dans le groupe exposé au tabac chauffé, y compris chez ceux ayant arrêté la cigarette ou effectué une transition vers le HTP (Lo Sasso et al., 2016). Néanmoins, même si les conclusions de ces articles insistent sur la baisse importante des modulations transcriptomiques par rapport à la cigarette classique, le tabac chauffé est tout de même capable d'induire une réponse inflammatoire, un stress oxydatif et des altérations des lipides/tensioactifs (Titz et al., 2020, 2018; Wong et al., 2016). Une étude menée par Choukrallah *et al.*, (2020) a montré que les souris exposées à la fumée de cigarette conventionnelle présentaient un vieillissement prématuré des poumons. Cependant, les souris exposées à l'air ou au tabac chauffé ne présentaient pas ces effets (Choukrallah et al., 2020). En résumé, les études montrent que la fumée de cigarette conventionnelle entraîne des altérations plus importantes au niveau des organes et des tissus, tandis que le tabac chauffé semble provoquer des effets moins prononcés. Ces conclusions sont toutes issues de recherches réalisées ou financées par l'industrie du tabac. Une étude indépendante a réalisé une exposition chronique (6 mois) sur souris mâles C57BL6/J. Cette étude a confirmé que plus de gènes sont dérégulés avec la cigarette. Une induction des voies de l'inflammation et des fonctions liées au système immunitaire telles que la « réponse inflammatoire », la « maladie inflammatoire », le « trafic de cellules immunitaires » et la « maladie immunologique » a été mise en évidence pour la cigarette. Alors que pour le tabac chauffé une activation des voies de survie cellulaire et du maintien structurel a été observée : « fonction et maintien cellulaires », « mort et survie cellulaires », « croissance et prolifération cellulaires » et « blessures et anomalies de l'organisme ». Parmi les 10 principales

voies dérégulées, les niveaux d'expression des gènes impliqués dans les voies liées à l'apoptose étaient significativement augmentés dans les poumons des souris exposées au HTP (Nitta et al., 2022) .

3.3.5.3. Etudes chez l'Homme

Une étude indépendante réalisée au Japon a analysé les profils transcriptomiques de quatre groupes de participants en fonction de leurs habitudes de tabagisme : non-fumeurs, anciens fumeurs, fumeurs de tabac conventionnel et utilisateurs de produits du tabac chauffé (< 2 ans). Lors de l'analyse en composantes principales (PCA), les utilisateurs de HTP ont montré des profils d'expression génique similaires aux anciens fumeurs de tabac conventionnel, tout en étant positionnés de manière intermédiaire entre les non-fumeurs et les fumeurs de tabac conventionnel. Les gènes GPR15 (impliqué dans la réponse immunitaire) et NAV2 (rôle dans la croissance et la migration cellulaires dans les cellules neuronales) étaient induits chez les utilisateurs de HTP, tandis que 13 autres gènes étaient inhibés chez ces utilisateurs par rapport aux non-fumeurs. Les comparaisons entre les groupes ont révélé des profils d'expression génique distincts, suggérant des altérations transcriptionnelles associées aux différentes habitudes de tabagisme. Cependant, il convient de noter qu'il existait également une variabilité importante au sein de chaque groupe en ce qui concerne l'expression de certains gènes, indiquant des réponses individuelles au tabagisme et à l'utilisation du HTP. Les résultats de l'analyse de correction des données transcriptomiques suggèrent qu'une correction excessive peut avoir été appliquée, ce qui pourrait avoir influencé les résultats. Par conséquent, les auteurs concluent que des études sont nécessaires pour explorer davantage les effets transcriptomiques de l'utilisation de HTP à long terme (Ohmomo et al., 2022).

Tableau 15 : Résumé des études *in vitro* citées sur les modifications transcriptomiques induites par le HTP

* Etude réalisée par un industriel du tabac

Dispositif	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Cigarette 3R4F THP1.0 THS	Épithélium respiratoire humain 3D reconstitué MucilAir™ (1 donneur)	Exposition aux aérosols/fumées Cigarette : Profil HCl (55 ml, 2 s, 30 s) dilution 1/30 pendant 1 h HTP : Profil HCl modifié (55 ml, 3 s, 30 s) dilution 1/5 Arrêt à 24h et 48h	Nombre gènes dérégulés significatif : Cigarette (max 2800) > THS (max 66) > THP (max 1) Analyse fonctionnelle : Cigarette : 314 voies GO (gènes +) (Réponse inflammatoire, réponse aux blessures, migration et réponse aux produits chimiques/xénobiotiques) 238 voies GO (gènes nég) (l'adhésion cellulaire, la signalisation cellule-cellule et le développement.) THS : 223 processus biologiques enrichis, principalement liés à la réponse immunitaire, à la réponse au stress, à l'angiogenèse (voie du VEGF) et au cycle cellulaire THP1.0 : 139 voies (gènes +) et 2 voies (gènes -) liées principalement à la réponse aux composés cycliques organiques et azotés/xénobiotiques, au développement tissulaire et à la différenciation cellulaire. Les gènes régulés à la baisse n'avaient pas d'associations de voies GO.	(Haswell et al., 2018)*
Cigarette 3R4F THS 2.2	Cultures 3D de tissu épithélial nasal humain MucilAir™	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée 28 min d'exposition Profil HCl (55 ml, 2 s, 30 s) Cigarette : 0,15 et 0,25 mg de nicotine/l HTP : 0,15, 0,27 et 0,44 mg de nicotine/l Arrêt à 4 - 24 - 48 - 72h	Plus de transcrit dérégulés à 4h pour les 2 dispositifs. Analyse fonctionnelle : La majorité des réseaux ont d'avantage été perturbés suite à une exposition au 3R4F par rapport à THS2.2. 3R4F : Impact sur les voies de la Senescence, Réponse au dommage de l'ADN, Apoptoses, MAPK, Jak Stat, réseaux de facteurs de croissance, perturbations de la réponse du métabolisme des xénobiotiques, stress oxydatif et signalisation NRF2 HTP : Un impact transitoire a été observé ; la plupart des modèles de réseau n'étaient plus significativement perturbés 48 à 72 h après l'exposition.	(Iskandar et al., 2016)*
Cigarette 3R4F THS 2.2	Modèle de culture organotypique des petites voies respiratoires humaines SmallAir™	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée Profil HCl (55 ml, 2 s, 30 s) 28 min d'exposition Cigarette : 0,14 et 0,26 mg de nicotine/l HTP : 0,14, 0,30 et 0,45 mg de nicotine/l	Nombre gènes dérégulés significatif : Cigarette (max 7924 (24h)) > THS2.2 (max 5711 (4h)) À des concentrations de nicotine similaires, l'exposition aux aérosols THS2.2 (0,14) était liée à des scores NPA inférieurs pour la plupart des réseaux (Réseau du devenir cellulaire, de la prolifération cellulaire, du stress cellulaire et des processus	(Iskandar et al., 2017a)*

		Arrêt à 4 - 24 - 48 - 72h	inflammatoires) par rapport aux scores observés pour l'exposition à la fumée 3R4F (0,15).	
Cigarette 3R4F THS2.2	Cellules musculaires lisses aortiques humaines jeunes et âgées (HAoSMC)	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée Exposition 24h Cigarette (extraits aqueux) : 0,014 à 0,22 bouffées/ml THS2.2 (extraits aqueux) : 0,11 à 1,76 bouffées/ml	3R4F : Les HAoSMC jeunes se sont comportés de la même manière que les cellules âgées, tandis que les HAoSMC âgés ont montré des dommages supplémentaires à l'ADN et des effets d'apoptose. THS2.2 : aucun effet significatif chez les HAoSMC jeunes ou âgées à la concentration la plus élevée de la cigarette. Il a fallu une concentration environ dix fois plus élevée pour induire des effets similaires à ceux observés avec le 3R4F	(Poussin et al., 2021)*
Cigarette 3R4F THS2.2	Cultures organotypiques épithéliales gingivales humaines model Epi- Gingival™ (Gin-100)	Exposition aux extraits d'aérosol/fumée Profil HCl (55 ml, 2 s, 30 s) 3 jours d'exposition pendant 28 min à deux concentrations Cigarette : 25% (faible 4,94 mg/insert de nicotine) et 35% (forte, 8,46 mg/insert de nicotine) THS2.2 : 75% (faible, 5,46 mg/insert de nicotine) et 100% (forte, 10,04 mg/insert de nicotine)	Réduction de l'impact dans les échantillons exposés aux aérosols THS2.2 par rapport au CS (impact biologique inférieur d'environ 79 % pour la concentration élevée en aérosol THS2.2 par rapport au CS) La cigarette a dérégulé plus fortement ces voies que le THS2.2 : Stress oxydatif, réponse du métabolisme xénobiotique, lésion tissulaire, signalisation NRF2, apoptose, autophagie, nécroptose, sénescence, cycle cellulaire, facteur de croissance, Mapk	(Zanetti et al., 2017)*

Tableau 16 : Résumé des études *in vivo* citées sur les modifications transcriptomiques induites par le HTP

* Etude réalisée par un industriel du tabac

Dispositifs	Système d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Cigarette 3R4F THS2.2 CHTP1.2 pHTP	Femelle C57BL/6 Déficiante en Apolipoprotéine E- (ApoE-/-)	Exposition corps entier Air, 3R4F, THS2.2, CHTP1.2, pHTP : 8 mois d'exposition Arrêt à : 1, 2, 3, 6 et 8 mois Cessation : 2 mois d'exposition avec la 3R4F puis 6 mois d'air Switch : 2 mois d'exposition avec la 3R4F puis 6 mois de THS 2.2, CHTP 1.2, pHTP Arrêt à : 3, 6, 8 mois	Les souris exposées au CS aurait un vieillissement prématurément des poumons, contrairement aux souris exposées à l'air ou aux produits du tabac chauffés (HTP) Ce vieillissement est réversible lors de la réduction des expositions nocives	(Choukallah et al., 2020)*
Cigarette 3R4F Cigarette de référence faible en menthol (MRC(LM)) Cigarette de référence fort en menthol (MRC(HM))	L'épithélium respiratoire nasal et le tissu pulmonaire ont été prélevés chez les rats	Exposition « nose-only » HCl (55 ml, 2 s, 30 s) 90 jours d'exposition 6 h par jour, 5 jours par semaine suivis d'une période de récupération de 42 jours	+ de gènes dérégulés avec les cigarette Analyse fonctionnelle :	(Kogel et al., 2016)*

THS 2.2Menthol	Sprague-Dawley	(exposés à l'air frais) (que pour 3r4f MRC(HM) et THS2.2M (plus forte concentration) et rats femelles uniquement). Cigarettes : 23 mg nicotine/l HTPm : 15, 23, and 50 mg/l nicotine	Cigarette : Epithélium nasale : différenciation des cellules épithéliales, l'organisation de la structure extracellulaire et le remodelage des tissus, ainsi que les processus de prolifération et de migration cellulaires. Tissu pulmonaire : inflammation, devenir cellulaire, réparation tissulaire et angiogenèse, stress cellulaire et prolifération cellulaire. THS2.2M : Perturbation globale du réseau beaucoup plus faible par rapport aux cigarette.	
Cigarette 3R4F THS2.2	Souris Apoe -/- Prélèvement du foie	Exposition corps entier HCl (55 ml, 2 s, 30 s) 8 mois d'exposition 3 h par jour, 5j/ semaine 3R4F et THS2.2 : 29,9 mg nicotine/m3 Cessation : 2 mois d'exposition 3R4F + 6 mois d'exposition à l'air Switch : 2 mois d'exposition 3R4F + 6 mois d'exposition THS2.2	Analyse fonctionnelle : Cigarette : Altération dépendante de réseaux biologiques spécifiques (le métabolisme des lipides et des xénobiotiques et l'homéostasie du fer qui ont probablement contribué de manière synergique à l'exacerbation du stress oxydatif). THS2.2 : Altération plus faibles que pour la cigarette. Même constat pour les groupes d'arrêt et de switch par rapport au groupe cigarette.	(Lo Sasso et al., 2016)*
Cigarette IQOS	Souris C57BL/6J	Exposition corps entier 15 ml de fumé, 6 bouffées par minute 6 mois d'exposition, 30 min/jour, 5 jours/semaine IQOS à 3,5 % dilué avec de l'air comprimé Cigarette diluée avec de l'air comprimé.	+ de gènes dérégulés avec la cigarette Analyse fonctionnelle : Cigarette : L'inflammation et les fonctions liées au système immunitaire telles que la « réponse inflammatoire », la « maladie inflammatoire », le « trafic de cellules immunitaires » et la « maladie immunologique » HTP : Survie cellulaire et au maintien structurel telles que « fonction et maintien cellulaires », « mort et survie cellulaires », « croissance et prolifération cellulaires » et « blessures et anomalies de l'organisme ». L'analyse des voies a révélé des voies liées à l'apoptose parmi les 10 principales voies associées aux gènes régulés positivement	(Nitta et al., 2022)
Cigarette 3R4F Cigarette de référence faible en menthol (MRC(LM)) Cigarette de référence fort en menthol (MRC(HM)) THS 2.2Menthol	L'épithélium respiratoire nasal et le tissu pulmonaire ont été prélevés chez les rats Sprague-Dawley	Exposition « nose-only » HCl (55 ml, 2 s, 30 s) 90 jours d'exposition 6 h par jour, 5 jours par semaine pendant d'exposition suivie d'une période de récupération de 42 jours (exposés à l'air) pour les groupes 3R4F, MRC(HM) et THS2.2M (plus forte concentration) (rats femelles uniquement). Cigarettes : 23 mg nicotine/L HTP m : 15, 23, and 50 mg/L nicotine	Cigarette : Epithélium nasale : le nombre le plus élevé de gènes dérégulés a été observé dans le groupe MRC(HM) (7729 DEG) pour les mâles et MRC(LM) (8054 DEG) pour les femelles. Poumon : 1245, 2865 et 1972 gènes dérégulés ont été induits par 3R4F, MRC(LM) et MRC(HM), respectivement. THS2.2M :	(Oviedo et al., 2016)*

			<p>Epithélium nasal : moins de changements dans le transcriptome (max 2118 chez les femelles et 9 chez les mâles) par rapport aux expositions CS. Après la période de récupération, seuls 5 % de tous les gènes dérégulés étaient encore exprimés de manière statistiquement significative dans le groupe THS2.2M High par rapport au groupe fictif.</p> <p>Poumon : moins de gènes dérégulés (45) et fold-change moins important que l'exposition aux CS.</p> <p>Quarante-deux jours après l'exposition à la plus forte dose de THS2.2M, tous les gènes sauf un sont revenus à la normale.</p>	
Cigarette 3R4F THS 2.2	Souris ApoE -/-	<p>Exposition corps entier HCl (55 ml, 2 s, 30 s)</p> <p>8 mois d'exposition 3 h par jour (1h d'expo, 30 min d'air, 1h d'expo, 1 h d'air, 1h d'expo) 5 j par semaine</p> <p>Cigarettes : 29,9 mg nicotine/m3 (600mg TPM/m3), HTP m : 29,9 mg/m3 nicotine</p> <p>3R4F et THS2.2 : 29,9 mg nicotine/m3</p> <p>Cessation : 2 mois d'exposition 3R4F + 6 mois d'exposition à l'air</p> <p>Switch : 2 mois d'exposition 3R4F + 6 mois d'exposition THS2.2</p> <p>Arrêt à 1, 2, 3, 6 et 8 mois d'exposition</p>	<p>Cigarette : 600 gènes différemment exprimés le 1er mois, augmentant avec le temps jusqu'à environ 5100 gènes le 8ème mois.</p> <p>THS2.2 : Aucun changement significatif de l'expression génique. Il en est de même pour le groupe Switch.</p> <p>Analyse fonctionnelle :</p> <p>Cigarette : Principalement le processus inflammatoire puis la réparation tissulaire et l'angiogenèse, le devenir cellulaire et le stress cellulaire.</p> <p>THS2.2 : les mécanismes biologiques perturbés dans le groupe 3R4F sont soit absents, soit très faiblement perturbés dans les groupes THS2.2, cessation et switch, et aucun mécanisme supplémentaire n'a été perturbé dans ces groupes.</p>	(Phillips et al., 2016)*
Cigarette 3R4F THS2.2 CHTP1.2	Souris ApoE -/- Tissus respiratoires, cardiaque et aorte thoracique	<p>Exposition corps entier HCl (55 ml, 2 s, 30 s)</p> <p>6 mois d'exposition, 3 h par jour, 5 j par semaine.</p> <p>Cigarettes : 28 µg nicotine/L (équivalent 600 µg TPM/L)</p> <p>CHTP 1.2 : 28 µg/ L</p> <p>THS 2.2 28 µg/L</p>	<p>Cigarette : 1 658 gènes significativement dérégulés dans l'épithélium nasal, 4 324 gènes dans les poumons, 578 gènes dans le ventricule cardiaque et 217 gènes dans l'aorte thoracique après six mois d'exposition par rapport au groupe témoin</p> <p>THS 2.2 et CHTP1.2 : aucune modification significative de l'expression génique par rapport au groupe témoin</p>	(Phillips et al., 2019)*
Cigarette 3R4Ff CHTP1.2 THS2.2	Souris ApoE -/- Tissus cardiaque et aorte thoracique	<p>Exposition corps entier HCl (55 ml, 2 s, 30 s)</p> <p>6 mois d'exposition, 3 h par jour, 5 j par semaine</p> <p>3R4F : 28 µg/L de nicotine (600 µg/L de TPM)</p> <p>CHTP 1.2 and THS 2.2 : 28 µg/L de nicotine</p> <p>Cessation : 3 mois d'exposition 3R4F puis 3 mois d'exposition à l'air filtré</p>	<p>Cigarette : dérégulation significative du transcriptome du ventricule cardiaque et de l'aorte thoracique.</p> <p>THS 2.2 et CHTP1.2 : pas d'effet sur le transcriptome (ARNm et miR) cardiovasculaire.</p>	(Szostak et al., 2020a)*

		<p>Switch : 3 mois d'exposition 3R4F puis 3 mois d'exposition à CHTP 1.2</p> <p>Arrêt à 2, 3, 4 et 6 mois</p>		
<p>Cigarette 3R4F CHTP1.2</p>	<p>L'épithélium respiratoire nasal et le tissu pulmonaire ont été prélevés chez les rats Sprague-Dawley</p>	<p>Exposition « nose-only »</p> <p>HCl (55 ml, 2 s, 30 s)</p> <p>90 jours d'exposition, 6 h par jour, 5 j par semaine suivie d'une période de récupération de 42 jours (exposés à l'air frais) (que pour 3R4F et CHTP1.2 (moyenne et forte concentration)</p> <p>Cigarettes : 23 mg nicotine/L</p> <p>HTP : 15, 23, and 50 mg/L nicotine</p>	<p>Cigarette</p> <p>Epithélium nasal : modifications du transcriptome (7247 gènes)</p> <p>Poumon : modifications du transcriptome (max 2 338 gènes)</p> <p>CHTP1.2 :</p> <p>Epithélium nasal : expression différentielle maximale bien inférieure à celle induite par la CS</p> <p>Poumon : peu de gènes ont été exprimés de manière différentielle (max 89 gènes)</p> <p>Analyse fonctionnelle :</p> <p>Cigarette :</p> <p>Epithélium nasal : inflammation ; réparation tissulaire, devenir cellulaire ; stress cellulaire ; famille de réseaux de prolifération cellulaire</p> <p>Poumon : Inflammation (signalisation des macrophages et des neutrophiles) ainsi que le stress oxydant ont été perturbés</p> <p>CHTP1.2 :</p> <p>Epithélium nasal : perturbation globale du réseau beaucoup plus faible que la cigarette</p> <p>Poumon : Inflammation (signalisation des macrophages et des neutrophiles) ainsi que le stress oxydant ont été perturbés mais fold-change plus faible que pour la cigarette</p>	<p>(Titz et al., 2018)*</p>
<p>Cigarette 3R4F CHTP1.2 THS2.2</p>	<p>Souris ApoE -/-</p>	<p>Exposition corps entier</p> <p>HCl (55 ml, 2 s, 30 s)</p> <p>6 mois d'exposition, 3 h par jour (1h d'expo, 30 min d'air, 1h d'expo, 1 h d'air, 1h d'expo) 5 j par semaine (corps entier)</p> <p>Cigarettes : 28 µg nicotine/l (600µg TPM/l)</p> <p>THS2.2 et CHTP1.2 : 28 µg/l nicotine</p> <p>Cessation : 2 mois d'exposition 3R4F + 6 mois d'exposition à l'air</p> <p>Switch : 2 mois d'exposition 3R4F + 6 mois d'exposition CHTP1.2</p>	<p>Cigarette : une réponse accrue au stress inflammatoire et oxydatif et à des altérations des lipides/tensioactifs.</p> <p>THS2.2 et CHTP1.2 : effets étaient beaucoup plus limités ou absents, avec une inversion des effets induits par la cigarette lors de l'arrêt et du passage au CHTP 1.2.</p>	<p>(Titz et al., 2020)*</p>

		Arrêt à 3, 4, 6 mois d'exposition		
Cigarette 3R4F THS2.2	Rats Sprague- Dawley	Exposition « nose-only » HCl (55 ml, 2 s, 30 s) Exposition 90 jours 6 h/j, 5 j par semaine THS2.2 : 15, 23 et 50 mg de nicotine/l d'aérosol Cigarette : 8, 15 et 23 mg de nicotine/l d'aérosol	+ de gènes dérégulés avec la CS (dont aucun significatif avec le THS2.2) Analyse fonctionnelle : Cigarette : Epithélium nasal : inflammation, devenir cellulaire, réparation tissulaire, angiogenèse et stress cellulaire Tissu pulmonaire : Fort effet sur l'inflammation puis devenir cellulaire, réparation tissulaire et angiogenèse, stress cellulaire. THS2.2 : Perturbation globale du réseau beaucoup plus faible par rapport à la cigarette avec principalement une perturbation des processus inflammatoires.	(Wong et al., 2016)*

Tableau 17 : Résumé des études chez l'Homme citées sur les modifications transcriptomique induites par le HTP

Population	Système d'essai	Résultats	Références
Non-fumeurs (52 participants) Fumeurs de tabac classique (52 participants) Anciens fumeurs (52 participants) Utilisateur de HTP (< 2 ans) (52 participants)	Echantillons sanguins	Analyse en composantes principales : les utilisateurs de HTP ont montré des profils d'expression génique similaires aux anciens fumeurs de tabac conventionnel, tout en étant positionnés de manière intermédiaire entre les non-fumeurs et les fumeurs de tabac conventionnel. Les gènes GPR15 et NAV2 étaient induit chez les utilisateurs de HTP, tandis que 13 autres gènes étaient inhibés chez ces utilisateurs par rapport aux non-fumeurs. Les comparaisons entre les groupes ont révélé des profils d'expression génique distincts, suggérant des altérations transcriptionnelles associées aux différentes habitudes de tabagisme.	(Ohmomo et al., 2022)

PROBLEMATIQUE DE LA THESE

Alors que ces nouveaux systèmes électroniques de délivrance de nicotine (e-cig et tabac chauffé) peuvent se montrer attrayants pour aider au sevrage tabagique et sont parfois revendiqués « à risques réduits » par les fabricants, ils pourraient également servir de porte d'entrée pour l'usage du tabac ou des autres produits liés au tabac chez les non-fumeurs et en particulier chez les jeunes. Par conséquent, les autorités nationales et les agences sanitaires ont un besoin urgent de données scientifiques indépendantes sur la toxicité potentielle de ces systèmes et en particulier sur leur potentiel cancérigène. L'e-cig et surtout le HTP n'ont pas encore été utilisés assez longtemps pour que des études épidémiologiques puissent conclure à leur caractère cancérigène ou non chez l'homme. En effet, on sait qu'il faut généralement entre une et deux décennies aux fumeurs de tabac pour développer un cancer du poumon (Tang et al., 2022). Par conséquent, des modèles animaux et des études mécanistes *in vitro* sont nécessaires comme alternatives pour étudier les effets cancérigènes du HTP et de l'e-cig, et pour mieux comprendre les changements moléculaires et cellulaires induits par ces nouveaux produits du tabac et du vapotage.

Alors que le potentiel génotoxique et les altérations épigénétiques de la cigarette sont bien connus, les études sur la génotoxicité de l'e-cig et du HTP donnent des conclusions contradictoires comme décrit dans l'état de l'art. De plus, l'impact épigénétique de ces nouveaux produits est encore peu décrit dans la littérature. Par ailleurs, la majorité des études sur l'e-cig sont réalisées avec des e-cigs d'anciennes générations alors que c'est actuellement la troisième génération la plus utilisée. Avec ces modèles de troisième génération, le vapoteur a la possibilité de régler la puissance de l'e-cig. Or, il a été démontré que cette puissance pouvait jouer un possible rôle sur les effets toxiques observés ; il est donc important d'inclure différents réglages de puissance dans les protocoles de recherche, afin de mimer des utilisations faibles ou intenses de vapotage. Plus important encore, il existe actuellement peu d'études comparant les effets génétiques et épigénétiques potentiels du HTP et des émissions d'e-cig, bien qu'une telle comparaison, par des travaux indépendants, semble essentielle puisqu'il s'agit de deux alternatives à la cigarette et qu'elles sont de plus en plus recommandées comme aides au sevrage tabagique.

Dans ce contexte, cette thèse a pour but principal d'étudier et de comparer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la toxicité pulmonaire des émissions de tabac chauffé, d'e-cig et de cigarette conventionnelle dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines (lignée BEAS-2B). En particulier, les objectifs seront :

- (1) de comparer la cytotoxicité de ces différents dispositifs dans des cellules BEAS-2B cultivées en interface air-liquide en utilisant 2 profils standardisés de bouffée (profil ISO3308 et HCI)
- (2) de rechercher d'éventuelles lésions génétiques (cassures de l'ADN, lésions oxydatives, aberrations chromosomiques) et épigénétiques (méthylation d'ADN, modifications d'histones et dérégulation de microARN),

(3) d'identifier, à l'aide d'analyses transcriptomiques pangénomiques, les principales fonctions biologiques et voies de signalisation associées à la toxicité des émissions de tabac chauffé et d'e-cig.

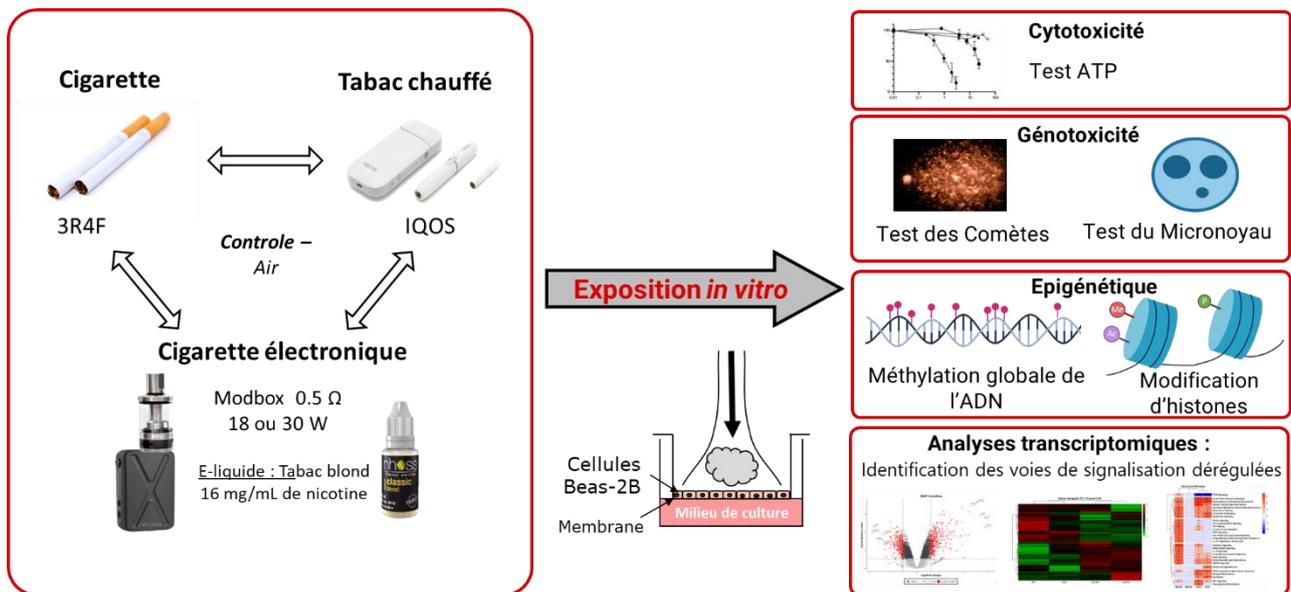


Figure 15 : Résumé graphique du projet de thèse

MATERIELS ET METHODES

1. Produits de tabac et de vapotage

1.1. Tabac chauffé : IQOS®

Le dispositif de tabac chauffé utilisé est l'IQOS de Philip Morris International (PMI). Un stick de tabac (Heets®) est inséré dans un support à l'intérieur duquel se trouve une lame chauffante reliée à un dispositif électronique et une batterie pouvant fonctionner pendant 6 minutes avant de devoir être rechargée par le chargeur (Figure 16). La lame de l'IQOS® agit à la fois comme source de chaleur et capteur de température ; une fois allumée, elle chauffe le tabac à une température maximale de 350°C (en moyenne à une température inférieure à 250 °C). Les heets sont des tubes contenant plusieurs éléments : le bouchon de tabac, un tube d'acétate creux, un filtre en polymère et filtre d'embouchure (Smith et al., 2016). Ceux utilisés dans cette étude sont les « Heets Amber Selection », ils comprennent 203,3 mg (66,7%) de tabac, 47,1 mg (15,36%) de glycérol, 36,1 mg (11,7%) d'eau, 10,5 mg (11,7%) de cellulose, 6,1 mg (1,99%) de gomme guar, 2,6 mg (0,85%) de propylène glycol et 0,141 mg (0,047%) d'arômes (Philip Morris International, n.d.).

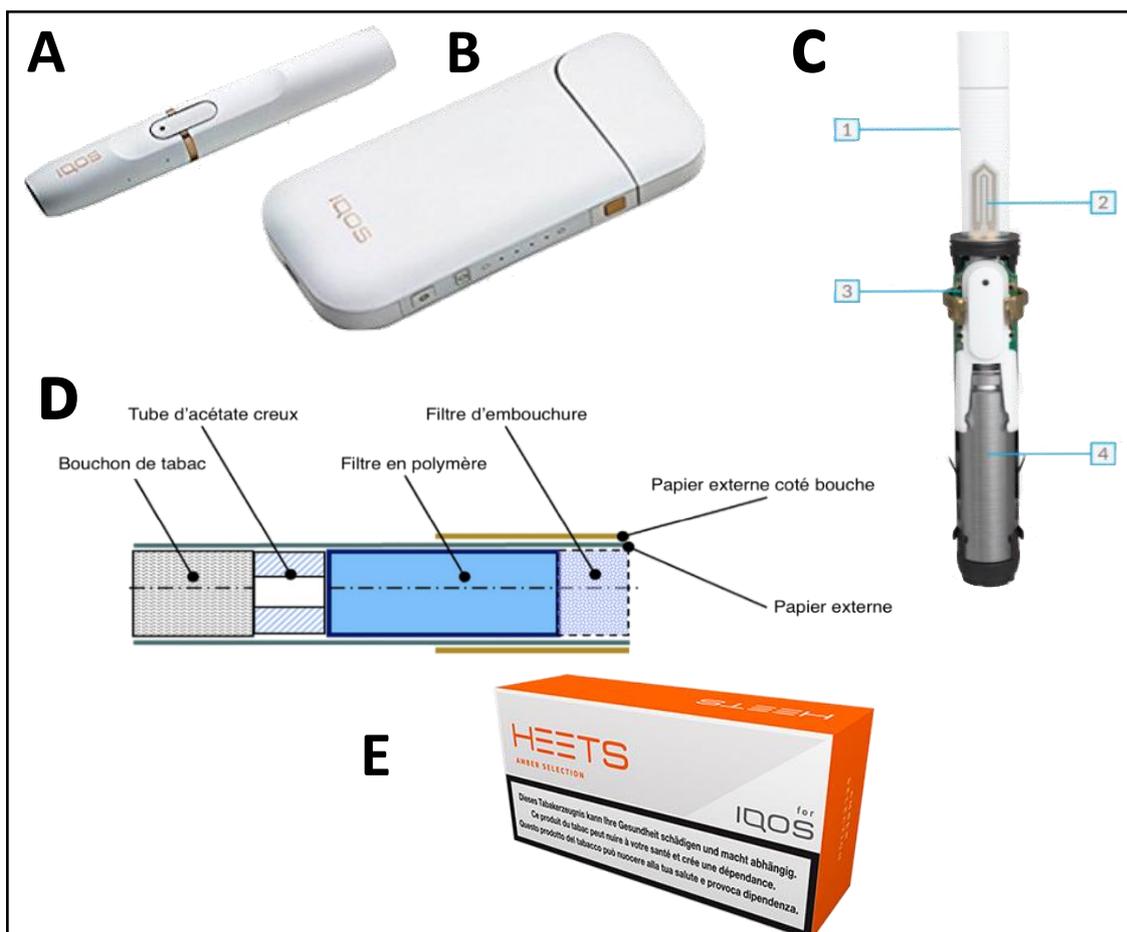


Figure 16 : Présentation du système de tabac chauffé IQOS® de Philip Morris International

(A) Support électronique (B) Chargeur de poche (C) Fonctionnement du support électronique : 1- heet de tabac chauffé 2- lame chauffante 3- bouton d'alimentation 4- batterie (D) Schéma d'un heet de tabac chauffé (E) Paquet de heets « Ambre » acheté en bureau de tabac (Adapté de Smith et al., 2016 et Philip Morris International)

1.2. Cigarette électronique : modèle Mod Box TC®

En ce qui concerne la cigarette électronique, nous avons choisi une cigarette 3^{ème} génération (Figure 17) : le modèle Mod Box TC® de la marque NHOSS® (A). L'e-liquide utilisé est le produit « saveur tabac blond » de la même marque (B). Il contient 16 mg/ml de nicotine, 65% de propylène glycol, 35% de glycérol et des arômes.

La puissance de la Mod Box® (Mb) étant modulable, deux puissances sont testées dans cette étude : une faible (18 W) et une forte (30 W). Une résistance de 0,5Ω a été choisie comme recommandé par le fabricant. La puissance influant sur la quantité de e-liquide consommée, cette dernière est calculée en faisant la différence entre la masse avant et après l'exposition pour vérifier la reproductibilité des expositions.



Figure 17 : Présentation du modèle ModBox TC de NhoSS® (A) et du e-liquide (B)

1.3. Cigarette de référence : 3R4F

La cigarette 3R4F est un standard de référence utilisé par les industriels et les laboratoires de recherche comme élément d'essai cohérent et uniforme pour la réalisation d'études sur les effets de la fumée de cigarette. Elle a été développée par l'Université du Kentucky, le Centre des Produits de Référence du Tabac, et est utilisée depuis 2006. La composition physico-chimique de ces cigarettes et des fumées générées a été caractérisée à de nombreuses reprises dans la littérature (Eldridge et al., 2015).

2. Génération des fumées et aérosols

Les fumées et les aérosols ont été générés par la machine à fumer VC1 de Vitrocell® (Figure 18). Elle est conçue pour répondre aux exigences des expériences *in vitro*. Cette machine utilise une pompe à piston qui permet de mimer l'aspiration. Ce dispositif est relié à un logiciel permettant un paramétrage des profils de bouffée. En effet, le volume, la durée et la fréquence des bouffées ainsi que la durée d'expiration peuvent être modifiés afin de correspondre à des profils standardisés. En effet, afin d'homogénéiser les

expérimentations sur cigarette, des profils standardisés ont été créés par le Centre de coopération pour des recherches scientifiques relatives au tabac (ou CORESTA, Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco) ou encore par Santé Canada (Kogel et al., 2016). Dans cette étude, 2 profils ont été choisis. D'une part, le profil de la norme ISO3308 (une bouffée de 35 ml, de durée 2 s, toutes les minutes) mis en place par la CORESTA, d'autre part, le profil « Health Canada Intense » (ou HCI : une bouffée de 55nl, de durée 2 s, toutes les 30 secondes) décrit par Santé Canada. Dans le profil HCI, le filtre des cigarettes 3R4F doit être en plus bouché sur sa circonférence afin d'obstruer les micropores des filtres de cigarette (Health Canada, 2000). La cigarette électronique doit être activée 1 seconde avant le déclenchement de chaque aspiration.

De plus, tous les compartiments en contact avec la fumée ou les aérosols sont facilement nettoyables, ce qui est très important pour éviter toute contamination du matériel. En effet, des nettoyages à l'alcool doivent être réalisés entre chaque expérience afin d'éviter toute influence des produits résiduels sur l'expérience suivante (Vitrocell systems, n.d.). Des tubes spécifiques à chaque dispositif sont utilisés pour éviter toutes contaminations entre les expériences.

Cette machine s'accompagne d'un module permettant l'exposition de cultures cellulaires à l'interface air-liquide (IAL). Ce module est en permanence traversé par un flux d'eau à 37°C pour que les cellules ne subissent aucun stress lié à la température pendant l'exposition, ainsi que par un flux d'air stérile de 0,5 l.min⁻¹. Une pompe crée une aspiration identique et constante de 5 ml.min⁻¹ dans chaque puits lors des expositions.

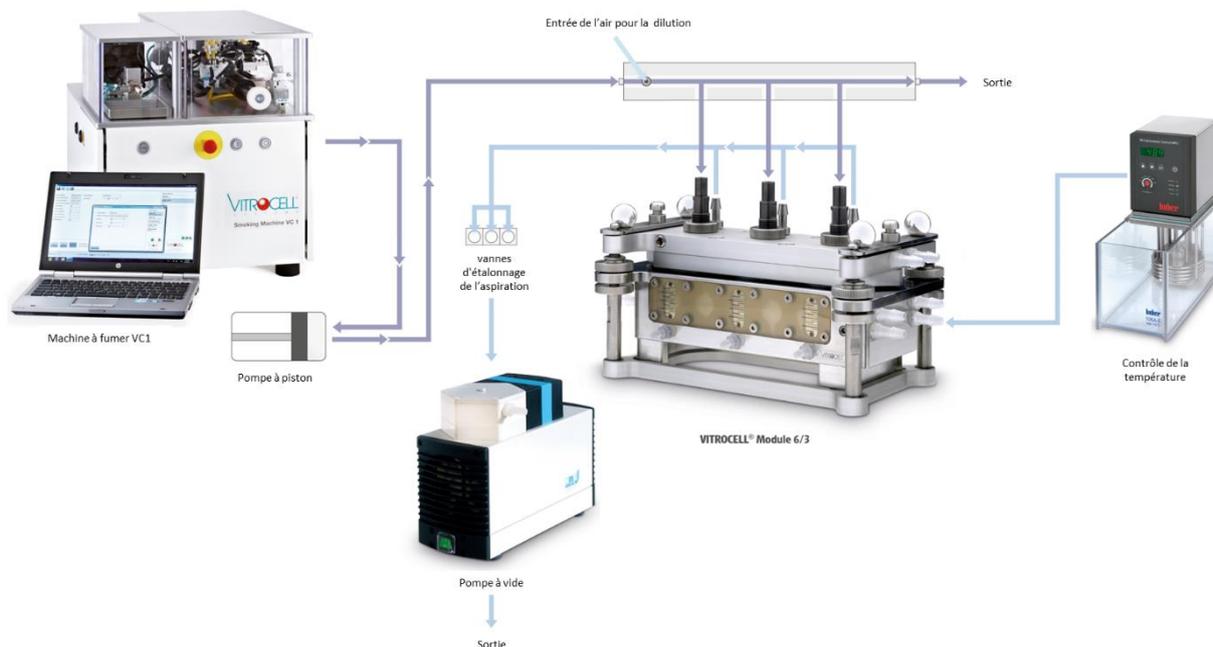


Figure 18 : Schéma de l'exposition avec la machine à fumer VC1 de Vitrocell®

3. Culture cellulaire

Les expériences *in vitro* ont été réalisées avec la lignée cellulaire BEAS-2B (ATCC® CRL9609™). Celle-ci est une lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine adhérente immortalisée par l'adénovirus 12-SV40. Ces cellules sont cultivées dans du milieu LHC-9 (Life Technologie, Californie, USA) auquel des antibiotiques à large spectre sont ajoutés (1% pénicilline/streptomycine). Elles sont repiquées deux fois par semaine, soit dans une flasque T-75 (Corning, New-York, USA) afin de conserver des cellules en culture pour les futures expériences, soit sur des inserts de plaque 6 puits (comportant des pores de 0,4µm) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pour réaliser les expositions. Les cellules sont cultivées pendant 4 jours en phase immergée (milieu dessus et dessous l'insert), puis le milieu de culture est retiré au-dessus de l'insert 24h avant l'exposition pour que les cellules soient en IAL.

4. Mesure de la viabilité cellulaire par un test ATP

Ce test consiste à doser l'ATP présent dans les cellules vivantes, 24 heures après l'exposition, grâce à une réaction métabolique. La luciférine, en présence d'ATP, va pouvoir être recombinaisonnée en oxyluciférine par la luciférase recombinante. Cette recombinaison va émettre un signal de luminescence dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ATP. Ce système de dosage utilise les propriétés d'une luciférase thermostable pour permettre des conditions de réaction qui génèrent un signal stable de luminescence tout en inhibant les enzymes endogènes libérées pendant la lyse cellulaire (par exemple ATPases) (Promega Corporation, n.d.). Ce test a été réalisé par le kit CellTiter-Glo (Promega, Carbonnières les Bains, France). Les valeurs de luminescence obtenues avec les cellules exposées sont comparées à celle des contrôles négatifs (cellules non-exposées) afin d'obtenir un pourcentage de viabilité par rapport au contrôle négatif.

5. Tests de génotoxicité et de mutagénicité

Ces tests ont été réalisés en collaboration avec l'Institut Pasteur de Lille – Laboratoire de toxicologie génétique (Dr. Anne Platel).

5.1. Test des comètes

Le test des comètes a été réalisé en conditions alcalines (pH >13, permettant de détecter les cassures simples et doubles brins). Une version modifiée du test a été également utilisée pour mettre en évidence les lésions oxydatives de l'ADN, grâce à l'ajout de l'enzyme hOGG1 (ou 8-oxoguanine glycosylase) (Singh et al., 1988). Cette enzyme clive au niveau des 8-oxoguanine (8-oxoG) formées après exposition à des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Son ajout permet ainsi de détecter spécifiquement les cassures simples ou double brins causées par des dommages oxydatifs de l'ADN.

Le test des comètes a été réalisé directement après les expositions. La viabilité cellulaire a été estimée en utilisant du bleu de Trypan (les cellules viables apparaissent réfringentes et les cellules mortes incorporent le bleu Trypan). Les cellules ont ensuite été comptées à l'aide du compteur Countess® (Invitrogen™). Les cellules contenues dans les inserts présentant plus de 70 % de viabilité cellulaire ont ensuite été soumises au test des comètes. Trente milles cellules viables de chaque insert ont été mélangées avec 75 µl de LMPA (Low Melting Point Agarose) à 0,5 % m/v maintenu à 37°C puis transférées rapidement sur des lames pré-coatées avec 2 couches d'agarose à point de fusion normal (1,5% et 0,8%, m/v). Quatre lames par insert ont été préparées au total : deux pour le test des comètes classique, deux pour le test des comètes modifié avec hOGG1. Toutes les étapes suivantes ont été effectuées à l'abri de la lumière afin d'éviter des dommages supplémentaires à l'ADN. Les lames ont été immergées pendant au moins 1 heure à 4°C dans une solution de lyse froide (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma base, pH 10, complétée par 1 % Triton X-100, v/v et 10 % DMSO, v/v). Après la lyse, les lames ont été lavées et équilibrées pendant 2 x 5 min dans un tampon enzymatique (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA, pH 8). Chaque lame a ensuite été traitée avec 75 µl de tampon enzymatique seul ou avec une solution diluée d'hOGG1 (dilution 1:10⁵ dans le tampon enzymatique, soit 0,12 unités par gel) et incubée dans une boîte humidifiée à 37°C pendant 20 min ou 10 min, respectivement. A la fin de la réaction enzymatique, les lames ont été lavées rapidement dans du PBS froid. Les lames ont ensuite été placées aléatoirement dans une cuve d'électrophorèse horizontale préalablement remplie de solution d'électrophorèse (1 mM d'EDTA et 300 mM de NaOH, pH>13) et laissées dans la solution pendant 20 min pour permettre le déroulement de l'ADN et la détection des cassures simple brin et des sites alcali-labiles. Ensuite, l'électrophorèse a été effectuée à une température inférieure à 10°C pendant 20 min, en utilisant un courant électrique de 0,7 V/cm (25 V/300 mA). Après l'électrophorèse, les lames ont été neutralisées pendant 10 minutes dans une solution de neutralisation (0,4 M base Trizma, pH 7,5) et les gels ont été déshydratés via deux immersions dans de l'éthanol absolu pendant 5 minutes. Enfin, les lames ont été séchées à l'air et conservées à température ambiante en attendant la lecture. Les lames ont été codées et analysées à l'aveugle après addition de 25 µl d'iodure de propidium (20 µg/ml dans de l'eau distillée) et d'une lamelle. Les lames ont ensuite été examinées à un grossissement x250 à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica Microsystems SAS - DM 2000, Heerbrugg, Suisse) équipé d'un filtre d'excitation de 515-560 nm et d'un filtre barrière de 590 nm, relié par une caméra (CCD IEEE1394 FireWire Allied Vision Technologies) au système d'analyse d'images « Comet Assay IV » (version 4.11, Perceptive Instruments Ltd, Suffolk, Royaume-Uni). Sur chaque lame, 100 cellules ont été comptées.

Le pourcentage d'intensité de la queue de la comète, proportionnelle à la quantité d'ADN endommagé dans celle-ci, est alors mesuré par le logiciel pour chaque cellule. La médiane de ces pourcentages est ensuite calculée. Deux lames (ou répliquats techniques) ayant été réalisées pour chaque insert et pour chacune des deux méthodes (avec hOGG1 ou sans hOGG1), la moyenne des médianes des deux lames est alors calculée.

Cela nous permet donc d'obtenir 4 moyennes associées à 4 expositions indépendantes (n=4) pour chaque condition.

5.2. Test du micronoyau

Le test *in vitro* du micronoyau est un test de génotoxicité pour la détection de mutagènes qui induisent la formation de petits fragments d'ADN, c'est-à-dire des micronoyaux dans le cytoplasme des cellules en interphase. Ces micronoyaux peuvent provenir de fragments acentriques (fragments de chromosomes dépourvus de centromère) ou de chromosomes entiers, incapables de migrer avec le reste des chromosomes lors de l'anaphase de la division cellulaire. Le test *in vitro* du micronoyau a pour but de détecter les agents qui modifient la structure et/ou la ségrégation des chromosomes de manière à conduire à l'induction de micronoyaux dans les cellules en interphase. Les essais sont effectués selon les recommandations de la directive OCDE 487 (OCDE, 2016). Après l'exposition, les cellules sont remises en culture 48h pour qu'il y ait prolifération.

La concentration maximale doit se baser sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une cytotoxicité de 55 ± 5 % selon les paramètres de cytotoxicité recommandés (à savoir une réduction du doublement relatif de la population (RPD) pour les lignées cellulaires).

6. Etude des effets épigénétiques

6.1. Méthylation globale de l'ADN

Afin de quantifier la méthylation globale de l'ADN, l'ADN total a été extrait à l'aide de l'automate Qiacube (Qiagen) en suivant les instructions du kit QiaAmp DNA mini (Qiagen). Ensuite, la quantification a été réalisée avec le kit 5-mC DNA ELISA Kit (Catalog Nos. D5325 & D5326 – ZYMO RESEARCH)

Le kit est conçu pour directement détecter la méthylation de l'ADN grâce à un anticorps monoclonal anti-5-méthylcytosine (anti-5-mC) qui est à la fois sensible et spécifique à la 5-mC. Le kit utilise la technique ELISA indirecte. Des échantillons d'ADN simple brin dénaturés sont appliqués sur les surfaces des puits dans du tampon de revêtement 5-mC. L'anticorps monoclonal anti 5-Méthylcytosine (mAb Anti5-mC) et l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) sont préparés dans du tampon ELISA 5-mC et ajoutés aux puits. La détection de 5-mC se produit après l'ajout du développeur HRP. La lecture colorimétrique est quantifiable par spectrophotométrie à l'aide d'un lecteur de microplaques à 405 – 450nm.

6.2. Modifications d'histones

Après avoir exposées les cellules, elles sont décollées de l'insert avec 500 µl de trypsine qui sera ensuite neutralisée avec 500 µl de milieu avec sérum. Le culot cellulaire est lavé une fois avec 1 ml de PBS puis séché et stocké à -80°C. Le kit EpiQuik™ Total Histone Extraction kit (Base Catalog # OP-0006, Epigentek) a été utilisé afin d'obtenir des extraits acides contenant les histones. Différentes modifications d'histones ont été mesurées :

- L'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3
- La tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3
- La tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3
- La tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3

Ces différentes modifications ont été mesurées avec les kits d'Epigentek :

- EpiQuik™ Global Acetyl Histone H3-K9 Quantification Kit (Base Catalog # P-4011)
- EpiQuik™ Global Tri-Methyl Histone H3-K9 Quantification Kit (Base Catalog # P-3035)
- EpiQuik™ Global Tri-Methyl Histone H3-K4 Quantification Kit (Base Catalog # P-3027)
- EpiQuik™ Global Tri-Methyl Histone H3-K27 Quantification Kit (Base Catalog # P-3043)

Les histones H3 totales sont aussi dosées avec le kit (EpiQuik™ Total Histone H3 Quantification Kit (Base Catalog # P-3063)) afin de normaliser les résultats. Dans ces kits, la protéine histone H3 ou les histones H3 modifiées sont capturées dans les puits recouverts d'un anticorps anti-histone H3 ou d'une des modifications. Les histones H3 capturées peuvent alors être détectées avec un anticorps de détection spécifique de chaque modification, suivi d'un réactif de développement de fluorescence (Anticorps secondaire fluorescent). La quantité d'histone est proportionnel à l'intensité de fluorescence obtenue avec une longueur d'onde de 530_{EX}/590_{EM} nm.

6.3. Evaluation de l'expression de microARN par RTqPCR

Les microARNs ont été transcrit en ADNc à l'aide du kit TaqMan® Advanced miRNA Assays (Applied biosystems, CA, USA). Cette réaction se déroule en 4 étapes : 1 – Ajout d'une queue poly-A ; 2 - Ligation de l'adaptateur ; 3 – Réverse transcription (RT) ; 4 – Pré-amplification. Les qPCR ont ensuite été réalisées avec le thermocycleur StepOnePlus (Applied Biosystems), en utilisant le TaqMan® Fast advanced Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) et les sondes TaqMan suivantes : hsa-miR-150-5p (477918_mir - UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG)(Xue and Li, 2018), hsa-mir-130a-5p (483130_mir - GCUCUUUUCACAUUGUGCUACU), hsa-mir-200b-3p (477963_mir -UAAUACUGC CUGGUAUGAUGA), hsa-mir-4521(478916_mir - GCUAAGGAAGUCCUGUCUCAG), hsa-mir-21-5p (477975_mir - UAG CUUAUCAGACUGAUGUUGA), hsa-mir-218-5p (477977_mir – UUGUGCUUGAUCUAACCA UGU), hsa-miR-223-

3p (477983_mir - UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA), hsa-let-7a-5p (478575_mir - UGAG GUAGUAGGUUGUAUAGUU), hsa-let-7c-5p (478577_mir - UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU), miR endogène hsa-miR-423-5p (478090_mir - UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU)). Les courbes d'amplification ont été lues avec le logiciel StepOne V2.1 en utilisant la méthode du seuil de cycle comparatif. Les résultats sont exprimés en quantité relative ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) calculés par la normalisation avec le microARN endogènes hsa-423-5p et les cellules témoins arbitrairement fixés à une valeur de 1.

7. Analyses transcriptomiques

7.1. Analyse de l'expression génique par puces à ADN_c pangénomiques

Vingt-quatre heures après l'exposition, l'ARN total a été extrait à l'aide du mini-kit RNeasy (QIAGEN, Courtaboeuf, France) sur l'automate QIAcube conformément aux instructions du fabricant. Le reste de la partie expérimentale de l'étude transcriptomique (rétrotranscription, marquage des ADN_c, hybridation) a été réalisée par la plateforme de transcriptomique du Centre de Biologie et de Pathologie du CHR de Lille. Le rendement et la qualité de l'ARN total ont été évalués de manière plus approfondie avec le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Massy, France). Pour chaque échantillon, l'ADN_c a été fragmenté et hybridé sur une puce 8x60k (Agilent Technologies). Le marquage, l'hybridation et la détection des ADN_c ont été effectués conformément aux instructions du fournisseur (Agilent Technologies). Pour chaque puce, des ADN_c marqués à la 3-cyanine ont été synthétisés avec le kit de marquage QuickAmp à partir de 50 ng d'ARN total. Des ARN Spike-In ont été ajoutés à tous les tubes et utilisés comme contrôle positif des étapes de marquage et d'amplification. Les ADN_c ont été purifiés et 600 ng de chaque ADN_c ont ensuite été hybridés et lavés. Les puces à ADN_c ont été scannées sur un scanner Agilent G2505C et les données ont été extraites à l'aide du logiciel Agilent Feature Extraction Software® (FE version 10.7.3.1). Les fichiers de résultats obtenus ont ensuite été chargés sur le logiciel R où ils ont été analysés en utilisant le package « LIMMA » (« Linear Model for Microarray Data »). Afin de prendre en compte la grande variabilité sur l'estimation des variances des gènes généralement observée pour de petits effectifs, une variante bayésienne du t-test (disponible dans le package LIMMA) a été utilisée pour déterminer les gènes dérégulés de manière significative par rapport aux contrôles négatifs. Les p-values obtenues ont ensuite été ajustées selon la méthode « FDR » (False-Discovery Rate ou taux de fausses découvertes) pour tenir compte de la multiplication des tests. Les données ont été exprimées en logarithme binaire du « fold-change » (FC) moyen ($\pm \log_2[|FC|]$) en fonction du signe du FC). Le « fold-change » est défini selon les formules ci-dessous :

- En cas d'expression augmentée vs contrôle négatif : $\frac{\text{Intensité témoin exposé}}{\text{Intensité témoin non exposé}}$
- En cas d'expression diminuée vs contrôle négatif : $-1 * \frac{\text{Intensité témoin non exposé}}{\text{Intensité témoin exposé}}$

NB : le FC ne peut pas avoir des valeurs entre 1 et -1. Les FC de chaque gène ont été obtenus à partir de 4 échantillons pour chaque condition (n=4 cultures indépendantes). Les gènes ont été considérés « significativement dérégulés » en cas de p-value ajustée < 0,05.

7.2. Analyse fonctionnelle via Ingenuity Pathways Analysis (IPA®)

Pour l'analyse fonctionnelle, seuls les gènes dérégulés significativement et avec un |fold change| > 1,5 ont été retenus. Les causes et conséquences biologiques potentielles de la dérégulation de ces gènes ont été prédites via l'utilisation du logiciel « Ingenuity Pathway Analysis » (IPA®, QIAGEN Bioinformatics, USA). Les outils « Canonical Pathways », « Diseases & (Bio)Functions » et « Upstream Regulators » ou « Voies canonique », « Maladies et fonction biologique » et « Régulateur en amont » en française, de ce logiciel ont été utilisés. Les « Voies canoniques » sont des voies idéalisées ou généralisées qui représentent les propriétés communes d'un module ou d'une voie de signalisation particulière (ex : « Réponse au stress oxydatif médiée par NRF2 ...»). Si les « Voies canoniques » renvoient donc à des voies précises, les « Maladies et Fonctions biologique » prédisent les effets biologiques et potentiel pathologie induits par l'exposition (ex : « Survie cellulaire », « Synthèse des lipides », « Réponse inflammatoire »). Enfin, les « régulateurs en amont » (ex : ERK, STAT3...) prédisent quelles molécules « en amont », dites « régulatrices », ont pu causer les dérégulations géniques observées. En effet, la dérégulation de la plupart des transcrits dans un système est généralement le fait de l'activation ou de l'inhibition de protéines en amont (facteurs de transcription, kinases, transporteurs...). Cette activation ou inhibition peut être consécutive à une augmentation ou diminution de leur expression génique mais ce n'est pas toujours le cas. Il se peut très bien que la protéine ait été simplement modifiée (par exemple une phosphorylation activatrice ou inhibitrice secondaire à un stress oxydatif), sans pour autant qu'il y ait une modification au niveau transcriptomique. L'outil d'IPA® est donc intéressant puisqu'il permet d'émettre des hypothèses sur l'activité effective de ces régulateurs en se basant sur l'expression des transcrits qui en dépendent dans notre système. Chacune des voies, fonctions ou molécules présentes dans ces outils est associée à des gènes selon la littérature. Pour un ensemble donné de gènes dérégulés, IPA® calcule alors deux éléments statistiques permettant l'analyse fonctionnelle (INGENUITY SYSTEMS, n.d.) :

1) Une « p-value d'association ou de chevauchement » : calculée en utilisant le test exact de Fisher unilatéral droit, elle reflète la probabilité que l'association/le chevauchement entre les gènes dérégulés et les gènes associés à un processus/une voie/un régulateur soit due au hasard seulement. Ainsi, plus le nombre de gènes associés à un processus est élevé, plus la p-value est faible.

2) Un « z-score » : fait une prédiction sur l'activation ou l'inhibition du processus ou de la molécule en question. S'il prend une valeur positive, il s'agit d'une activation, s'il prend une valeur négative, il s'agit d'une inhibition. Il est calculé selon la formule ci-dessous :

$$z = \frac{\sum w_i x_i}{\sqrt{\sum w_i^2}}$$

avec : $x_i = 1$ si le sens de sa dérégulation active le processus ou -1 s'il l'inhibe selon la littérature ; $w_i =$ le « poids » de la preuve dans le processus selon la littérature

$$w_i = \frac{|N_{activation} - N_{inhibition}|}{N_{activation} + N_{inhibition} + 1}$$

avec : $N_{activation}$ = nombre de publications montrant une activation du processus ; $N_{inhibition}$ = nombre de publications montrant une inhibition du processus. Puisque des inconsistances (certaines données de la littérature ne s'appliquant pas à notre situation ou tout simplement des erreurs dans la littérature) sont possibles, IPA® précise que seuls les z-score > 2 ou < -2 doivent être considérés comme « statistiquement significatifs ».

7.3. Analyse fonctionnelle via Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Afin d'approfondir les résultats obtenus par IPA®, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement d'ensemble de gènes (GSEA). C'est une méthode de calcul qui détermine si un ensemble de gènes défini a priori présente des différences statistiquement significatives et concordantes entre deux états biologiques. Ce logiciel va utiliser des ensembles de gènes. En effet, il contient 32 880 ensembles de gènes de la base de données de signatures moléculaires (MSigDB) qui sont divisés en 9 collections principales et plusieurs sous-collections. Ici, j'ai choisi d'utiliser la première d'entre elles : Hallmark. Les ensembles de gènes Hallmark résument et représentent des états ou des processus biologiques spécifiques bien définis (réponse inflammatoire, métabolisme des xénobiotiques...). (Liberzon et al., 2015).

GSEA calcule plusieurs paramètres afin d'interpréter les enrichissements (Figure 19) :

- Le score d'enrichissement (ES) reflète le degré auquel un ensemble de gènes est surreprésenté en haut ou en bas d'une liste classée de gènes. GSEA calcule l'ES en parcourant la liste classée des gènes, en augmentant une statistique de somme courante lorsqu'un gène se trouve dans l'ensemble de gènes et en la diminuant lorsqu'il ne l'est pas. L'ampleur de l'augmentation dépend de la corrélation du gène avec le phénotype. L'ES est l'écart maximal par rapport à zéro rencontré en parcourant la liste. Un ES positif indique un enrichissement du jeu de gènes en haut de la liste classée ; un ES négatif indique un enrichissement du jeu de gènes au bas de la liste classée et une corrélation avec le second phénotype utilisé : ici, le contrôle négatif.
- Le score d'enrichissement normalisé (NES) est la principale statistique permettant d'examiner les résultats d'enrichissement de l'ensemble de gènes. En normalisant le score d'enrichissement, GSEA tient compte des différences de taille de l'ensemble de gènes et des corrélations entre les ensembles

de gènes et l'ensemble de données d'expression ; par conséquent, les scores d'enrichissement normalisés (NES) peuvent être utilisés pour comparer les résultats d'analyse entre les ensembles de gènes.

- Le taux de fausses découvertes (FDR) est la probabilité estimée qu'un ensemble de gènes avec un NES donné représente une découverte faussement positive. Par exemple, un FDR de 25 % indique que le résultat est susceptible d'être valide 3 fois sur 4. Le rapport d'analyse de GSEA met en évidence les ensembles de gènes d'enrichissement avec un FDR inférieur à 25 % comme étant les plus susceptibles de générer des hypothèses intéressantes et de conduire des recherches supplémentaires, mais fournit des résultats d'analyse pour tous les ensembles de gènes analysés. En général, étant donné le manque de cohérence dans la plupart des ensembles de données d'expression et le nombre relativement faible d'ensembles de gènes analysés, un seuil FDR de 25 % est approprié.
- La valeur p nominale estime la signification statistique du score d'enrichissement pour un seul ensemble de gènes

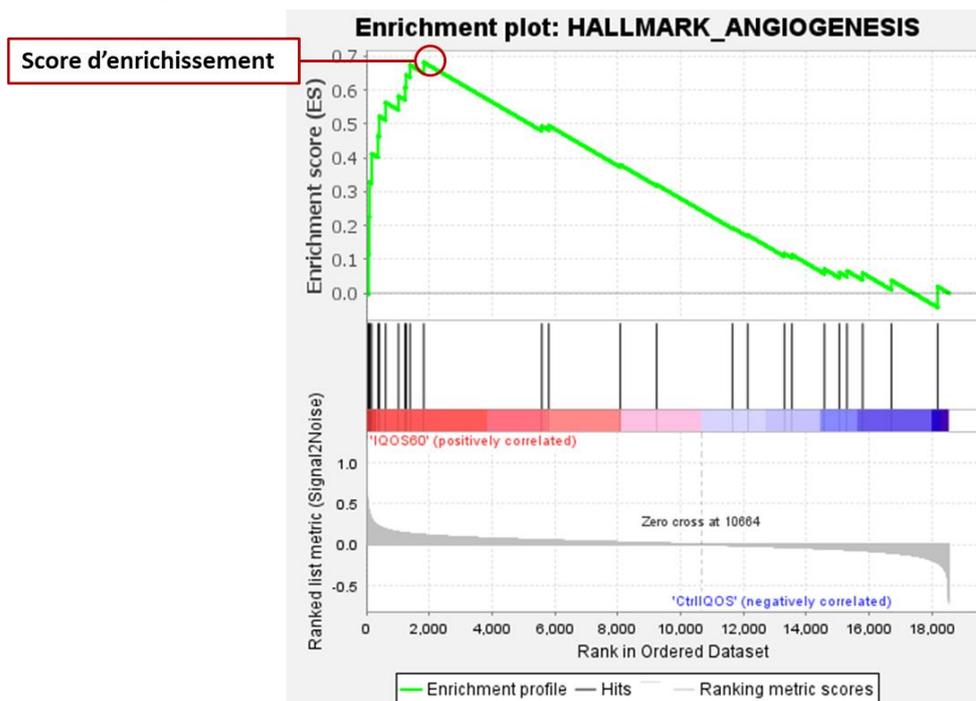


Figure 19 : Graphique d'enrichissement obtenu avec GSEA

7.4. Analyses transcriptomiques par RTqPCR

L'expression des gènes cibles a été mesurée par RTqPCR. L'ARN total a été transcrit en ADNc à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied biosystems, CA, USA). Les qPCR ont été réalisées avec le thermocycleur StepOnePlus (Applied Biosystems), en utilisant le TaqMan Fast advanced Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) et les sondes TaqMan suivantes : FOS (Hs99999140_m1), JUN (Hs01103582_s1), NOQ1

(Hs00168547_m1), HMOX1 (Hs01110250_m1), IL1B (Hs01555410_m1), IL6 (Hs00174131_m1), CYP1A1 (Hs01054797_g1), CYP1B1 (Hs00164383_m1), MSMO1 (Hs00932159_m1), HMGCS1 (Hs00940429_m1), ENO1 (Hs00361415_m1), ALDOC (Hs00902799_g1), BCL2 (Hs00608023_m1), CHI3L1 (Hs01072228_m1), MMP1 (Hs00899658_m1), MMP3 (Hs00968308_m1), TIMP1 (Hs00171558_m1), CYP4B1 (Hs01086311_m1), 18S (Hs99999901_s1). Les courbes d'amplification ont été lues avec le logiciel StepOne V2.1 en utilisant la méthode du seuil de cycle comparatif. La quantification relative ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) des ARNm a été normalisée par rapport à l'ARNm endogène 18S et aux cellules témoins arbitrairement fixés à une valeur de 1.

7.5. Analyse de l'expression protéique par Western Blot

7.5.1. Dosage protéique

De manière à déterminer précisément la quantité de protéines dans les échantillons, un dosage par méthode BCA est effectué. Les protéines sont récoltées et quantifiées grâce à une technique BCA (Bicinchomonic Acid Assay) colorimétrique (ThermoScientifique®). Dans une plaque 96 puits, les protéines sont ajoutées avec une solution de réactif contenant de l'acide bicinchoninique à pH 11 et une solution de sulfate de cuivre à un rapport v/v 50 : 1.

Les protéines vont réduire l'ion cuivrique Cu (II) en Cu(I) en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique étant un réactif chromogène spécifique de l'ion Cu (I), il va former un complexe pourpre, avec une absorbance optique de 562 nm. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration des protéines.

En parallèle, une gamme étalon constituée de BSA (Bovin serum albumin) à une concentration de 0,025 à 2 mg/mL est utilisée. La plaque est incubée pendant 30 minutes à 37 °C. L'absorbance est ensuite mesurée dans l'automate Tecan © à 562 nm. Après avoir déterminé la quantité de protéines dans les échantillons, les analyses par Western Blot peuvent être effectuées.

7.5.2. Western blot

Cette méthode permet la séparation et l'identification d'une ou plusieurs protéines. Ce test a été effectué sur des échantillons de protéines totales préalablement collectés 24 heures après les expositions.

- **Etape de migration :**

Cette étape impliquait la réalisation d'une électrophorèse pour séparer les protéines sur un gel. Pour commencer, les protéines ont été diluées avec de l'eau ultra pure, un agent réducteur (10X) et du dodécylsulfate de lithium (LDS) (4X) afin d'assurer une quantité uniforme de protéines pour toutes les conditions. Ensuite, les protéines ont été réduites et dénaturées grâce à l'agent réducteur, au LDS et à un chauffage à 70°C pendant 10 minutes. L'agent réducteur a pour fonction de réduire les protéines, tandis que le LDS les charge négativement, permettant ainsi leur migration.

Le gel Bolt 4-12% Bis-Tris a été utilisé avec le tampon de migration MES SDS Bolt™ (1X). Le premier puits a été rempli avec une échelle de taille Novex® Sharp Prestained, tandis que les autres puits ont été remplis avec les échantillons de protéines diluées (20 µg). La migration a ensuite été initiée. Une tension de 200 V et une intensité de 160 mA ont été appliquées aux protéines pendant 20 minutes, ce qui a provoqué leur migration du pôle négatif (en haut du gel) vers le pôle positif (en bas du gel).

- **Etape de transfert semi-sec :**

Cette étape consiste à transférer les protéines piégées dans les gels vers une membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF). Pour réaliser cela, un tampon de transfert a été préparé en utilisant de l'éthanol absolu, du tampon de transfert et de l'eau ultra pure. La membrane PVDF a été activée 1 min dans de l'éthanol absolu et a ensuite été immergée dans le tampon de transfert avec les papiers Whatman. Pour la suite du processus, un montage précis doit être réalisé. Une première couche de 3 ou 4 papiers Whatman doit être placée en premier sur la cassette de migration, préalablement bien humidifiée. Ensuite, la membrane, suivie du gel, et enfin du reste des papiers Whatman doivent être ajoutés par-dessus.

Le transfert semi-sec a été réalisé en appliquant un champ électrique de 25 V avec une intensité de 1A pendant 30 minutes à la cassette. Ce processus a permis aux protéines contenues dans le gel de migrer sur la membrane de PVDF. Une fois le transfert terminé, la membrane a été colorée avec du rouge ponceau pour faciliter la découpe. Les membranes ont été découpées en fonction de l'échelle choisie : > 20 kDa, 20-80 kDa, < 80 kDa.

Afin de bloquer les sites non spécifiques, la membrane a ensuite été placée dans une solution de TBS-T contenant 5% de lait ou 5% BSA (en fonction de l'anticorps primaire utilisé ensuite).

- **Etape de révélation :**

Cette étape a pour objectif de détecter les protéines d'intérêt présentes sur la membrane en utilisant des anticorps marqués. L'anticorps primaire se lie spécifiquement à la protéine cible. Dans cette étude, les membranes ont été incubées pendant toute une nuit à 4°C avec des anticorps primaires spécifiques d'HMOX-1 (1/1000^{ème}, Santa Cruz), NQO1 (1/1000^{ème}, Novus Biologicals), AKT (1/1000^{ème}, Cell Signaling), pAKT (1/1000^{ème}, Cell Signaling), pERK1/2 (1/2000^{ème}, Cell Signaling), ERKtotal (1/1000^{ème}, Cell Signaling) et β-actine (1/50000^{ème}, R&D). Les anticorps primaires sont dilués dans une solution de TBS-T contenant 5% de lait ou 5% de BSA (en fonction de la fiche technique fournisseur). Après rinçages au TBS-T, les anticorps fixés aux protéines sont reconnus par un second anticorps marqué (anticorps secondaire). Dans cette étape, des anticorps anti-souris (1/10000^{ème}, Cell Signaling) ou anti-lapin (1/10000^{ème}, Cell Signaling) conjugués à l'enzyme HRP dilués dans une solution de TBS-T avec 5% de lait ont été utilisés. Après une incubation d'une heure, les membranes ont été lavées au TBS-T. Enfin, une solution d'ECL (Enhanced Chemiluminescence) a été appliquée pour générer un signal luminescent qui peut être détecté par la caméra CCD (VILBER). La

densité lumineuse, témoignant de la quantité de protéine, est ensuite évaluée par le logiciel imageJ grâce aux photos prises avec la caméra du système VILBER.

La β -actine ou les formes totales des protéines étudiées (AKT et ERK total) ont servi de référence, permettant la normalisation des résultats entre les échantillons.

Les résultats sont toujours présentés en quantité relative (FC) normalisés par la protéine de ménage et le contrôle négatif.

8. Evaluation de l'activité de NRF2

8.1. Extraction des protéines nucléaires

L'extraction des protéines nucléaires a été réalisée avec le kit NRF2 (40010 - Nuclear Extract Kit, Active Motif, Rixensart, Belgium). Pour résumer, les cellules ont été décollées à l'aide d'un grattoir. La suspension de cellules a ensuite été transférée dans un tube pré-refroidit et centrifugé à 200 g à 4°C pendant 5 minutes. Sur glace, après avoir retiré le surnageant, les cellules ont été suspendues délicatement dans une solution hypotonique puis incubées pendant 15 minutes sur glace, une solution de détergent a ensuite été ajoutée. Après 30 s de centrifugation à 14000 g à 4°C, le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est retiré et une solution de tampon de lyse est ajoutée. Puis, une incubation de 30 minutes sur glace à 150 RPM est faite sur agitateur orbital. Pour finir, l'échantillon est vortexé pendant 30 s à la vitesse maximale et centrifugé une dernière fois à 14000 g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant qui contient les extraits nucléaires est transféré dans des micros tubes puis conservé à une température de -80°C.

8.2. Dosage Bradford adapté pour les protéines nucléaires

La concentration de protéique est ensuite mesurée par dosages colorimétriques par la technique Bradford adaptée aux protéines nucléaires. En premier lieu, la solution de tampon de lyse utilisée pour extraire les acides nucléaires doit être réalisée afin de diluer une solution de BSA à 2 mg/ml. Une gamme par des dilutions en cascade (concentrations allant de 3,125 à 50 mg/ml) a ensuite été faite. La gamme, les échantillons de protéines ont ensuite été déposés dans une plaque transparente 96 puits avant qu'une solution de Bradford soit ajoutée afin de faire apparaître une coloration bleue proportionnelle à la concentration protéique. Après 5 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm.

8.3. Mesure de l'activité de NRF2

L'activité du facteur de transcription NRF2 est quantifiée à l'aide d'un ELISA en utilisant le kit TransAM NRF2. La plaque de 96 puits utilisée est pré-coatée avec des oligonucléotides contenant des sites de liaison consensus ARE de NRF2. La forme active de NRF2 présente dans les extraits nucléaires, ayant transloqué dans le noyau cellulaire, se lie spécifiquement à ces oligonucléotides. L'anticorps primaire (dilution 1/1000^{ème}) est ensuite ajouté pendant 1 h pour détecter NRF2 en se liant à un épitope spécifique sur la protéine NRF2.

L'introduction d'un anticorps secondaire conjugué à la HRP (dilution 1/1000^{ème}) pendant 1 h permet une détection colorimétrique sensible, qui peut être quantifiée facilement par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm, avec une référence à 655 nm.

9. Évaluation de la sénescence par marquage de la β -galactosidase

La sénescence a été évaluée 48 heures après exposition des cellules. Les cellules ont été marquées pour mesurer l'activité β -galactosidase (marquée en bleu) avec le kit Senescence β -Galactosidase Staining Kit #9860 (Cell Signaling Technology,). Les cellules sont fixées avec une solution de fixation pendant 15 min. Ensuite, elles sont incubées toutes une nuit en présence de la solution de coloration. Pour chaque condition, 10 photos ont été prises aléatoirement sur l'ensemble des puits. Ensuite, elles ont été randomisées et lues à l'aveugle pour déterminer l'intensité de bleu avec logiciel ImageJ.

10.Évaluation de la fonction mitochondriale et de la glycolyse

10.1. Etude de la fonction mitochondriale : mesure du taux de consommation en oxygène (OCR)

La mesure de l'OCR, suite à l'ajout d'inhibiteur ou d'activateur de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM), permet d'isoler la respiration d'origine mitochondriale et d'en déduire les différents processus qui consomment l'oxygène (Figure 20)(Underwood et al., 2020) :

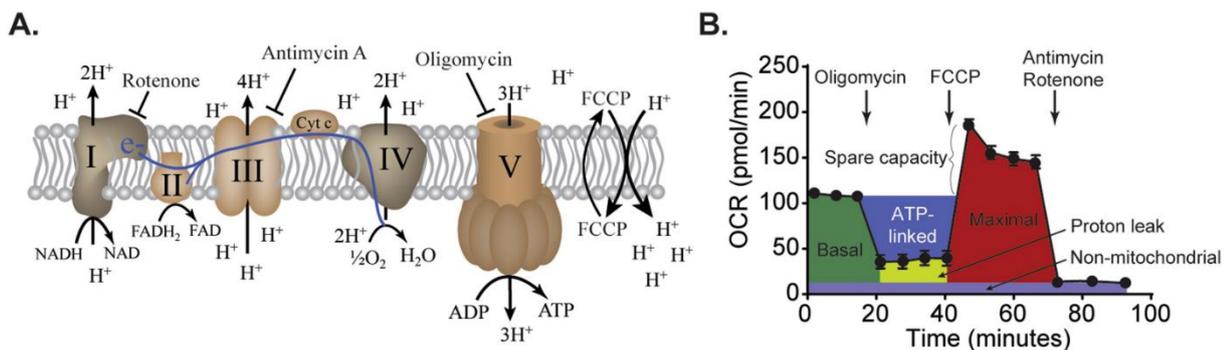


Figure 20 : Interprétation des mesures du taux de consommation d'oxygène (OCR)

(A) Dessin simplifié de la chaîne de transport d'électrons située dans la membrane mitochondriale interne. Le transfert d'électrons est couplé au transfert de protons (H^+) à travers la membrane mitochondriale interne dans l'espace de la membrane interne, créant un gradient de protons. Ce gradient est utilisé par le complexe V pour la synthèse d'ATP. Les protons réagissent avec l'oxygène pour générer de l'eau. Ainsi, l'OCR peut être surveillé par les analyseurs Seahorse XF et utilisé comme substitut de la respiration mitochondriale. Les cibles des inhibiteurs (oligomycine, antimycine A et roténone) et du découpleur (FCCP) sont indiquées. (B) Une courbe OCR représentative montrant les réponses caractéristiques aux inhibiteurs mitochondriaux et au découpleur FCCP. (Underwood et al., 2020)

- L'ajout d'un inhibiteur de l'ATP synthase (oligomycine) permet de déduire l'oxygène utilisé pour la production d'ATP.

- L'ajout d'un agent découplant (Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)) inhibe le gradient de protons et la production d'ATP. La cellule fait alors face à une demande énergétique croissante, maximisant les réactions d'oxydation et la consommation d'O₂. Le FCCP est utilisé pour mesurer la capacité de réserve mitochondriale, qui est la capacité des mitochondries à faire face à une demande énergétique croissante.
- L'injection d'un mélange d'inhibiteurs de la CRM permet de déduire la respiration non mitochondriale par inhibition du complexe 1 par l'antimycine et du complexe 3 par la roténone (Sotty, 2019).

Le calcul des différents paramètres a été réalisé selon la méthode suivante (Tableau 18) (Divakaruni et al., 2014; Sotty, 2019) :

Tableau 18 : Paramètres obtenus par la mesure de l'OCR

Paramètre	Définition	Méthode de calcul
Respiration basale	Respiration mitochondriale principalement définie par le taux d'utilisation de l'ATP et la fuite de proton	[Mesure précédant l'ajout d'inhibiteurs] – [respiration non mitochondriale]
Respiration liée à la production d'ATP	Respiration inhibée par l'ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase)	[Respiration basale] – [respiration liée à la fuite de protons]
Respiration liée à la fuite de proton	La force protomotrice n'est pas entièrement consommée par l'ATP synthase. Certains protons fuient et retournent dans la membrane interne en consommant le potentiel de membrane, et stimulent l'activité de la chaîne de transport des électrons pour la maintenir	[Mesure après injection d'oligomycine et précédant l'ajout de FCCP] - [respiration non mitochondriale]
Respiration maximale	Elle reflète la capacité totale d'oxydation dans la chaîne de transport des électrons. La FCCP perméabilise la membrane interne et dissipe le $\Delta\psi_m$. L'activité de la chaîne de transport des électrons augmente à son maximum pour maintenir la force protomotrice.	[Respiration après injection de FCCP] – [respiration non mitochondriale]
Capacité de réserve	Utilisée pour faire face à une augmentation de la demande d'ATP	[Respiration maximale] – [respiration basale]
Respiration non mitochondriale	Il existe des oxydases non mitochondriales. Des inhibiteurs des complexes 1 et 3, respectivement la roténone et l'antimycine A sont ajoutés pour stopper la chaîne respiratoire.	Mesure qui suit l'ajout du mélange roténone/ antimycine A

10.2. Évaluation de la glycolyse : Mesure du taux d'acidification extracellulaire (ECAR)

Pour le test d'évaluation de la glycolyse (Figure 21), un milieu de base est utilisé afin que les cellules soient privées de nutriments. Le premier paramètre obtenu est l'acidification basale, qui doit refléter la quantité de glucose stockée dans les cellules.

- L'ajout de glucose augmente l'ECAR puisque les cellules l'utilisent et peuvent le fermenter en lactate.
- L'oligomycine A, injectée ensuite, inhibe l'ATP-synthase et oblige ainsi les cellules à produire de l'ATP principalement via la glycolyse. Cela entraîne une élévation supplémentaire de l'ECAR.

- L'injection de 2-désoxy-D-glucose(2-DG) inhibe complètement la glycolyse et diminue l'ECAR et permet d'observer l'acidification non glycolytique (Hlozková and Starková, 2018).

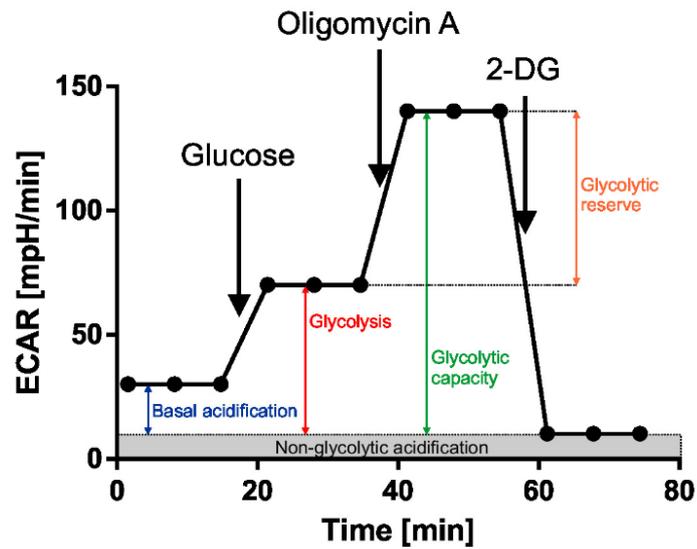


Figure 21 : Interprétation du test d'évaluation de la glycolyse (Hlozková and Starková, 2018)

11. Analyses statistiques

Le logiciel GraphPad Prism® 8 a été utilisé afin de réaliser l'analyse statistique (test de Man Withney) pour l'ensemble des tests réalisés mise à part l'analyse transcriptomique (CF 7.2 et 7.3) et l'analyse des micronoyaux (Test exact de Fisher).

RESULTATS & DISCUSSION

1. Comparaison de la cytotoxicité des émissions d'e-cig, d'HTP et de cigarette

1.1. Evaluation de la viabilité cellulaire par mesure de l'ATP intracellulaire

Des cellules bronchiques humaines BEAS-2B ont été exposées aux émissions des différents dispositifs (HTP, e-cig réglée à 18 W (Mb-18W) ou à 30 W (Mb-30W) et cigarette de référence 3R4F) avec deux profils de bouffée différents (ISO3308 et HCl). Nous avons utilisé différents profils de bouffée car les études topographiques (qui analysent la façon dont une personne fume sa cigarette) ont montré que le régime de fumage influençait la composition de la fumée de cigarette, la pyrolyse et la condensation des produits chimiques à l'intérieur de la cigarette (Pauwels, 2021), et donc potentiellement la toxicité des émissions. Ainsi un régime de fumage ou de vapotage est défini par différents paramètres : nombre de bouffées par cigarette, durée de la bouffée (en s), volume de la bouffée (en ml) et l'intervalle inter-bouffées (temps entre bouffées successives (en s)). Il paraît donc intéressant dans notre étude de tester le profil le plus utilisé dans les études sur la cigarette (ISO3308 : bouffée de 35 ml pendant 2 s, 1 bouffée/min) et le profil intense décrit par Santé Canada (HCl : bouffée de 55ml pendant 2 s, 2 bouffées/min).

Une mesure de l'ATP intracellulaire a été réalisée après les expositions afin de déterminer la viabilité cellulaire. En effet, la quantité d'ATP étant corrélée aux nombres de cellules présentes (une diminution d'ATP correspondra à une diminution de la viabilité cellulaire), elle nous permet d'obtenir un pourcentage de viabilité en comparant les cellules exposées aux contrôles négatifs (Figure 22). Les cellules ont été exposées à un nombre de bouffées croissant afin de faire varier les doses des différentes émissions. Pour le HTP et les e-cigs, les expositions sont de 60, 120, 240 et 360 bouffées avec le profil HCl et de 30, 60, 120 et 180 bouffées avec le profil ISO3308, correspond pour chacun de ces profils à une exposition de 30, 60, 120 et 180 min. Concernant la cigarette 3R4F, le nombre de bouffées est plus faible du fait de la plus forte toxicité attendue : 2, 4, 10, 20 et 30 bouffées avec le profil HCl et à 2, 8, 16, 24 et 32 bouffées avec le profil ISO3308.

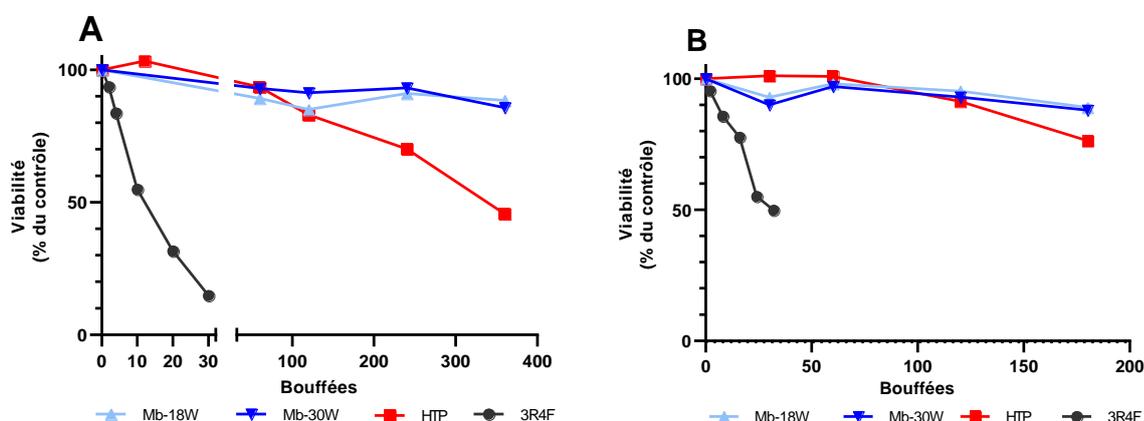


Figure 22 : Viabilité cellulaire (exprimée en fonction du nombre de bouffées) après exposition à l'e-cig (Mb-18W et Mb-30W), le HTP et la cigarette 3R4F sur des cellules BEAS-2B.

(A) Exposition avec le profil HCl (B) Exposition avec le profil ISO3308. La viabilité a été évaluée en mesurant la teneur en ATP intracellulaire dans les cellules 24h après l'exposition, en fonction du nombre de bouffées. Les résultats sont obtenus à partir de n=3 cultures indépendantes pour chaque condition et sont exprimés en moyenne des pourcentages par rapport à la teneur en ATP dans les cellules non exposées, fixée arbitrairement à une valeur de 100 %.

L'exposition à la cigarette 3R4F entraîne une cytotoxicité plus importante que les autres dispositifs, quel que soit le profil d'exposition utilisé. En effet, la viabilité chute à 14% et 50% après 30 et 32 bouffées d'exposition avec les profils HCl et ISO3308, respectivement. Concernant le HTP, une diminution de la viabilité est observée avec le profil HCl après une exposition plus intense (viabilité d'environ 50% après 360 bouffées). Avec le profil ISO3308 celle-ci ne diminue que de 20% au maximum à la plus forte dose testée. En revanche, les e-cigs ont peu d'effet sur la viabilité cellulaire, on observe au maximum une réduction de 15% de la viabilité, quels que soient la puissance de l'e-cig et le profil utilisé. Ainsi, la cigarette 3R4F est plus cytotoxique que le HTP qui est lui-même plus cytotoxique que les e-cigs.

Sachant qu'un ancien fumeur qui passe à l'e-cig ou au HTP va réguler sa consommation en fonction de la satisfaction que lui apporte le dispositif en terme de quantité de nicotine (K. Farsalinos et al., 2018), il apparaît intéressant de visualiser la viabilité cellulaire des différentes émissions en fonction de la quantité de nicotine (Figure 23).

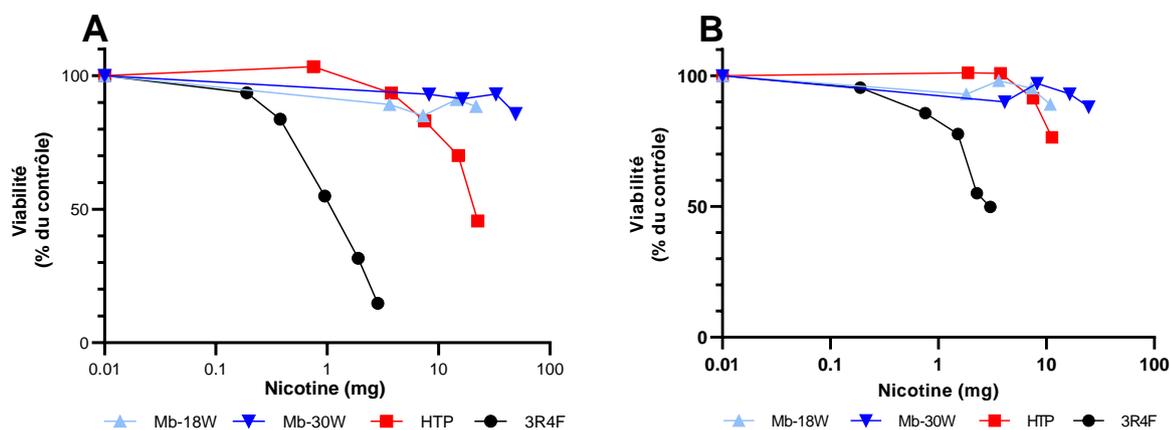


Figure 23 : Viabilité cellulaire (exprimée en fonction de la quantité de nicotine) après exposition à l'e-cig (Mb-18W et Mb-30W), le HTP et la cigarette 3R4F sur des cellules BEAS-2B.

(A) Exposition avec le profil HCl (B) Exposition avec le profil ISO3308. La viabilité a été évaluée en mesurant la teneur en ATP intracellulaire dans les cellules 24h après l'exposition, en fonction de la quantité de nicotine. Les résultats sont obtenus à partir de n=3 cultures indépendantes pour chaque condition et sont exprimés en moyenne des pourcentages par rapport à la teneur en ATP dans les cellules non exposées, fixée arbitrairement à une valeur de 100 %

Le classement de la cytotoxicité est resté similaire entre les 3 dispositifs. Le HTP était moins cytotoxique que la cigarette conventionnelle alors que l'e-cig n'était pas cytotoxique. Avec le profil HCl, la CE₅₀ (dose conduisant à 50% de viabilité cellulaire) était de 12 bouffées soit 0,87 mg de nicotine pour la cigarette 3R4F alors qu'elle était de 350 bouffées soit 22 mg de nicotine pour le HTP.

1.2. Discussion

Les résultats de cytotoxicité précédemment exposés montrent que le HTP était moins cytotoxique que la cigarette conventionnelle alors que l'e-cig n'était pas cytotoxique dans les cellules BEAS-2B. Le nombre de

bouffées nécessaires pour atteindre la CE_{50} était environ 29 fois plus élevé pour les émissions de HTP (350 bouffées) que pour l'exposition à la cigarette (12 bouffées). Ces données sont cohérentes avec celles de Chapman et al. qui ont trouvé une différence de 38 fois entre la CE_{50} des deux dispositifs dans la même lignée cellulaire (Chapman et al., 2023). De plus, une étude indépendante qui a comparé la toxicité de l'e-cig et du HTP a également observé une diminution de la viabilité cellulaire plus marquée pour le HTP que pour l'e-cig sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (H292) cultivées en IAL (Leigh et al., 2018). En revanche, nous n'avons pas observé de diminution significative de la viabilité cellulaire après exposition des cellules BEAS-2B à l'e-cig, quelle que soit la puissance utilisée (18 ou 30 W). Escobar *et al.*, (2020) ont également comparé l'impact des puissances (40 et 85 W) d'un dispositif e-cig de troisième génération sur la cytotoxicité dans des cellules épithéliales des voies respiratoires (lignée 16HBE) exposées à différents mélanges d'aérosol de propylène glycol et de glycérol. Une augmentation modeste de la libération de LDH (< 10 % du contrôle positif) n'a été observée qu'avec le propylène glycol aérosolisé avec une e-cig à haute puissance (85 W) (Escobar et al., 2020). En revanche, d'autres auteurs ont mis en évidence une nette cytotoxicité dose-dépendante après exposition à des aérosols d'e-cig mais dans des conditions spécifiques ou extrêmes avec une entrée d'air fermée au niveau du clearomiseur (Bishop et al., 2018) ou avec un e-liquide contenant de l'acétate de vitamine E (Canchola et al., 2022).

Dans notre étude, les différences de toxicité observées entre les deux profils peuvent s'expliquer par un volume de bouffée de 35mL avec le profil ISO3308 alors que le profil HCI utilise un volume plus important de 55mL, ce qui expose les cellules à de plus fortes concentrations de composés toxiques par bouffée. Pour la suite des tests, c'est le profil HCI qui a été choisi car ce profil est largement utilisé dans les études sur les produits du tabac (Crooks et al., 2018; Schaller et al., 2016; Thorne et al., 2019a) mais aussi dans le cadre d'expositions à l'e-cig (Ganapathy et al., 2017; Misra et al., 2014). Un nouveau profil a été créé en 2018 et est généralement recommandé pour les études sur l'e-cig : le profil CRM81 (ISO 20768 : 2018). Cependant pour la suite de l'étude, nous avons choisi d'utiliser un seul et même profil d'exposition pour toutes les expositions car l'objectif de cette thèse est de comparer la toxicité de l'e-cig avec celle des produits du tabac dans des mêmes conditions expérimentales. Notre choix s'est porté sur le profil HCI qui est très similaire au profil CRM81. En effet, les 2 profils sont caractérisés par un volume de bouffée de 55 ml et 1 bouffée toutes les 30 secondes. Seule la durée de bouffée (2s HCI vs 3s CRM81) et le profil de la bouffée (profil en forme de cloche (HCI) vs profil rectangle) ne sont pas identiques. Une étude a testé si le profil de bouffée en forme de cloche pouvait entraîner des différences de génération de vapeur par rapport à l'utilisation d'un profil de bouffée rectangulaire. Dans cette étude, aucune différence significative dans le rendement en aérosol (dosage des particules totales), de glycérol, de nicotine ou d'eau n'a été trouvée entre un profil de bouffée rectangulaire et en forme de cloche pour les cigarette électronique (McAdam et al., 2019). En revanche, un impact de la durée de la bouffée a été démontré sur les émissions des aérosols d'e-cig. Une augmentation de la durée a produit une augmentation de la masse de l'aérosol, de l'eau, de la nicotine et des rendements

en glycérol (McAdam et al., 2019). Dans le profil de bouffée (HCI) que nous avons adopté pour les e-cigs, l'appareil est activé 1 s avant chaque bouffée de 2 s, ce qui équivaut à maintenir une durée d'activation (3 s) de l'e-cig identique au profil de bouffée CRM81. Ces tests de viabilité cellulaire nous ont permis de sélectionner les doses d'exposition pour la suite de l'étude (analyses transcriptomiques notamment), en choisissant des doses subtoxiques (c'est-à-dire > 85 % de la viabilité cellulaire) : 60 et 120 bouffées pour l'e-cig et le HTP, et 2 et 4 bouffées pour la cigarette.

2. Evaluation de la génotoxicité des différents dispositifs

2.1. Mesure des lésions primaires de l'ADN

Pour évaluer les lésions primaires de l'ADN (cassures simples et doubles brins) potentiellement induites par les différents aérosols, un test des comètes a été réalisé sur des cellules récoltées directement après l'exposition. De plus, un test des comètes modifié utilisant l'endonucléase de réparation hOGG1, une enzyme clivant au niveau de bases oxydées, a été utilisé pour détecter spécifiquement les lésions oxydatives. Les dommages primaires à l'ADN sont exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète et sont illustrés sur la Figure 24. Pour étudier une éventuelle relation dose-réponse, les doses suivantes ont été testées : 60 et 120 bouffées pour les e-cigs, 60, 90 et 120 bouffées pour l'IQOS, 4, 7 et 10 bouffées pour la cigarette 3R4F.

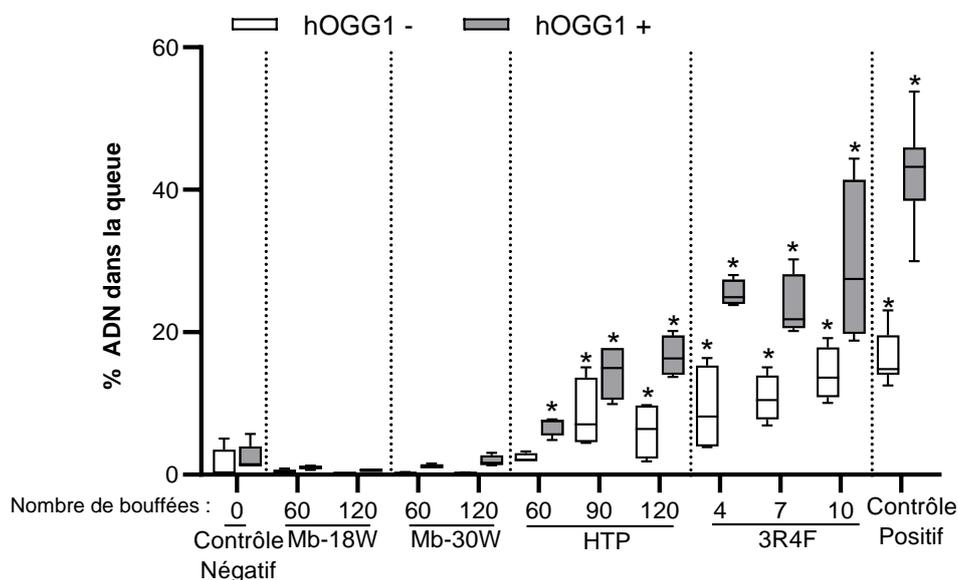


Figure 24 : Evaluation des dommages à l'ADN par le test des comètes

Mesure des cassures simple et doubles brins par le test des comètes en conditions alcalines après exposition à la Mb-18W (60 et 120 bouffées), à la Mb-30W (60 et 120 bouffées), à le HTP (60, 90 et 120 bouffées), à la cigarette 3R4F (4, 7 et 10 bouffées) et à un témoin positif « MMS » (15 µg/ml) en présence (gris) ou en absence (blanc) d'hOGG1. Résultats exprimés en % d'ADN dans la queue de la comète. 100 noyaux ont été analysés par condition dans n=4 cultures indépendantes. Les résultats sont représentés en médiane et intervalle interquartile ± min et max. *(p<0,05, Mann Whitney) : Différence significative par rapport au Témoin négatif

Dans le test standard des comètes, la cigarette 3R4F a induit une augmentation statistiquement significative et dose-dépendante des cassures de l'ADN (jusqu'à 13,6 % d'ADN dans la queue de la comète à la dose la plus élevée, contre 0,2 % pour le contrôle négatif). Une augmentation statistiquement significative des dommages à l'ADN a également été observée après exposition à 90 et 120 bouffées de HTP. Avec le test des comètes modifié par hOGG1, des augmentations statistiquement significatives de l'intensité de la queue ont été observées pour la cigarette 3R4F et le HTP à toutes les doses testées (notamment 27,5 % pour 10 bouffées de cigarette et 16,3 % pour 120 bouffées de HTP, vs 1,5 % pour le contrôle négatif). En revanche, dans les deux conditions expérimentales testées (c'est-à-dire avec ou sans hOGG1), l'exposition à l'e-cig n'a induit aucune augmentation biologique ou statistique significative des cassures de brins d'ADN ou des dommages oxydatifs à l'ADN, quelle que soit la dose (c'est-à-dire 60 ou 120 bouffées) ou la puissance de l'e-cig (c'est-à-dire 18 ou 30 W).

En conclusion, les produits du tabac (HTP et cigarette) provoquent des cassures de l'ADN ainsi que des lésions oxydatives alors que l'e-cig n'induit aucun dommage à l'ADN dans les cellules BEAS-2B.

2.2. Evaluation de l'induction d'aberrations chromosomiques

Le test *in vitro* du micronoyau a été utilisé pour évaluer l'induction d'aberrations chromosomiques (c'est-à-dire, la clastogénicité et/ou l'aneuploïdie) 48 heures après l'exposition des cellules BEAS-2B aux différentes émissions (Figure 25).

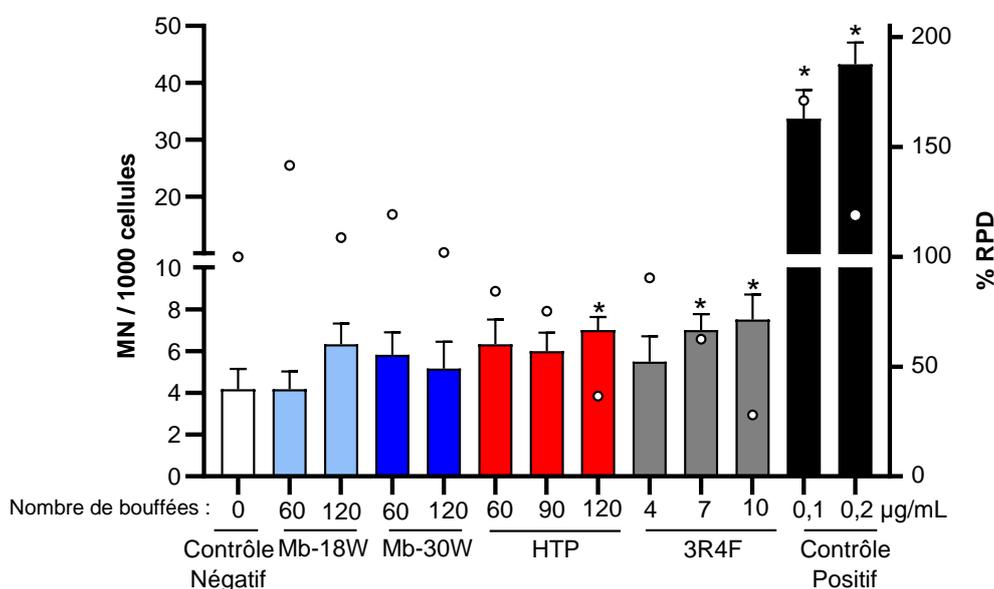


Figure 25 : Evaluation de la fréquence des aberrations chromosomiques par le test du micronoyau

Mesure des micronoyaux après exposition à la Mb-18W (60 et 120 bouffées), à la Mb-30W (60 et 120 bouffées), à le HTP (60, 90 et 120 bouffées), à la cigarette 3R4F (4, 7 et 10 bouffées) et à un témoin positif « Mitomycine C » (0,1 et 0,2 µg/ml). Les résultats sont exprimés en nombre de cellules micronucléées (MN) pour 1000 cellules mononucléées. Le % relatif de doublement de la population (RPD) est utilisé comme mesure de la cytotoxicité. Résultats obtenus à partir de n=3 cultures indépendantes pour chaque condition et exprimés en moyenne ± écart type. *(p<0,05, Test exact de Fisher) : Différence significative par rapport au Témoin négatif.

Aucune augmentation du nombre de micronoyaux n'a été observée dans les cellules BEAS-2B exposées aux émissions d'e-cig (Mb-18W et Mb-30W). Seule une légère augmentation statistiquement significative du nombre de micronoyaux a été montrée dans les cellules exposées à 120 bouffées de HTP et 7 et 10 bouffées de cigarette (7, 7 et 11 micronoyaux contre 4,2 micronoyaux pour 1000 cellules avec le contrôle négatif, respectivement).

Ces données suggèrent que, dans ces conditions expérimentales, les deux produits du tabac (HTP et cigarette conventionnelle) induisent des aberrations chromosomiques dans les cellules BEAS-2B. Ces aberrations peuvent être causées par des cassures de chromosomes (effet clastogène) ou des anomalies lors de la séparation des chromosomes pendant la mitose (effet aneugène). En revanche, l'e-cig (indépendamment de la puissance testée) n'a pas causé de tels effets dans ce modèle cellulaire.

2.3. Discussion

Cette étude comparative apparaît intéressante et originale puisqu'il n'existe actuellement qu'une seule étude, réalisée par l'industrie du tabac, comparant la survenue d'aberrations chromosomiques d'un produit du tabac chauffé à celle de l'e-cig (par un test du micronoyau) (Thorne et al., 2019a). Bien souvent les essais de génotoxicité s'en tiennent à comparer la génotoxicité d'un seul de ces nouveaux dispositifs de délivrance de nicotine (e-cig ou HTP) avec la cigarette conventionnelle.

L'évaluation des dommages chromosomiques a montré que la fréquence des micronoyaux était statistiquement significativement augmentée après exposition à la cigarette 3R4F et au HTP, mettant en évidence l'activité génotoxique (c.-à-d. clastogénicité et/ou aneuploïdie) de ces deux produits du tabac dans nos conditions expérimentales. Ces derniers résultats sont cohérents avec ceux du test des comètes, démontrant que les dommages primaires à l'ADN observés peuvent conduire à des aberrations chromosomiques après la division cellulaire. Une étude *in vivo* a précédemment montré que l'exposition au HTP provoquait des dommages oxydatifs dans les poumons, mais aussi des cassures de brins d'ADN dans les leucocytes des rats exposés (Vivarelli et al., 2021). D'autres auteurs ont également observé une augmentation de la fréquence des micronoyaux après une exposition au HTP (Chapman et al., 2023; Crooks et al., 2018), tandis que Thorne *et al.*, (2019) ont conclu à des résultats négatifs pour le test du micronoyau effectué avec la matière particulaire totale du HTP dans la lignée cellulaire V79 de hamster chinois (Thorne et al., 2019a).

Pour l'étude de la génotoxicité de l'e-cig, nous avons montré que l'e-cig n'induisait pas de lésions primaires de l'ADN (pas de cassure de l'ADN ou de dommage oxydatif de l'ADN), ni d'aberrations chromosomiques, dans les cellules BEAS-2B jusqu'à une exposition de 120 bouffées. Des conclusions contradictoires ont souvent été publiées sur l'activité génotoxique de l'e-cig. L'absence de potentiel génotoxique de l'e-cig dans

nos conditions expérimentales est cohérente avec l'étude de Tellez *et al.*, (2021) qui a évalué la génotoxicité des aérosols générés à partir de 10 e-liquides aromatisés, avec ou sans nicotine, dans 3 lignées cellulaires épithéliales orales immortalisées différentes. Aucun des aérosols n'a augmenté les dommages à l'ADN (évalués par le test des comètes en conditions alcalines), contrairement à la cigarette qui a provoqué une augmentation dose-dépendante des cassures de brins d'ADN dans les 3 lignées cellulaires (Tellez *et al.*, 2021). De même que dans notre travail, des résultats négatifs ont également été rapportés dans plusieurs études effectuant un test du micronoyau après une exposition à l'e-cig (Misra *et al.*, 2014; Rudd *et al.*, 2020; Thorne *et al.*, 2019a; Wieczorek *et al.*, 2020). Au contraire, d'autres études *in vitro* ont montré une réponse positive au test des comètes (Al-Saleh *et al.*, 2020; Ganapathy *et al.*, 2017; Khalil *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2016) et/ou au micronoyau test (Al-Saleh *et al.*, 2020; Tellez *et al.*, 2021) après une exposition à l'e-cig. Ces résultats positifs pourraient s'expliquer par les conditions spécifiques utilisées pour l'exposition à l'e-cig. En effet, une exposition à 20 bouffées réalisées avec un court intervalle entre bouffées (20 s) a induit des lésions de l'ADN dans des cellules alvéolaires humaines immortalisées (lignée A549) (Khalil *et al.*, 2021). Dans une autre étude utilisant des cellules épithéliales normales et des lignées cellulaires de carcinome épidermoïde de la tête et du cou, une exposition répétée à des extraits d'aérosols d'e-cig pendant 1 semaine et 2 mois a entraîné une augmentation de la longueur de la queue de la comète et une accumulation de foyers gamma-H2AX, indépendamment de la nicotine présente dans l'e-liquide (Yu *et al.*, 2016). Al-Saleh *et al.*, (2020) a évalué la génotoxicité de 33 e-liquides dans des cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 à l'aide du test des comètes. Tous les e-liquides ont induit des dommages à l'ADN dans ces cellules, avec un effet génotoxique plus important en présence d'activation métabolique (Al-Saleh *et al.*, 2020). Cependant, ces 2 dernières études ont utilisé des cellules immergées avec des e-liquides ou des extraits d'aérosols d'e-cig dilués dans des milieux de culture. Ce mode d'exposition cellulaire semble moins pertinent que les cellules cultivées à l'interface air-liquide exposées aux aérosols générés via une machine à fumer (Li, 2016).

Ainsi, il existe des données contradictoires qui rendent difficile de conclure sur la génotoxicité et la mutagénicité de ces alternatives au tabac. L'avantage de notre étude est de comparer la toxicité de l'e-cig, du HTP et de la cigarette dans des mêmes conditions expérimentales. Nous pouvons conclure que dans le modèle cellulaire BEAS-2B, les produits du tabac induisent des lésions de l'ADN ainsi que des aberrations chromosomiques alors que l'e-cig n'en induit pas, aussi bien à 18 qu'à 30W.

Dans les processus de cancérogenèse, les changements génétiques peuvent se produire seuls ou en combinaison avec des modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et l'expression anormale d'ARN non codants, y compris les microARN (miARN). L'exposition à la fumée de tabac est associée à des changements épigénétiques dans les voies respiratoires (Xie *et al.*, 2021). C'est pourquoi, dans la partie suivante, les résultats de l'analyse de ces paramètres sont présentés.

3. Evaluation des altérations épigénétiques des différents dispositifs

3.1. Mesure de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement CH_3 sur les cytosines de dinucléotides CpG. Cette modification épigénétique de l'ADN peut influencer l'expression des gènes et joue un rôle clé dans de nombreux processus biologiques, comme le développement embryonnaire, la cancérogenèse (Dahlet et al., 2020) et la BPCO (Machin et al., 2017). La méthylation de l'ADN a été mesurée par la quantification de la méthylation globale (5-mC DNA ELISA Kit) (Figure 26).

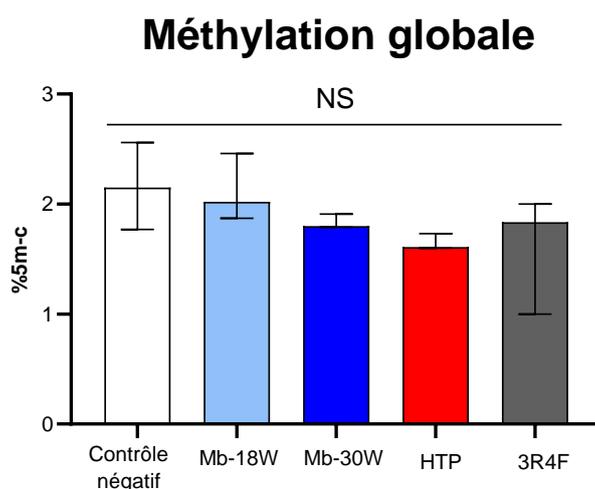


Figure 26 : Evaluation de la méthylation globale de l'ADN

Mesure de la méthylation globale de l'ADN par le kit 5-mC DNA ELISA Kit après exposition à la Mb-18W (120 bouffées), à la Mb-30W (120 bouffées), au HTP (120 bouffées) ou à la cigarette 3R4F (4 bouffées). Résultats obtenus à partir de n=3 cultures indépendantes pour chaque condition. Les résultats sont exprimés en % de méthylation globale et représentent la médiane \pm l'écart interquartile. NS = non-significatif. Aucun résultat n'est significatif par rapport au témoin négatif (test Mann Whitney).

Le dosage de la méthylation globale de l'ADN donne des résultats négatifs dans le modèle BEAS-2B après une exposition aiguë à la cigarette, au HTP ou à l'e-cig (18 et 30 W). En effet, il n'y a aucune différence significative par rapport au témoin négatif, quel que soit le dispositif testé.

3.2. Evaluation des modifications d'histones

Les histones sont des protéines qui permettent la condensation de l'ADN en chromosomes. Elles peuvent affecter différents processus dans la cellule tels que l'activation/inactivation de la transcription, l'encapsidation des chromosomes, les dommages à l'ADN et la réparation de l'ADN. La modification des histones est un processus post-traductionnel important qui joue un rôle clé dans l'expression des gènes (Bannister and Kouzarides, 2011). Les différentes modifications d'histones évaluées (Figure 27) ont été fréquemment observées suite à l'exposition au tabac et dans un certain nombre de cancers, c'est pourquoi nous les avons sélectionnées dans ce projet. En effet, les modifications H3K27me3 (Wang et al., 2016),

H3K9ac (Chen et al., 2015), H3K9me3 et H3K4me3 (Sundar et al., 2013; Urvalek et al., 2015) ont pu être mises en évidence lors d'exposition au tabac dans des études *in vitro*, *in vivo* ou chez l'Homme.

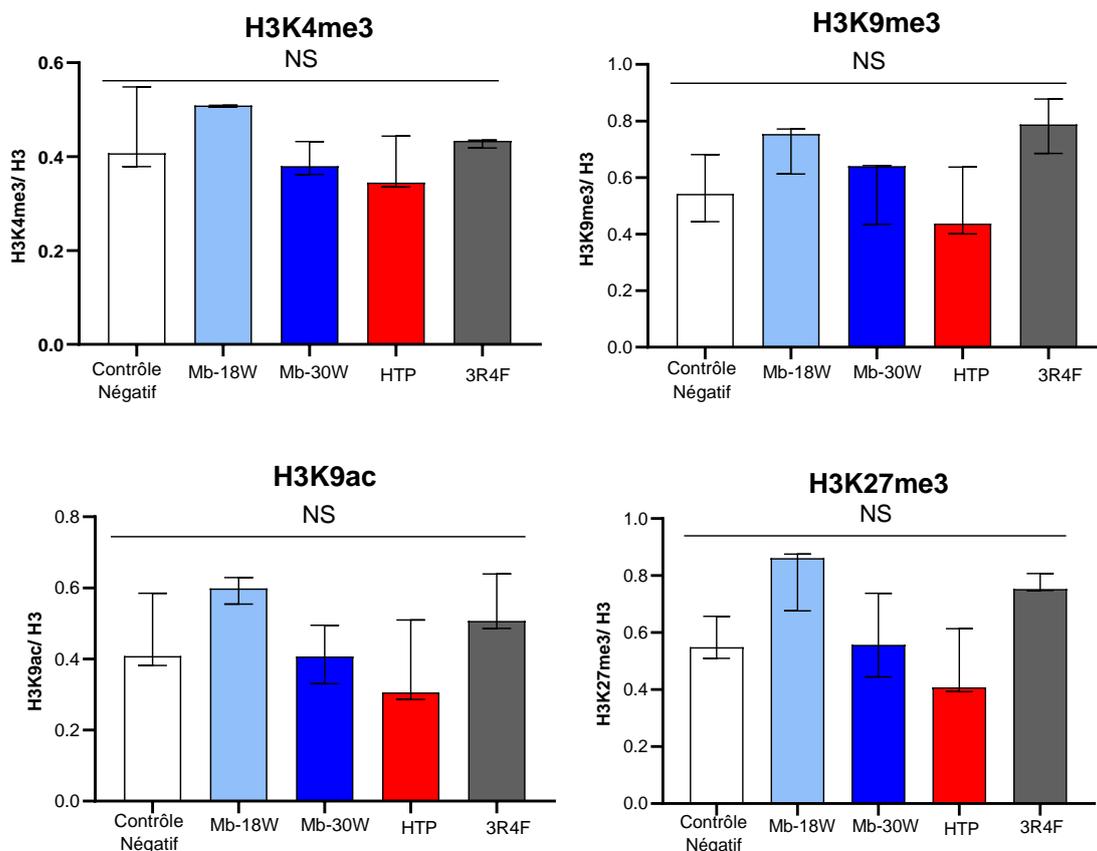


Figure 27 : Evaluation des modifications d'histones H3K9me3, H3K9ac, H3K4me3 et H3K27me3

Mesure des modifications d'histone H3K9me3, H3K9ac, H3K4me3 et H3K27me3 par des tests ELISA après exposition à la Mb-18W, à la Mb-30W, au HTP (120 bouffées) ou à la cigarette 3R4F (4 bouffées). Résultats obtenus à partir de n=3 cultures indépendantes pour chaque condition. Les résultats sont exprimés en ratio de l'histone modifiée/H3 total et représentent la médiane ± l'écart interquartile. NS = non-significatif. Aucun résultat n'est significatif par rapport au témoin négatif (test Mann Whitney)

Les dosages des modifications d'histone après exposition aiguë des cellules BEAS-2B aux produits du tabac et du vapotage ne montrent aucune différence significative par rapport au témoin négatif, quel que soit le dispositif.

3.3. Évaluation de l'expression de microARN

Afin de compléter l'évaluation épigénétique, l'étude des microARN apparaît intéressante. Ce sont de petits ARN non codants qui servent de régulateurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes. Initialement, transcrits sous la forme de précurseurs appelés pri-microARN, ils seront ensuite clivés dans le noyau donnant lieu à un produit intermédiaire, le pré-microARN (PrémiR), long d'environ 70 nucléotides et replié en tige-boucle. Enfin, après transport dans le cytosol, les PrémiR sont clivés, libérant ainsi les microARNs d'une longueur de 21 à 24 nucléotides. Ils agissent en se liant à leurs ARNm cibles par complémentarité pour induire

le clivage ou la répression de la traduction (Brennecke et al., 2005). La reconnaissance entre un miR et sa cible est contrôlée par une séquence d'environ 7 bases, située sur la partie 5' du microARN. Si la complémentarité est parfaite entre le transcrite cible et le microARN, il y a dégradation du gène cible. Si la complémentarité est imparfaite, la synthèse protéique est inhibée (Ngoubo Ngangué-Courcot, 2012; Wahid et al., 2010) (Figure 28) :

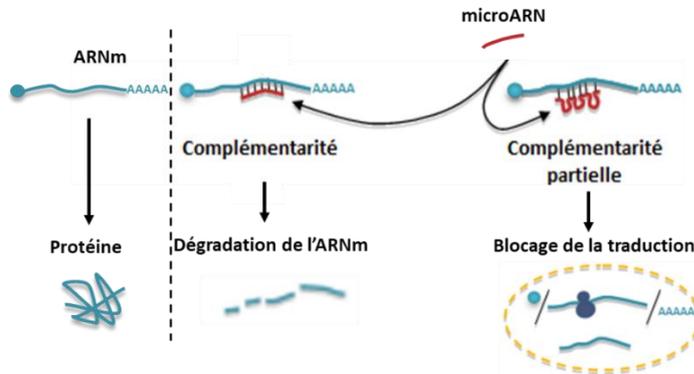
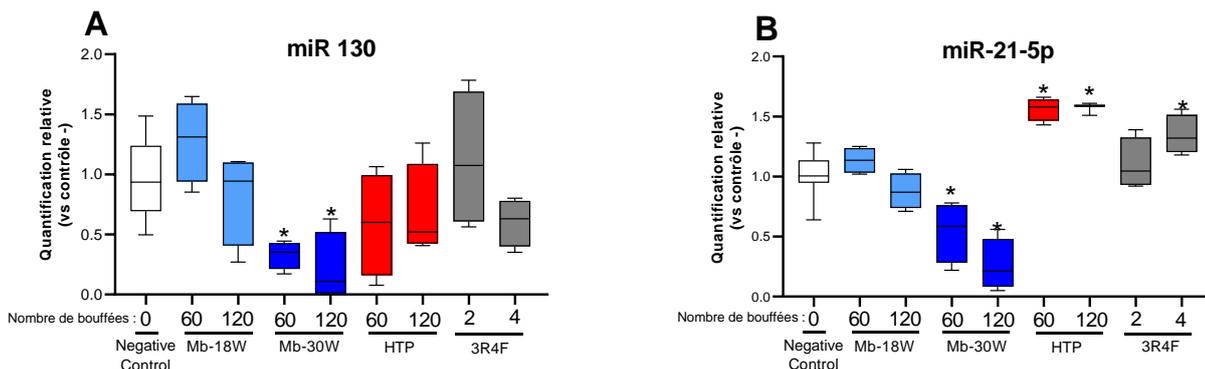


Figure 28: Mécanisme d'action des microARNs (Adapté de Ngoubo Ngangué-Courcot, 2012)

Nous avons sélectionné 9 microARN qui d'après la littérature scientifique (études *in vitro*, *in vivo* et humaines) sont dérégulés par la cigarette :

- miR-150-5p (Xue and Li, 2018),
- miR-130a-5p (Wu et al., 2020),
- miR-200b-3p (J. Wang et al., 2021),
- miR-4521 (Sun et al., 2021),
- miR-21-5p (Pfeffer et al., 2015),
- miR-218-5p (Xiaoli Liu et al., 2020)
- miR-223-3p (Roffel et al., 2021),
- Let-7a-5p (Yan, 2021),
- Let-7c-5p (Yan, 2021).

Sur les 9 microARN étudiés, seuls 4 microARN induisent des différences significatives par rapport au témoin. Les résultats sont exposés ci-dessous pour ces 4 microARN (Figure 29) :



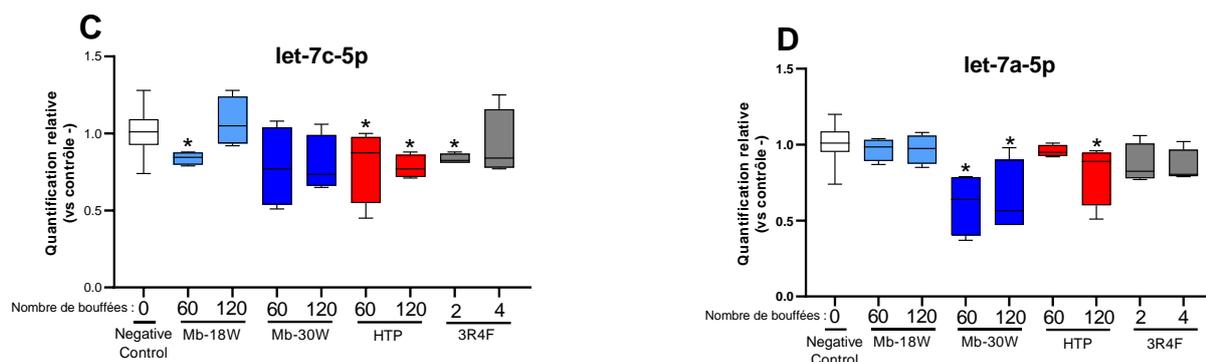


Figure 29 : Evaluation de l'expression de 4 microARN d'intérêt par RTqPCR

L'expression de 4 microARN d'intérêt (miR-130a-5p, miR-21-5p, Let-7a-5p, Let-7c-5p) a été évaluée par RTqPCR, 24h après exposition aux émissions de Mb-18W, Mb-30W, HTP (60 et 120 bouffées) et de cigarette (2 et 4 bouffées). Les résultats sont exprimés en quantité relative ($RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$), par rapport au microARN endogène miR-423-5p et aux cellules témoins, arbitrairement fixé à la valeur 1. Résultats obtenus à partir de n=4 cultures indépendantes pour chaque condition et exprimés avec un boxplot représentant la médiane et l'écart interquartile \pm min et max. *($p < 0,05$, Mann Whitney)

Une diminution significative de l'expression du miR-130 est observée uniquement avec la Mb-30W, aux 2 doses testées (60 et 120 bouffées) avec une quantité relative (RQ) inférieure à 0,35. L'expression de miR-21-5p est augmentée avec les produits du tabac (significatif avec le HTP à 60 et 120 bouffées ($RQ = 1,6$) et avec la cigarette à 4 bouffées ($RQ = 1,3$)) alors qu'il diminue fortement avec l'e-cig Mb-30W à 60 et 120 bouffées ($RQ = 0,58$ et $0,21$). L'expression de Let-7c-5p diminue avec la Mb-18W (60 bouffées) ($RQ = 0,85$), avec le tabac chauffé (60 et 120 bouffées) ($RQ = 0,88$ et $0,77$) et la cigarette à 2 bouffées ($RQ = 0,83$), mais ces diminutions d'expression, bien que statistiquement significatives, sont relativement faibles. Enfin, l'expression de Let-7-a est diminuée avec la Mb-30W ($RQ = 0,64$ et $0,57$) et de manière moins importante avec le HTP à la plus forte dose ($RQ = 0,89$).

3.4. Discussion

Des études antérieures ont rapporté que la cigarette provoquait de nombreuses altérations épigénétiques dans la survenue de cancer notamment des hyperméthylations de promoteur dans les gènes ayant une activité suppressive de tumeur et une hypométhylation globale (à l'échelle du génome) (Caliri et al., 2020). La fumée de cigarette induit également des modifications post-traductionnelles des résidus d'histones chez les fumeurs (Caliri et al., 2020; Guerrero-Preston et al., 2009; Ito et al., 2001; Szulakowski et al., 2006), dans les poumons de souris exposées à la cigarette (Choukallah et al., 2019; Marwick et al., 2004) et dans des cellules épithéliales bronchiques humaines traitées avec un extrait de cigarette (Huang et al., 2017; Sundar et al., 2013; Wang et al., 2016). Aucune modulation des histones et de la méthylation globale de l'ADN n'a été trouvée dans notre modèle *in vitro* après une exposition aiguë, quel que soit le type d'émissions (y compris avec la cigarette). Il apparaît que des expositions répétées (dans des modèles animaux ou cellulaires) devraient aider à identifier les altérations épigénétiques. Effet, une hypométhylation globale de l'ADN a déjà été observée dans les cellules BEAS-2B après des expositions quotidiennes répétées à la cigarette (Huang et al., 2017). Ces chercheurs ont répété leur exposition pendant 15 passages afin de mettre en évidence

l'hypométhylation de l'ADN. De même, Wang *et al.*, (2016) ont montré qu'une exposition répétée à la cigarette augmentait la méthylation de l'histone H3 (H3K27me3) de manière temps-dépendante dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (Wang *et al.*, 2016). Les chercheurs ont simulé une exposition chronique en exposant leurs cellules à de faibles doses d'extrait de cigarette pendant 24 à 48h et l'ont répété pendant 20 semaines, 24h après chaque passage. Ainsi, les expositions répétées semblent plus pertinentes pour mettre en évidence des mécanismes épigénétiques. Par conséquent, des études sur des modèles cellulaires et animaux chroniquement exposés à l'e-cig et au HTP seront nécessaires pour étudier l'impact épigénétique de ces émissions.

Concernant à présent l'altération de l'expression des microARN, des études ont montré que le miR-130a était plus faiblement exprimé dans les cancers du poumon (Wei *et al.*, 2021). De plus, miR-130a-3p était inhibé dans les cellules S30 (cellules épithéliales bronchique BEAS-2B qui ont été transformées par la cigarette en cellules cancéreuses) ainsi que dans des lignées cellulaires cancéreuse de poumon A549 et H1299 (Yu *et al.*, 2019). Ces constatations démontrent une réduction significative de ce microARN dans les contextes de cellules cancéreuses. Il est intéressant de noter que nous avons également observé une diminution de miR-130a-3p lorsque les cellules étaient exposées à l'aérosol d'e-cig à la puissance maximale, ce qui pourrait contribuer à l'induction et la progression cancéreuse. En revanche, l'expression de ce microARN est augmentée dans les cellules BEAS-2B traitées avec des extraits de fumée de cigarette et chez des souris exposées à la fumée de cigarette (Wu *et al.*, 2020), ce qui n'est pas le cas dans nos résultats. L'augmentation de miR-21 par les produits du tabac est cohérente avec la littérature scientifique, avec une surexpression observée dans de nombreux cancers, responsable d'augmentation de la prolifération cellulaire et d'une inhibition de l'apoptose (Pfeffer *et al.*, 2015). En revanche, une diminution de son expression n'a pas encore été décrite dans la littérature avec l'e-cig. Une diminution de let-7c-5p a déjà pu être démontrée avec un traitement aigu et chronique d'extrait de fumée de cigarette dans des cellules HBE (Human Bronchial Epithelial) (Lu *et al.*, 2017). Nos résultats à la plus faible dose de cigarette sont donc cohérents avec cette étude sur cellules HBE. Nous observons que le tabac chauffé induit également une légère diminution de l'expression de ce microARN. L'expression de Let-7a a déjà été décrite comme diminuée chez les fumeurs (Rizk *et al.*, 2018) or nos résultats ont montré une diminution qu'avec le tabac chauffé et la Mb-30W. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour définir précisément le rôle de ces 4 microARN dans la toxicité des émissions d'HTP et d'e-cig et leur rôle potentiel dans la cancérogenèse. La fonction de ces microARN pourra être étudiée par des transfections avec des pré-miR ou des anti-miR.

4. Impact transcriptomique de l'exposition à l'e-cig, au HTP ou à la cigarette : identification des principales voies de dérégulations et fonctions biologiques dérégulées

Pour rappel, afin de déterminer les doses d'exposition retenues pour l'analyse transcriptomique, la cytotoxicité précédemment décrite a été utilisée (Figure 22). Des doses d'exposition subtoxiques (>85% de viabilité cellulaire) ont été choisies : 60 et 120 bouffées pour l'e-cig réglée à 18 W ou 30 W et pour le HTP et 2 et 4 bouffées pour la cigarette de référence 3R4F. De ce fait, les transcriptomes des cellules exposées aux différents dispositifs sont comparés à cytotoxicité équivalente mais pas forcément à dose égale pour la cigarette qui sert davantage de témoin positif dans cette étude.

4.1. Comparaison des dérégulations transcriptomiques induites par l'e-cig, le HTP et la cigarette

Dans un premier temps, il est intéressant de comparer le nombre de transcrits significativement dérégulés après exposition aux différents dispositifs. Pour que ces derniers soient considérés comme significatifs dans cette étude, des filtres ont été appliqués avec filtre statistique sur la p-value ajustée $< 0,05$ et un filtre sur le fold-change $|FC| > 1,5$ par rapport aux témoins négatifs (Tableau 19 : Nombre de transcrits dérégulés en fonction des doses d'exposition aux émissions des différents dispositifs). Le fold-change représente la mesure du changement d'expression d'un gène entre deux conditions expérimentales. Il est calculé en comparant les niveaux d'expression du gène dans les conditions étudiées. Une valeur de fold-change supérieure à 1,5 indique une augmentation de l'expression, tandis qu'une valeur inférieure à -1,5 indique une diminution de l'expression par rapport au témoin négatif. La p-value évalue la significativité statistique du changement d'expression d'un gène. Une p-value faible ($< 0,05$) suggère que le changement observé est peu probablement dû au hasard, tandis qu'une p-value élevée ($> 0,05$) indique que le changement pourrait être attribué au hasard.

Pour une exposition de 60 bouffées avec les e-cigs et le HTP et de 2 bouffées pour la cigarette 3R4F (expositions les plus courtes), la réponse la plus forte est observée pour le tabac chauffé (1365 ARNm dérégulés). Pour une exposition similaire, l'e-cig Mb-30W dérégule 1006 transcrits. Cela représente environ quatre fois plus de dérégulations que pour l'e-cig réglée à faible puissance qui module seulement 263 ARNm. Enfin, on en compte sept fois moins de modulations (194 ARNm) pour la cigarette (3R4F) que pour le HTP pour une dose d'exposition trente fois inférieure (4 bouffées pour la cigarette vs 60 bouffées pour le HTP). Malgré cette différence importante de dose, les résultats sont à cytotoxicité équivalente. En revanche, il n'est pas exclu que la durée d'exposition pourrait exercer une influence sur le nombre de transcrits dérégulés. À noter, qu'à l'exception de la Mb-18W qui présente une forte proportion de gènes dont l'expression transcriptomique est augmentée (84%↑ ; 16%↓), les proportions sont plus équilibrées pour le HTP (50%↑

; 50%↓), la 3R4F (55↑ ; 45%↓) et la Mb-30W (62% ↑ ; 38%↓) (Tableau 19 : Nombre de transcrits dérégulés en fonction des doses d'exposition aux émissions des différents dispositifs).

Tableau 19 : Nombre de transcrits dérégulés en fonction des doses d'exposition aux émissions des différents dispositifs

Les gènes sélectionnés ont un fold-change $|FC| > 1,5$ et une p-value $< 0,05$ pour la comparaison de chaque dispositif par rapport au témoin négatif (cellules non-exposées) 24h après l'exposition : 3R4F vs témoin, IQOS vs témoin, Mb-18W vs témoin, Mb-30W vs témoin. Résultats obtenus à partir de n=4 cultures indépendantes pour chaque condition.

Dispositifs	Nombre de bouffées	Nombre de transcrits induits	Nombre de transcrits réprimés	TOTAL
Mb-18W	60	219	44	263
	120	53	5	58
Mb-30W	60	621	385	1006
	120	393	180	573
HTP	60	683	682	1365
	120	906	735	1647
Cigarette 3R4F	2	106	88	194
	4	367	300	667

Des résultats semblables aux plus faibles doses sont retrouvés pour les doses plus fortes testées (120 bouffées pour HTP, Mb-18W et Mb-30W et 4 bouffées pour 3R4F) (Tableau 19 : Nombre de transcrits dérégulés en fonction des doses d'exposition aux émissions des différents dispositifs). On observe un « effet dose » pour les produits du tabac puisque le nombre de transcrits dérégulés augmente avec le nombre de bouffées pour le HTP et pour la cigarette 3R4F. Cependant, un résultat surprenant est observé pour l'e-cig puisqu'il y a moins d'impact sur le transcriptome avec l'exposition à la plus faible dose (60 bouffées) qu'avec l'exposition à la plus forte dose (120 bouffées). Ce résultat est observé pour les 2 puissances d'e-cig testées. Les cellules exposées aux e-cigs pourraient peut-être mettre en place des mécanismes d'adaptation au cours du temps (après l'exposition de 120 bouffées équivalente à 60 min d'exposition) d'autant que la cytotoxicité que nous avons pu mesurer était stable entre ces 2 doses d'expositions.

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous sommes focalisés sur les doses les plus fortes pour les analyses transcriptomiques, à savoir 120 bouffées pour Mb-18W, Mb-30W et HTP et 4 bouffées pour la cigarette 3R4F. Cependant l'analyse fonctionnelle a également été réalisée pour les autres doses et les fonctions biologiques et voies de signalisation qui sont identifiées sont relativement similaires entre les 2 analyses (Annexe 1 et 2).

Dans un premier temps, nous pouvons utiliser des volcano plots (Figure 30, Figure 31, Figure 32, Figure 33). L'utilisation d'un volcano plot permet une visualisation intuitive des gènes les plus pertinents dans une analyse d'expression génique en fonction de leur niveau d'expression par rapport au contrôle négatif (exprimé en \log_2 de FC sur l'axe des abscisses) et de leur signification statistique (exprimée en \log_{10} de la p-value ajustée sur l'axe des ordonnées). Les gènes ayant un fold-change supérieur à 1,5 et une p-value ajustée inférieure à 0,05 représentent les gènes les plus significativement dérégulés et apparaissent en rouge sur le volcano plot. De plus, le nom des cinq gènes les plus significativement dérégulés (top 5 des ARNm induits et top 5 des ARNm réprimés) est également indiqué sur le volcano plot.

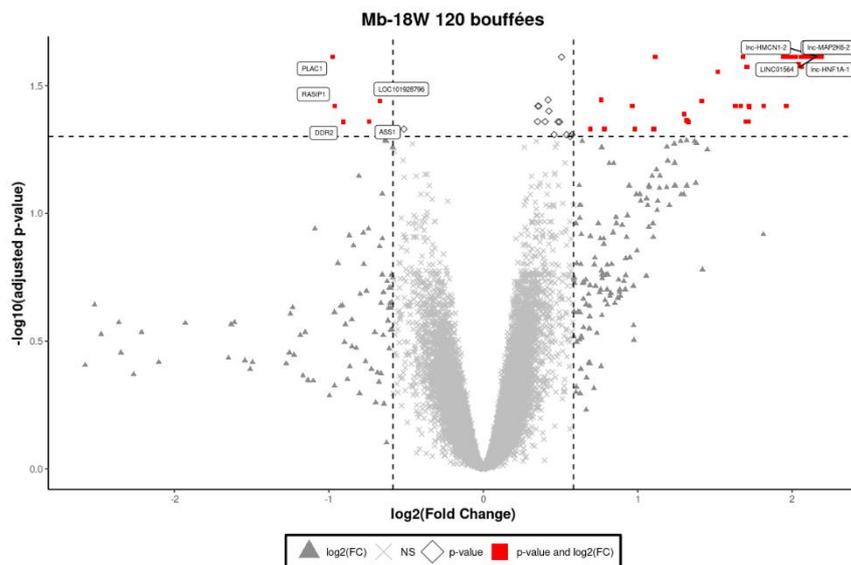


Figure 30 : Analyse de l'expression génique par Volcano Plot après exposition à la Mb-18W

Analyse de l'expression génique par Volcano Plot de l'exposition à 120 bouffées de Mb-18W. Les données proviennent de l'analyse transcriptomique de la Mb-18W vs contrôle 24h post-exposition à partir de 4 cultures indépendantes. Le volcano plot place chaque gène sur le graphique en fonction de son \log_2 (fold change) (sur l'axe des x) et de son $-\log(p\text{-value})$ (sur l'axe des y). Les gènes ayant un fold-change supérieur à 1,5 et une p-value ajustée inférieure à 0,05 apparaissent en rouge sur le volcano plot.

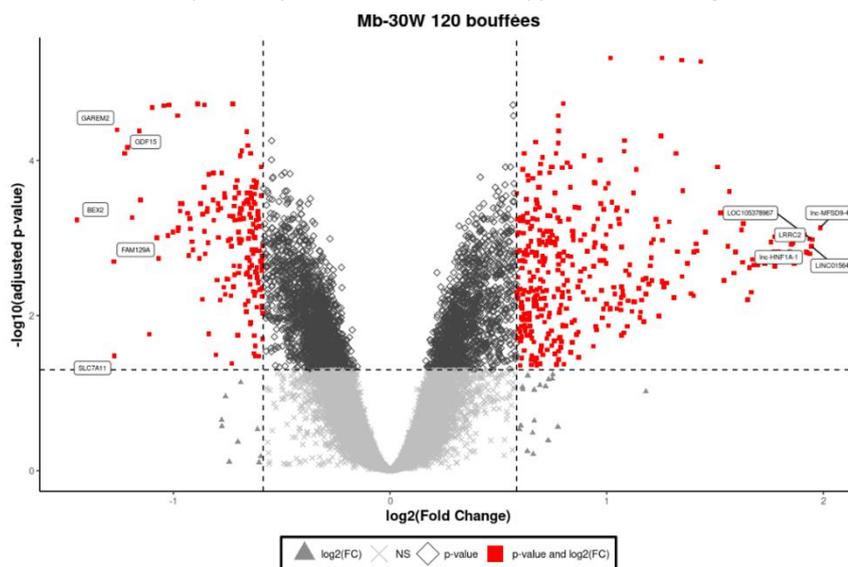


Figure 31 : Analyse de l'expression génique par Volcano Plot après exposition à la Mb-30W

Analyse de l'expression génique par Volcano Plot de l'exposition à 120 bouffées de Mb-30W. Les données proviennent de l'analyse transcriptomique de la Mb-30W vs contrôle 24h post-exposition à partir de 4 cultures indépendantes. Le volcano plot place chaque gène sur le graphique en fonction de son \log_2 (fold change) (sur l'axe des x) et de son $-\log(p\text{-value})$ (sur l'axe des y). Les gènes ayant un fold-change supérieur à 1,5 et une p-value ajustée inférieure à 0,05 apparaissent en rouge sur le volcano plot.

Les volcano plot pour les cigarettes électroniques (Figure 30 et Figure 31), sont très différents. En effet, on remarque ici, comme présenter dans le Tableau 19, qu'il y a beaucoup plus de gènes significativement dérégulés avec l'e-cig à la plus forte puissance (30 W). De plus, on peut remarquer 2 gènes communs (*Inc-Hnf1A-1* et *LINC01564*) dans le top 5 des gènes les plus dérégulés entre ces deux puissances d'e-cig.

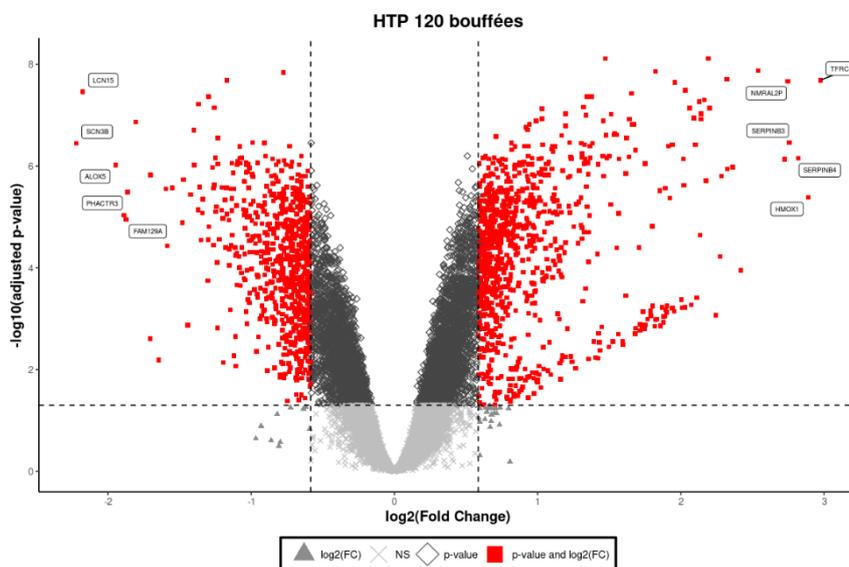


Figure 32 : Analyse de l'expression génique par Volcano Plot après exposition au HTP

Analyse de l'expression génique par Volcano Plot de l'exposition à 120 bouffées de HTP. Les données proviennent de l'analyse transcriptomique du HTP vs contrôle 24h post-exposition à partir de 4 cultures indépendantes. Le volcano plot place chaque gène sur le graphique en fonction de son log2(fold change) (sur l'axe des x) et de son -log(p-value) (sur l'axe des y). Les gènes ayant un fold-change supérieur à 1,5 et une p-value ajustée inférieure à 0,05 apparaissent en rouge sur le volcano plot.

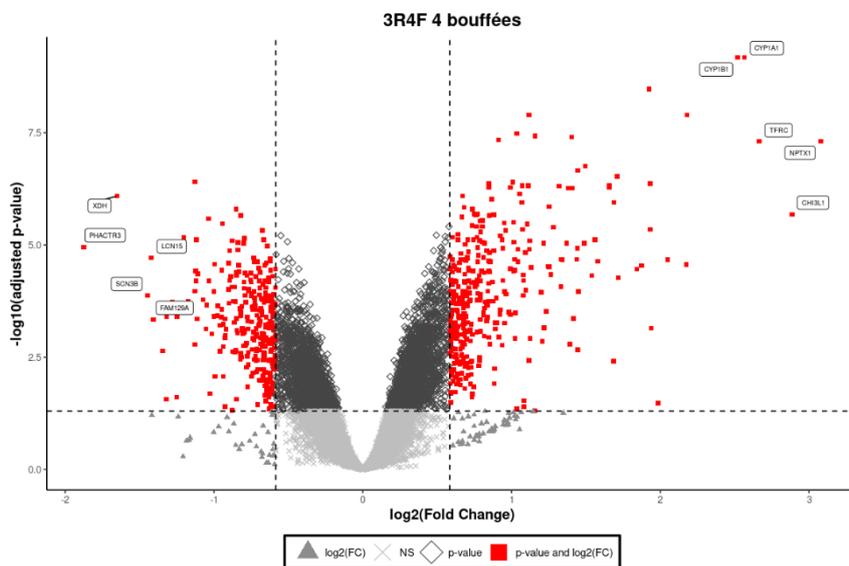


Figure 33 : Analyse de l'expression génique par Volcano Plot après exposition à la cigarette

Analyse de l'expression génique par Volcano Plot de l'exposition à 4 bouffées de cigarette. Les données proviennent de l'analyse transcriptomique de la cigarette vs contrôle 24h post-exposition à partir de 4 cultures indépendantes. Le volcano plot place chaque gène sur le graphique en fonction de son log2(fold change) (sur l'axe des x) et de son -log(p-value) (sur l'axe des y). Les gènes ayant un fold-change supérieur à 1,5 et une p-value ajustée inférieure à 0,05 apparaissent en rouge sur le volcano plot.

Pour les produits du tabac, on peut observer qu'il y a plus de transcrits dérégulés avec le HTP (mais rappelons que les doses d'exposition ne sont pas les mêmes entre les 2 produits du tabac). Parmi les gènes les plus fortement dérégulés pour le HTP, il y a celui qui code pour la protéine antioxydante HMOX1 (FC = 7,4), connue

pour être régulée par le facteur de transcription NRF2 et impliquée dans la réponse au stress oxydatif. La forte augmentation de l'expression de ce gène constitue un nouvel indice cohérent avec les résultats précédemment obtenus par le test des comètes modifié avec hOGG1 qui avait démontré la présence de lésions oxydative de l'ADN. Ces constatations renforcent l'hypothèse que l'exposition au tabac chauffé engendre un stress oxydatif au niveau cellulaire. La cigarette augmente l'expression des gènes codant pour le CYP1A1 (FC = 5,9) et le CYP1B1 (FC = 5,7) qui sont impliqués dans le métabolisme des médicaments et la synthèse du cholestérol, des stéroïdes et d'autres lipides. Les CYP1A1 et CYP1B1 sont induits par certains HAP présents dans la fumée de cigarette. Ces CYPs P450 sont capables de métaboliser certains HAP en intermédiaires cancérigènes, ils sont donc associés au risque de cancer du poumon (Androutsopoulos et al., 2009; PubChem, 2008). On peut aussi remarquer des gènes communs dans les top 5 pour le HTP et la cigarette (*FAM129A*, *LCN15*, *SCN3B*, *PHACTR3* et *TFRC*).

Après avoir analysé le nombre de modulations transcriptomiques engendrées par les différentes expositions, il apparaît intéressant de comparer les similitudes ou différences de dérégulations entre les dispositifs grâce à des diagramme de Venn (Figure 34).

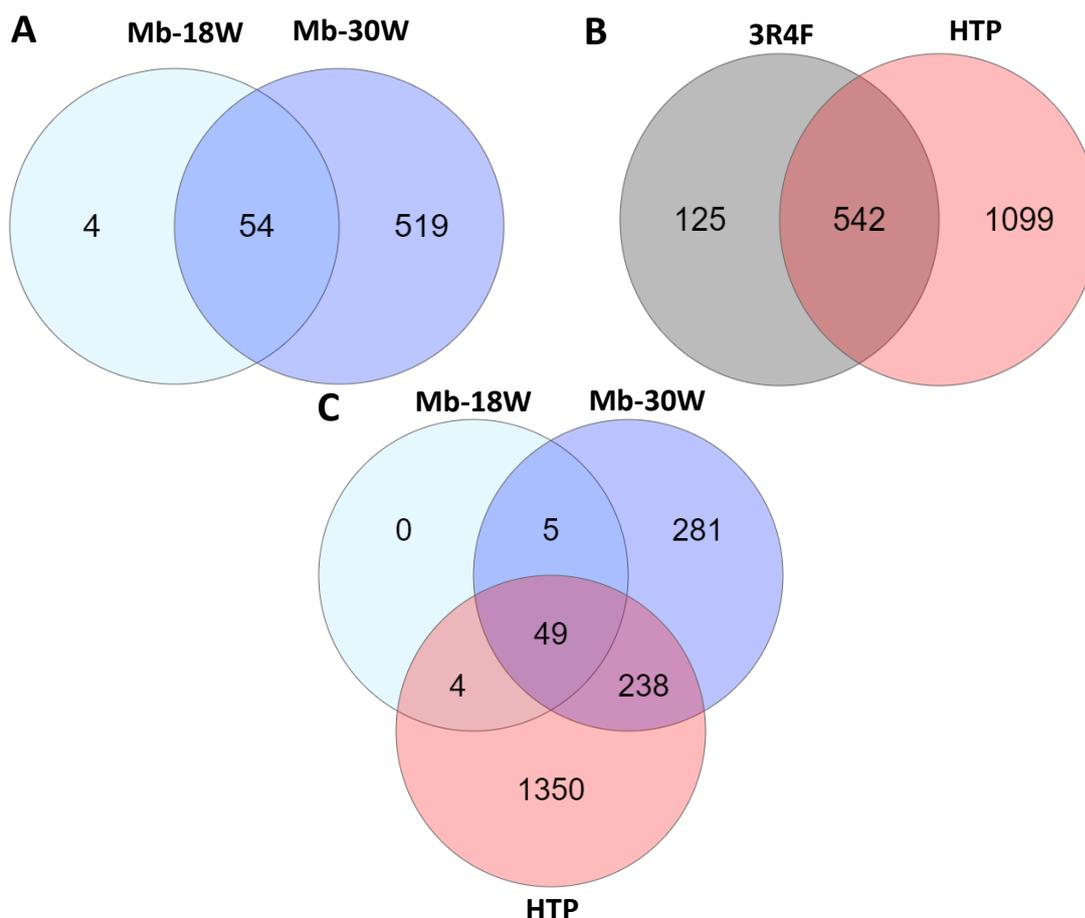


Figure 34 : Comparaison des dérégulations transcriptomiques par des diagrammes de Venn

(A) Comparaison des gènes dérégulés par la Mb-18W et par la Mb-30W (B) Comparaison des gènes dérégulés par la cigarette 3R4F et par le HTP (C) Comparaison des gènes dérégulés par la Mb-18W, le Mb-30W et le HTP. Les gènes sélectionnés ont un fold-change $|FC| > 1,5$ et un p-value $< 0,05$ par comparaison de chaque dispositif par rapport au contrôle négatif (cellules non-exposées). Résultats obtenus à partir de n=4 cultures indépendantes pour chaque condition. (Résultats obtenus pour une exposition de 120 bouffées pour Mb-18W, Mb-30W et HTP et 4 bouffées pour la cigarette 3R4F)

Le premier diagramme (Figure 34-A) nous permet de montrer que l'e-cig MB-18W a plus de 90% (54/58) de ses ARNm dérégulés en commun avec la Mb-30W. Avec le second digramme de Venn (Figure 34-B), on remarque que 542 transcrits ont été dérégulés de la même manière entre les deux produits du tabac, ce qui correspond à 81% (542/667) des gènes dérégulés pour la cigarette 3R4F. Les produits du tabac semblent donc induire des altérations du transcriptomes qui sont semblables. Si on s'intéresse à la comparaison des e-cigs (18 et 30 W) et de le HTP (Figure 34-C) exposés chacun à 120 bouffées, 49 ARNm dérégulés sont communs aux 3 dispositifs, 1350 gènes sont spécifiquement dérégulés par le HTP et 281 gènes sont spécifiquement dérégulés par la Mb-30W.

Afin d'identifier de potentielles signatures transcriptomiques, nous avons réalisé une heatmap à partir des transcrits significativement dérégulés par l'e-cig, le HTP et la cigarette. Cette analyse permet d'observer d'éventuels regroupements hiérarchiques (ou clustering) entre les différents dispositifs (Figure 35).

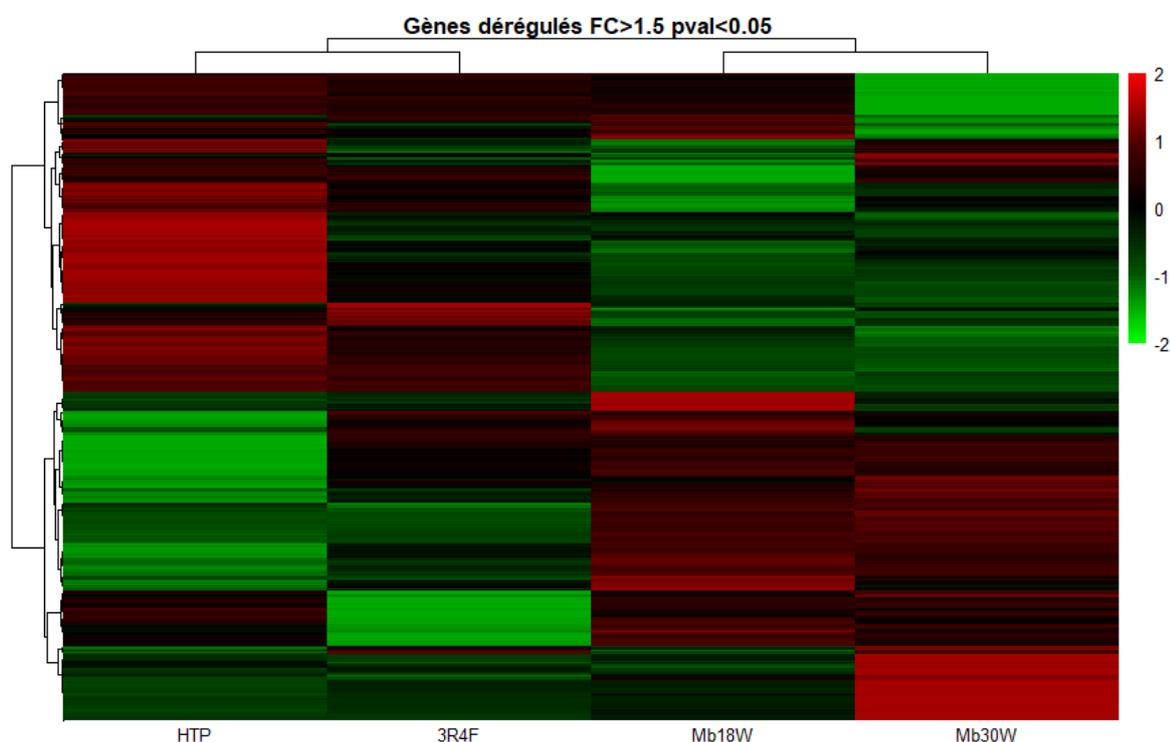


Figure 35 : Heatmap des gènes significativement dérégulés après une exposition de 120 bouffées à l'e-cig, au HTP ou à la cigarette

Les gènes sélectionnés ont un fold-change $|FC| > 1,5$ et une p-value $< 0,05$ par comparaison de chaque dispositif par rapport au contrôle négatif (cellules non-exposées). Résultats obtenus à partir de $n=4$ cultures indépendantes pour chaque condition. Chaque gène est représenté par une ligne de la heatmap avec le code couleur suivant : rouge lorsqu'il est induit et vert lorsqu'il est inhibé par rapport au contrôle négatif. En noir : pas de dérégulation significative

Sur cette heatmap, on remarque que deux regroupements se sont créés. En effet, d'un côté on retrouve un bras avec la cigarette 3R4F et le HTP et de l'autre côté un bras avec les 2 e-cigs Mb-18W et Mb-30W. Ainsi, cela signifie que le profil transcriptomique de le HTP se rapproche de celui de la cigarette conventionnelle alors que ceux des 2 e-cigs sont plus semblables. Pour approfondir notre compréhension des dérégulations

précédemment observées, il est pertinent d'explorer les mécanismes dans lesquels ces gènes interviennent. Pour cela, une analyse fonctionnelle des gènes peut être entreprise.

4.2. Comparaison des voies de signalisation et fonctions biologiques dérégulées

4.2.1. Analyses avec Ingenuity Pathway Analysis

Afin d'interpréter les altérations transcriptomiques et de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la toxicité des différents dispositifs, une analyse fonctionnelle a été réalisée avec les outils « Voies Canonique », « Maladie et Fonction biologique » et « Régulateur en amont » du logiciel « Ingenuity Pathway Analysis » (IPA) (Outils décrit dans le « Matériel et Méthodes »). Les résultats issus d'IPA sont présentés sous forme de heatmaps permettant d'observer d'éventuels regroupements hiérarchiques (ou clustering) entre les différents dispositifs (Figure 36). Seuls les résultats obtenus avec les expositions à 120 bouffées de Mb-18W, Mb-30W, HTP et 4 bouffées de cigarette sont présentés ci-dessous.

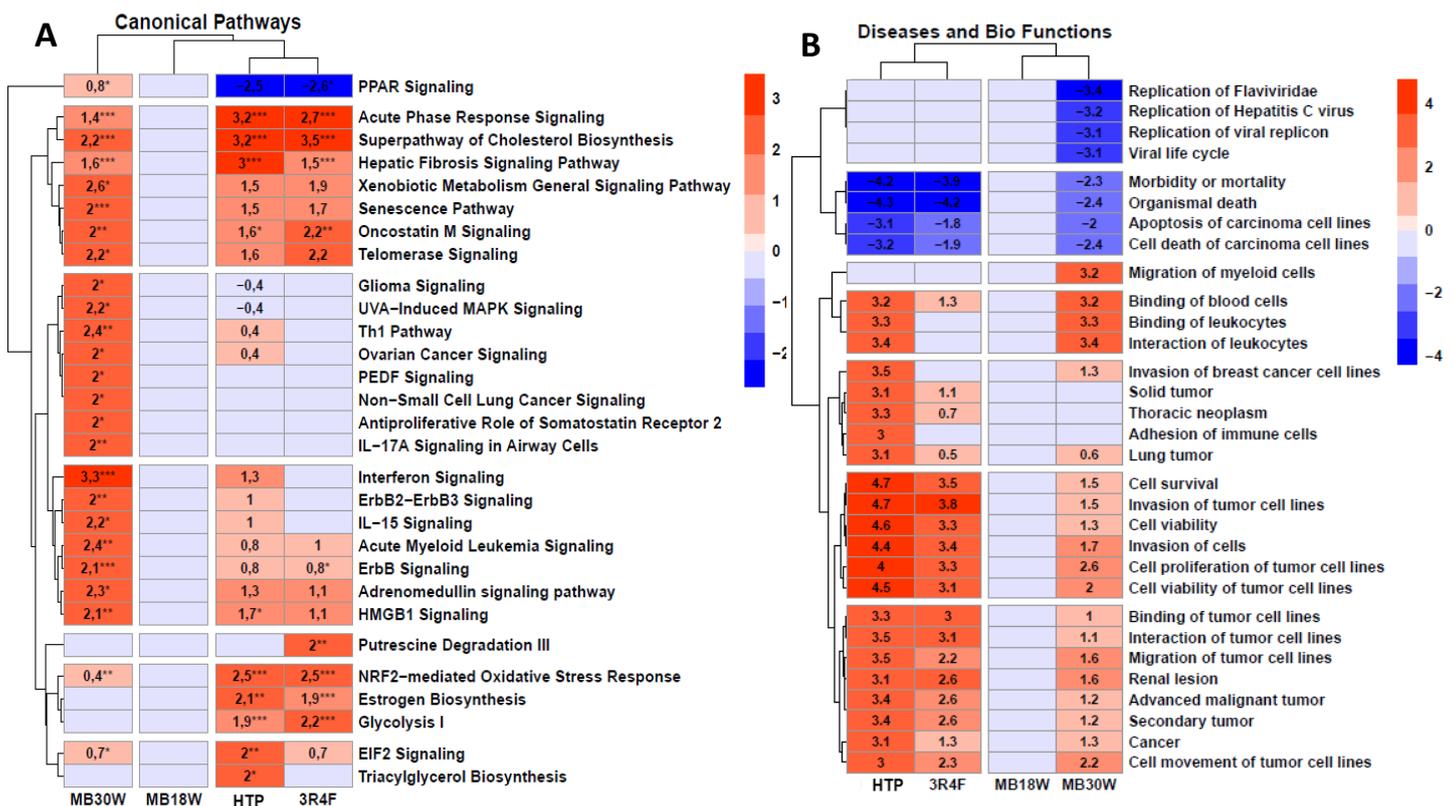


Figure 36 : Heatmaps représentant les voies canoniques (A) et les fonctions biologiques (B) dérégulées par une exposition aux émissions d'e-cig (Mb-18W et Mb-30W), de HTP et de cigarette 3R4F

Analyses issues du logiciel IPA®) avec le gradient de couleur suivant : la couleur « orange » indique une activation prédite (z-score > 0), la couleur « bleue » indique une inhibition prédite (z-score < 0), la couleur « grise » indique une absence d'activation ou d'inhibition prédite (z-score ≈ 0). La significativité donne la p-value du test statistique réalisé : * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001. Résultats obtenus à partir de n=4 cultures indépendantes pour chaque exposition. (A) La voie canonique présentée a été filtrée sur 2 conditions : |Z-score| > 2 dans au moins une condition et p-value d'association < 0,05. B) La fonction biologique a été filtrée sur 2 conditions : |Z-score| > 3 dans au moins une condition et p-value d'association < 0,05. Pour l'ensemble des fonctions biologiques, toutes les valeurs sont très largement significatives mais les étoiles n'ont pas été indiquées ici.

Les voies canoniques sont des cascades de réactions/ des voies idéalisées ou généralisées qui représentent les propriétés communes d'un module ou d'une voie de signalisation particulière et contribuent à la régulation (activation ou inhibition) de fonctions biologiques particulières. La heatmap des voies canoniques (Figure 36-A) permet d'observer la faible réponse de la Mb-18W par rapport aux autres dispositifs. En effet, aucune voie n'est significativement dérégulée. Cela peut être expliqué par le petit nombre de transcrits (58) qui étaient dérégulés par l'e-cig réglée à cette faible puissance. A l'inverse, de nombreuses voies sont rapportées perturbées par la MB-30W, le HTP et la 3R4F.

La voie « Biosynthèse du cholestérol » est celle qui est la plus activée avec les 3 dispositifs. La voie « Glycolyse I » est également activée par les produits du tabac. Ces 2 voies présentent un lien avec la cancérogenèse (Gorin et al., 2012; Razungles et al., 2013). En effet, la biosynthèse active des stérols reste une composante métabolique essentielle du cancer. L'analyse de profil transcriptionnel a démontré que les cancers réfractaires présentent une surexpression significative d'un certain nombre de gènes de la voie du cholestérol. À titre d'exemple, une signature transcriptionnelle de la voie des stérols a été identifiée pour le cancer du sein réfractaire MUC1-positif et le CBNPC (Gorin et al., 2012). La voie « Glycolyse I », augmentée avec les produits du tabac, est impliquée dans le métabolisme énergétique. L'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes impliquées dans cette voie est augmentée (ALDOC, ENO1, GPI, PFKM, PFKP, PGK1). De plus, l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (GLS2, NDUFA4) et la maintenance mitochondriale (5', 3'-nucléotidase NT5M, thymidine kinase 2 TK2) est inhibée. NT5M et TK2 régulent le pool de désoxyribonucléotides mitochondriaux (dNTP) (Saada et al., 2003). Lorsque la production mitochondriale du pool de dNTP est déficiente, le résultat est un déséquilibre du pool de nucléotides dans les mitochondries qui sont utilisées pour répliquer l'ADNmt et les mitochondries ne peuvent pas produire une énergie adéquate. Toutes ces dérégulations génétiques suggèrent que les mitochondries pourraient être dysfonctionnelles et que les cellules pourraient principalement utiliser la glycolyse pour générer de l'ATP, un métabolisme décrit dans les cellules cancéreuses par Otto Warburg. En effet, les cellules cancéreuses n'utilisent pas leurs mitochondries dans la même mesure et de la même manière que les cellules non cancéreuses. La respiration mitochondriale est associée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui sont des composés très réactifs. La capacité accrue de glycolyse, pour générer de l'ATP et la dépendance réduite au métabolisme mitochondrial (utilisant l'oxygène) protègent les cellules cancéreuses des conséquences négatives de l'augmentation des niveaux d'ERO. Pour résumer, les cellules cancéreuses sont capables de diminuer la production de ROS par leurs mitochondries en augmentant le taux de glycolyse aérobie (Harris and Johnson, 2019). Ainsi, l'activation de cette voie métabolique par les produits du tabac suggère que les cellules exposées à ces substances pourraient présenter des altérations métaboliques qui ressemblent à celles présentes dans les cellules cancéreuses, avec une préférence accrue pour la glycolyse pour la production d'énergie.

On observe également des dérégulations du métabolisme lipidique. En effet, alors que les 3 dispositifs induisent la voie « Biosynthèse du cholestérol », la voie « Biosynthèse du triacylglycérol » est activée uniquement pour le HTP. Il est également intéressant de noter une activation de la voie « Biosynthèse des œstrogènes » avec le HTP et la cigarette. D'autre part, on observe une inactivation de la voie de signalisation « Signalisation de PPAR » par le HTP et la cigarette 3R4F. Cette voie joue un rôle crucial dans la régulation de la différenciation cellulaire, du développement, du métabolisme des xénobiotiques, de la prolifération cellulaire, de l'inflammation et de la tumorigenèse par l'activation (ou l'inhibition) d'isoformes de PPAR (Berger and Moller, 2002; Xiaowen Liu et al., 2020). En effet, l'activation thérapeutique de PPAR β/δ entraînerait des altérations favorisant un profil pro-tumorigène (Wagner and Wagner, 2020). De plus, tous les sous-types sont activés par des ligands endogènes et participent à la régulation de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides (fonction peroxysomale, l'oxydation des lipides, la synthèse des lipides, la différenciation adipocytaire, l'action de l'insuline) (Berger and Moller, 2002). L'inactivation observée pour cette voie avec les produits du tabac (uniquement significative avec la cigarette conventionnelle) pourrait donc jouer un rôle dans la régulation du métabolisme du glucose et des lipides ainsi que dans d'autres processus biologiques.

On observe aussi une activation de la voie « Signalisation de la fibrose hépatique » avec les 3 dispositifs, dont la signalisation ne serait finalement pas si différente de celle de la fibrose pulmonaire (Makarev et al., 2016).

Des voies de la réponse au stress (« Signalisation de réponse en phase aiguë » et « Stress oxydatif médié par NRF2 ») sont d'avantage dérégulées par les produits du tabac que par la Mb-30W. En revanche, la voie « Sénescence » n'est activée significativement qu'avec la Mb-30W. Plusieurs transcrits sont induits dans cette voie (*CCNB1*, *MAP2K6* et *PIK3C2B*) ou réprimés (*MDM2*, *CDKN1A*, *JUN* et *ATF3*) uniquement avec l'e-cig à la plus forte puissance. La sénescence est un état cellulaire caractérisé par un arrêt stable du cycle cellulaire qui est généralement activé en réponse à un stress oxydant/génotoxique (notamment des cassures doubles brin) et/ou une activation d'oncogène ou inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Bielak-Zmijewska et al., 2018; Xue-ling Liu et al., 2018). Cependant, nous n'avons pas observé de dommages à l'ADN avec le test des comètes pour l'e-cig. D'autre part, la sénescence peut également avoir lieu même en absence de stress oxydant ou de dommages à l'ADN (Bielak-Zmijewska et al., 2018). En effet, une sénescence prématurée pourrait notamment être induite par des processus métaboliques liés à un dysfonctionnement mitochondrial (Wiley et al., 2016).

Certaines voies liées à la réponse immunitaire et inflammatoire sont activées spécifiquement pour la Mb-30W. On trouve les voies « Signalisation de l'IL-17A dans les cellules des voies respiratoires », « Signalisation de l'IL-15 » et « Signalisation de l'interféron ».

La mise en lumière d'altérations dans les voies canoniques grâce à l'analyse fonctionnelle des données transcriptomiques permet une meilleure compréhension de la réponse cellulaire après une exposition aux

produits du tabac et de l'e-cig. Cependant, pour véritablement appréhender l'impact de ces altérations, il est essentiel de les relier aux conséquences biologiques et aux liens potentiels avec des maladies. C'est dans cette optique que nous explorerons maintenant les « Maladies & Fonctions biologique » qui prédisent les effets biologiques et potentiellement pathologiques induits par l'exposition, et sont présentées dans la heatmap (Figure 36-B).

Comme c'était déjà le cas pour les voies canoniques, la Mb-18W ne présente aucune perturbation de fonctions biologiques. Pour les autres dispositifs, une inhibition significative des voies de mort cellulaire (« Apoptose des lignées cellulaires de carcinome », « Mort cellulaire des lignées cellulaires de carcinome ») est observée. Celle-ci s'accompagne notamment d'une activation des voies de survie, de prolifération et d'invasion cellulaire (« Invasion de cellules », « Survie cellulaire », « Tumeur maligne avancée », « Viabilité cellulaire », « Prolifération cellulaire de lignées cellulaires tumorales »), qui apparaît plus forte pour le HTP que pour les deux autres dispositifs. On peut aussi observer des inductions de pathologies et fonctions biologiques liées au cancer avec le HTP : « Cancer », « Tumeur pulmonaire ». En revanche, les voies canoniques montrent une activation de la signalisation du cancer du poumon à non petit cellules uniquement avec la Mb-30W.

Afin d'émettre des hypothèses sur l'origine de ces dérégulations, l'étude des « régulateurs en amont » prédits par le logiciel IPA peut s'avérer utile. Ils permettent de prédire quelles molécules régulatrices en amont ont pu causer les dérégulations géniques observées. En effet, la dérégulation de la plupart des transcrits dans un système est généralement dû à l'activation ou l'inhibition de protéines en amont (facteurs de transcription, kinases, transporteurs...). Au vu des résultats obtenus précédemment, des régulateurs en amont traditionnellement impliqués dans la prolifération tumorale, le métabolisme lipidique et l'inflammation ont été considérés sur la base de leur z-score (> 2) et leur p-value d'association ($< 0,05$) (Figure 37).

Ainsi, de nombreux régulateurs potentiellement impliqués dans la prolifération tumorale (Figure 37-A) tels que ERK, MEK, EGFR, PI3K, MTOR, AKT1, STAT3 ont été prédits comme activés avec la MB-30W, le HTP et la cigarette. Le HTP se distingue toutefois des deux autres par des activations généralement plus fortes. La cigarette est le dispositif qui s'en rapproche le plus en termes de niveaux d'activité et de régulateurs partagés spécifiquement. Notamment, les proto-oncogènes ABL1 et MYC apparaissent activés uniquement pour le HTP et la cigarette et inhibés avec le Mb-30W. Il est d'ailleurs intéressant d'observer une inhibition du proto-oncogène KRAS pour la MB-30W alors qu'on le trouve activé pour le HTP et la 3R4F. L'activation d'ABL1, MYC et KRAS avec le HTP et la cigarette suggère un potentiel renforcement des voies de signalisation favorisant la prolifération cellulaire et la transformation maligne. En revanche, l'inhibition de KRAS en réponse à la MB-30W pourrait indiquer une réduction du potentiel tumorigène, car KRAS est fréquemment impliqué dans la promotion de la croissance tumorale.

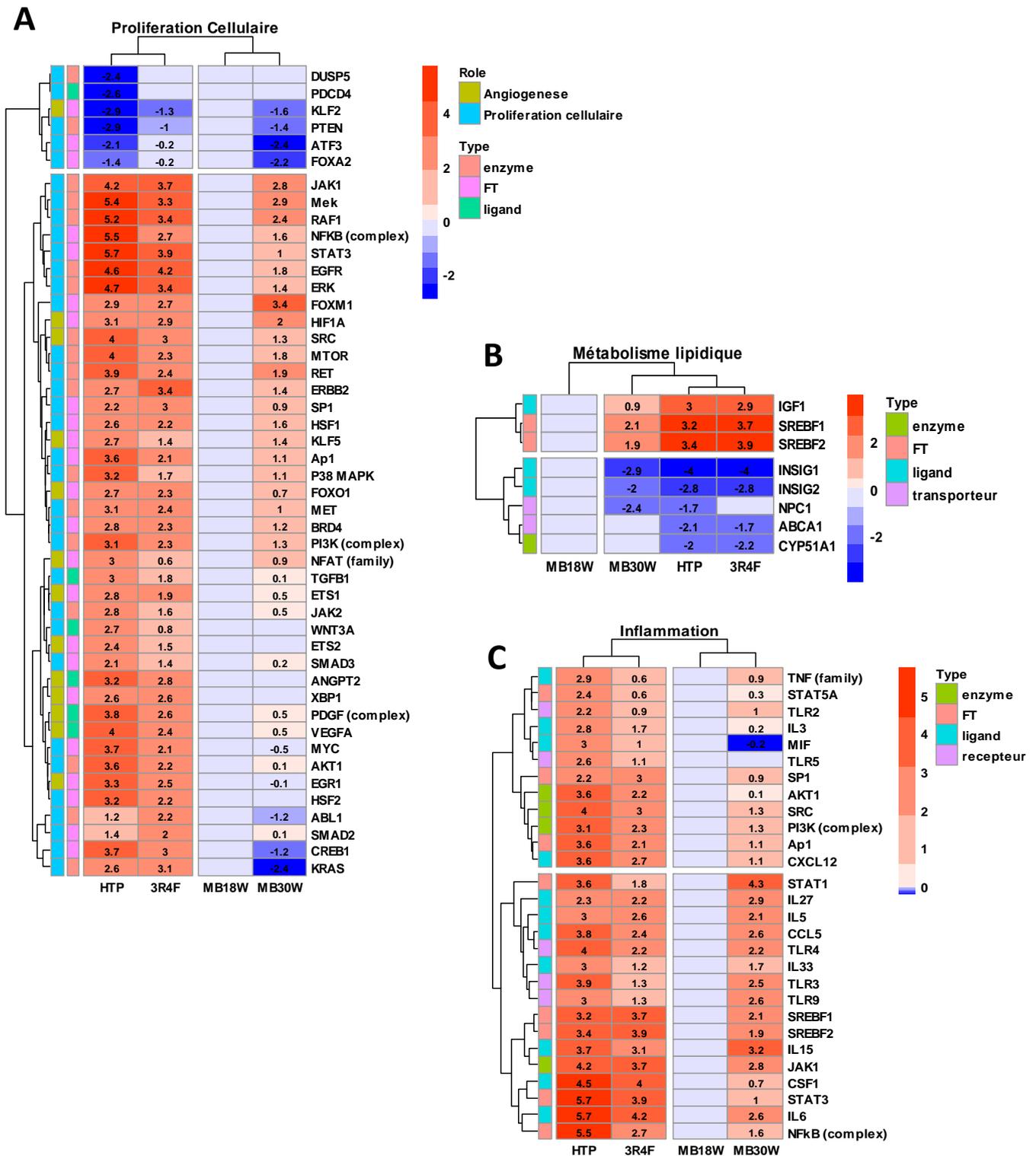


Figure 37 : Heatmaps des prédictions de « régulateurs en amont » après une exposition de 120 bouffées d'e-cig, HTP et cigarette

Analyses issues du logiciel IPA® avec le gradient de couleur suivant : la couleur « rouge » indique une activation prédite (z-score > 0), la couleur « bleue » indique une inhibition prédite (z-score < 0), la couleur « grise » indique une absence d'activation ou d'inhibition prédite (z-score ≈ 0), dans la prolifération tumorale (A), le métabolisme lipidique (B) et la réponse inflammatoire (C). Résultats obtenus à partir de n=4 cultures indépendantes pour chaque condition. Les régulateurs en amont présentés ont été filtrés sur 3 conditions : 1) |Z-score| > 2 dans au moins une condition 2) p-value d'association < 0,05 3) Abondance dans la littérature. Toutes les valeurs sont significatives.

Les profils d'activité des régulateurs retenus pour le métabolisme lipidique sont globalement similaires entre les différents dispositifs (excepté pour ABCA1 et CYP51A1 qui ne sont prédits inhibés que pour le HTP et la cigarette et NPC1 qui est n'est prédit inhibé qu'avec le HTP et la Mb-30W) (Figure 37-B).

Enfin, on observe l'activation de nombreux régulateurs impliqués dans la réponse inflammatoire (Figure 37-C) ; et cette activation est globalement plus forte pour le HTP (ex : NF-kB, IL6, STAT3, JAK1, CSF1, IL-15).

Les résultats obtenus avec les expositions à 60 bouffées de Mb-18W, Mb-30W, HTP sont similaire à ceux présenté ci-dessus. Les résultats sont disponibles en annexes (1 et 2).

4.2.2. Analyse des voies de signalisation par enrichissement (GSEA)

Afin d'approfondir les résultats obtenus par IPA, nous avons réalisé une l'analyse d'enrichissement d'ensemble de gènes (GSEA) (Cf. Matériels et Méthodes). Pour d'obtenir une vue d'ensemble des enrichissements obtenus pour les différents dispositifs grâce au logiciel GSEA, une heatmap a été réalisée avec les résultats d'enrichissements (Figure 38). Seuls les ensembles avec un FDR >0,25 et un p-value <0,05 ont été pris en compte.

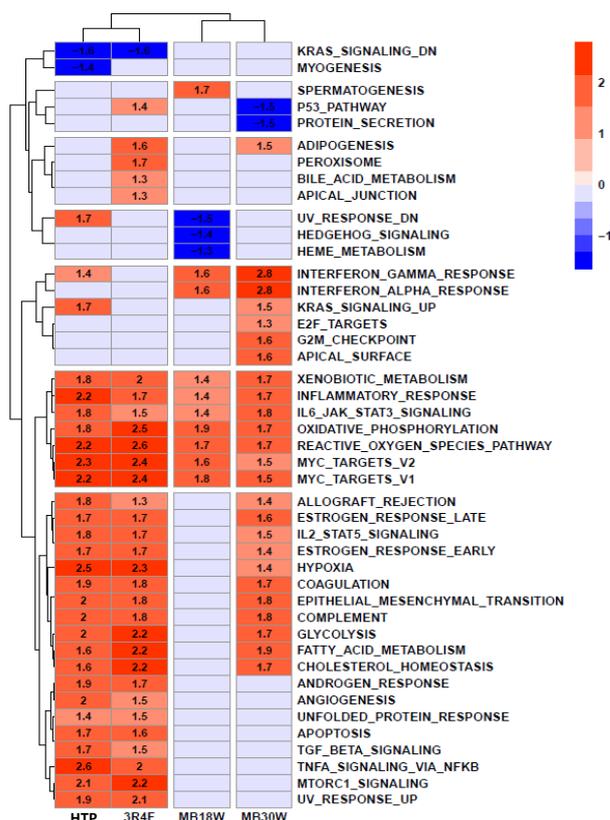


Figure 38 : Heatmap de l'enrichissement de gènes par une exposition aux émissions d'e-cig (Mb-18W et Mb-30W), de HTP et de cigarette 3R4F

Analyses issues du logiciel « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) et l'ensemble de gènes HALLMARK avec le gradient de couleur suivant : la couleur « rouge » indique une activation significative prédite (NES > 0), la couleur « bleue » indique une activation significative pour le second phénotype (contrôle négatif) (NES < 0), la couleur « grise » indique une absence d'activation ou d'inhibition significative. Tous les ensembles présentés sont significatifs avec une p-value <0,05 et un FDR <0,25. Résultats obtenus à partir de n=4 cultures indépendantes pour chaque condition.

Alors qu'aucune voie n'était dérégulée avec l'analyse IPA® pour la Mb-18W (120 bouffées), le logiciel GSEA prédit plusieurs ensembles de gènes potentiellement activés. On observe des ensembles de gènes similaires aux autres dispositifs : « Métabolisme des xénobiotiques », « Réponse inflammatoire », « Voie des espèces réactives de l'oxygène », « Phosphorylation oxydative » ainsi que « cibles de Myc ». Tout comme pour la Mb-30W, on observe une augmentation de la régulation des voies des interférons alpha et gamma. Ce dernier résultat est cohérent avec l'analyse de IPA® où la voie « Signalisation de l'interféron » était augmentée avec la Mb-30W. De plus, on peut remarquer que, dans cette analyse GSEA, la glycolyse et le stress oxydant sont induites pour la Mb-30W alors que ce résultat n'était pas significatif avec l'analyse sur IPA®. On retrouve aussi une augmentation de l'activation des voies du cholestérol et du métabolisme lipidique avec la Mb30W mais aussi pour les produits du tabac.

Pour continuer, les ensembles de gènes activés sont en grande partie similaires aux données d'IPA® pour la cigarette et le HTP. En effet, on peut observer un enrichissement des ensembles concernant la glycolyse, le stress oxydant, la prolifération tumorale (observé ici avec l'ensemble lié à l'angiogenèse), la synthèse de l'œstrogène.

Alors que certaines voies liées à la réponse immunitaire et inflammatoire sont activées spécifiquement pour la Mb-30W avec les données d'IPA®, elles sont aussi activées avec le HTP avec l'enrichissement. On observe tout de même principalement une augmentation de la réponse des interférons avec la Mb-30W tout comme sur IPA®. Les voies liées au stress oxydant sont aussi augmentées avec l'e-cig alors qu'elle ne l'était que pour les produits du tabac. En revanche, la fonction biologique « apoptose » est augmentée par l'approche GSEA alors que l'inverse était prédit avec le logiciel IPA®.

Ainsi, l'analyse effectuée avec GSEA est cohérente avec la plupart des résultats que nous avons observés à travers l'utilisation d'IPA®. Cependant, il est important de mentionner que malgré cette convergence, quelques résultats contradictoires ont été constatés pour l'apoptose. Ainsi il serait intéressant d'évaluer les types de morts cellulaires par des analyses complémentaires afin de confirmer ou non ces résultats. On peut aussi noter que GSEA se montre particulièrement plus sensible, notamment avec la Mb-18W malgré son faible nombre de gènes significativement dérégulés. En revanche, il est crucial de noter que la sensibilité n'implique pas nécessairement une efficacité optimale et donc des prédictions totalement fiables. Dans cette optique, il est primordial de mettre en avant que les résultats issus de ces méthodes bio-informatiques ne représentent qu'une première étape de prédiction. Par conséquent, il est impératif de valider ces résultats au niveau phénotypiques en étudiant chacune de ces voies par d'autres méthodes. Cette démarche de validation demeure indispensable pour la poursuite de notre recherche.

4.3. Discussion sur les analyses transcriptomiques

4.3.1. Dérégulations transcriptomiques par les produits du tabac

Notre étude transcriptomique a révélé de nombreuses similitudes dans les voies dérégulées par le HTP et la cigarette, notamment en ce qui concerne le stress oxydatif, la glycolyse, la réponse de phase aiguë, les voies du métabolisme lipidique, ainsi que la prolifération et la survie cellulaire. L'analyse effectuée avec IPA® et GSEA a montré des résultats contradictoires pour l'apoptose.

Nous avons observé moins de dérégulations avec la cigarette qu'avec le tabac chauffé dans notre expérience. Mais ce résultat peut facilement être expliqué par le protocole expérimental utilisé. La cigarette étant beaucoup plus toxique, nous avons exposé les cellules à seulement 2 ou 4 bouffées de cigarette 3R4F alors que les cellules ont été exposées à 60 ou 120 bouffées d'HTP ou d'e-cig. Cependant nos résultats sont en accord avec ceux publiés dans la littérature pour le HTP qui mettent en évidence une induction de la réponse immunitaire, de la réponse au stress, de l'angiogenèse et du cycle cellulaire (Haswell et al., 2018), ainsi que du stress oxydatif, ou encore du métabolisme des xénobiotiques (Zanetti et al., 2017). Des études ont montré un impact transcriptomique moins important du HTP par rapport à la cigarette (Haswell et al., 2018 ; Iskandar et al., 2017a). Des chercheurs ont également montré un impact transitoire avec une disparition des perturbations significatives 48 à 72 heures après l'exposition au HTP (Iskandar et al., 2016).

Si on compare le top 5 des transcrits les plus induits par le HTP et la cigarette (Figure 32 et Figure 33), on observe qu'un ARNm est commun aux 2 produits du tabac. Il s'agit du gène *TRFC* (FC = 7,8 pour le HTP et FC = 6,3 pour la cigarette) qui code pour le récepteur de la transferrine (TFRC) qui est un récepteur de surface cellulaire nécessaire à l'absorption cellulaire du fer par le processus d'endocytose. Il a été montré que la régulation positive de TFRC contribuerait à favoriser la ferroptose (Wu et al., 2019). Une étude a exploré le rôle possible de la ferroptose et de l'accumulation de fer dans la progression de la fibrose pulmonaire. En effet, en supprimant spécifiquement l'expression du TFRC dans les fibroblastes chez les souris, les symptômes de la fibrose pulmonaire ont été réduits chez les souris knock-out après induction par la bléomycine (Pei et al., 2022).

Dans le top 5 des transcrits négativement dérégulés (Figure 32 et Figure 33), on a 3 ARNm en commun entre les deux produits du tabac : *LCN15*, *SCN3B* et *PHACTR3*.

Le gène *SCN3B* code pour la sous-unité bêta 3 des canaux sodiques voltage-dépendants. Ce sont des complexes glycoprotéiques transmembranaires composés d'une grande sous-unité alpha et d'une ou plusieurs sous-unités bêta régulatrices. Ils sont responsables de la génération et de la propagation des potentiels d'action dans les neurones et les muscles. Ce gène, jouerait un rôle dans le contexte de tabagisme et de cancer du poumon où il est retrouvé inhibé (Beane et al., 2011). L'inhibition de ce gène est observée dans notre étude suite à l'exposition avec la cigarette mais aussi avec le tabac chauffé.

Alors que le gène *LCN15* n'a jamais été étudié sur cellules pulmonaires, peu d'études sont actuellement publiées sur les implications d'une dérégulation du gène *PHACTR3*. Celui-ci inhibe l'activité de la protéine phosphatase-1 (PP1), qui déphosphoryle un certain nombre de protéines importantes pour la prolifération et la survie cellulaire, notamment la protéine suppresseur de tumeur pRb. En raison de son interaction avec pRb, PP1 peut déclencher l'apoptose (Bankovic et al., 2010). Ainsi, une diminution de l'expression de *PHACTR3* par le tabac chauffé et la cigarette pourrait indirectement augmenter l'apoptose.

En conclusion, l'analyse des top 5 des gènes les plus significativement dérégulés par la cigarette et le HTP révèle des premiers indices sur les mécanismes de toxicité et de cancérogenèse. *SCN3B* pourrait jouer un rôle dans le cancer du poumon, comme suggéré par des études antérieures. *PHACTR3*, bien que peu étudié, semble lié à l'inhibition de l'activité de la protéine phosphatase-1, ce qui pourrait potentiellement influencer l'apoptose.

4.3.2. Dérégulations transcriptomiques par la cigarette électronique

Concernant les effets transcriptomiques de l'e-cig, nous avons constaté des effets moins importants que pour le HTP et la cigarette, avec un plus faible nombre de dérégulations. D'autres études ont précédemment rapporté que l'e-cig altérerait moins l'expression génique par rapport à la fumée de cigarette sur cellules BEAS-2B (Anthérieu et al., 2017; L. Wang et al., 2021) et sur des cultures de cellules bronchiques et nasales (Banerjee et al., 2017; Haswell et al., 2017; Moses et al., 2017; Rayner et al., 2022; Shen et al., 2016).

Dans un premier temps, on peut comparer les voies prédites par les analyses bio-informatique à la littérature. Deux études ont montré que de très discrètes modulations (Anthérieu et al., 2017) ou seulement une voie activée significativement (régulation des ribosomes) (L. Wang et al., 2021) après exposition à l'e-cig. Les e-cig utilisées dans ces études sont des dispositifs de faible puissance. En effet, dans l'étude d'Anthérieu et al., (2017) la cigarette électronique est de 2^{ème} génération alors que dans l'étude de L. Wang *et al.*, (2021), c'est une cigarette électronique de 4^{ème} génération. Les résultats de ces études sont donc proches de ce que nous avons pu observer avec la Mb-18W, ou aucune voie n'a été trouvée dérégulée avec le logiciel IPA[®]. Nous avons montré grâce à l'analyse transcriptomique qu'il y a réellement un impact différent selon la puissance de l'e-cig. Alors que de très faibles dérégulations sont observées avec le modèle Modbox réglé à 18 W, on remarque une augmentation importante des dérégulations transcriptomiques en augmentant la puissance à 30 W. Les principales voies dérégulées avec la Mb-30W étaient impliquées dans la biosynthèse du cholestérol, la signalisation de la réponse de la phase aiguë, le métabolisme des xénobiotiques, l'inflammation, la réponse immunitaire et la senescence.

Les études fonctionnelles menées sur des cultures primaires exposées à l'e-cig ont révélé diverses observations concernant les altérations du transcriptome. Dans certains cas, des perturbations pouvaient être peu apparentes (Banerjee et al., 2017; Rayner et al., 2022), tout comme nos résultats avec la Mb-18W.

Cependant, d'autres investigations ont démontré des modulations de certaines voies avec un indice de confiance bien plus faible qu'avec la cigarette conventionnelle. Ces voies incluent les processus métaboliques/biosynthétiques, l'apoptose et l'hypoxie (Haswell et al., 2017). De manière similaire, des études ont également signalé des variations dans des voies telles que l'hypoxie, la régulation du cycle cellulaire, la réponse aux substances organiques, l'inflammation et les réponses immunitaires (Shen et al., 2016), ainsi que le métabolisme des xénobiotiques, le stress oxydatif, les dommages à l'ADN et l'apoptose (Moses et al., 2017). Ces constatations sont donc en partie en accord avec nos observations faites avec l'e-cig. De plus, Shen *et al.*, (2016) ainsi que Moses *et al.*, (2017) ont montré que l'exposition à l'e-cig pouvait moduler spécifiquement des voies qui n'étaient pas dérégulées avec la cigarette : biosynthèse cellulaire des glycérophospholipides (Shen et al., 2016), diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'assemblage et le mouvement des cils (Moses et al., 2017). Dans notre étude, seules les voies de l'inflammation, la senescence et de la réponse immunitaire n'étaient significativement dérégulées que par la MB-30W et pas avec les produits du tabac.

Dans un second temps, on peut s'intéresser aux top 5 des gènes les plus dérégulés entre ces deux puissances de cigarette électronique (Figure 30 et Figure 31). On remarque que 2 gènes sont communs : *Inc-Hnf1A-1* et *LINC01564*.

La connaissance actuelle sur le long ARN non codant *Inc-Hnf1A-1* demeure limitée. Une étude sur ce dernier, aussi annoté *XLOC_009911*, a mis en évidence son induction dans les échantillons d'urine prélevés chez des patients atteints d'un cancer de la prostate (Lee et al., 2014). De manière similaire, le deuxième long ARN non codant *LINC01564* (également appelé *XLOC_005327*) dérégulé de la même manière avec les 2 puissances d'e-cig (FC = 4,4 pour la Mb-18W et FC = 3,8 pour la MB-30W) a été identifié comme un biomarqueur potentiel dans la même étude. Dans le contexte du cancer de la prostate, il a été significativement exprimé dans les échantillons d'urine de patients atteints de cette maladie (Lee et al., 2014). Par ailleurs, il a également été trouvé comme impliqué dans les cancers gastriques. Des essais *in vitro* ont démontré que *LINC01564* stimule la prolifération, l'invasion et la migration des cellules cancéreuses gastriques. Les résultats obtenus *in vivo* ont également révélé que l'interaction entre *LINC01564* et *POU2F1* favorise la prolifération et les métastases des cellules cancéreuses gastriques (Wang et al., 2022). Ces 2 longs ARN non-codants suscitent des perspectives intéressantes quant à leur rôle potentiel en tant que biomarqueur pour la détection précoce et le suivi du cancer de la prostate et/ou du cancer gastrique. Dans notre étude, l'augmentation de l'expression de ces 2 transcrits pourrait également être associée à un processus de cancérogenèse au niveau pulmonaire cette fois-ci.

On observe d'autre part une diminution de l'expression de *SLC7A11* par la Mb-30W (FC = -2,4). Dans une étude *in vivo*, réalisée au laboratoire, ce gène a également été retrouvé sous-exprimé à la suite d'expositions chroniques aux émissions de Mb-18W. Le gène *SLC7A11* code pour une protéine impliqué dans le transport

de la cystéine, un acide aminé essentiel dans la biosynthèse du glutathion, un puissant antioxydant cellulaire. En facilitant l'importation de la cystine et en favorisant la biosynthèse du glutathion (GSH), cette protéine est impliquée dans la régulation des niveaux de glutathion, qui joue un rôle crucial dans la neutralisation des radicaux libres et la préservation de l'intégrité cellulaire. SLC7A11 empêcherait ainsi l'accumulation d'hydroperoxydes lipidiques et protégerait les cellules de la ferroptose (Koppula et al., 2018). D'autres études ont montré que SLC7A11 pouvait affecter la sensibilité des cellules à la ferroptose en la régulant au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel, ce qui est lié à des lésions pulmonaires aiguës ou des lésions rénales aiguës (Li et al., 2023). De plus, cette protéine semble jouer un rôle clé dans la dépendance métabolique des cellules cancéreuses. Des expériences ont validé que l'inactivation de SLC7A11 inhibe la mort des cellules cancéreuses en cas de manque de glucose, alors que sa surexpression favoriserait leur mort cellulaire (Koppula et al., 2018). Dans notre cas, la diminution de *SLC7A11* pourrait indiquer une diminution des stocks de glutathion, favorisant un stress oxydatif ainsi qu'une inhibition de la mort cellulaire.

Ces premières observations nous montrent que la cigarette électronique pourrait mettre en place des mécanismes impliqués dans la survenue de cancer et de lésions aiguës pulmonaires. Des investigations supplémentaires seront à mener pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, en étudiant par exemple le rôle de LINC01564 et lnc-HnF1A-1 dans la prolifération des cellules épithéliales bronchiques et le rôle de SLC7A11 dans la génération de stress oxydant et l'inhibition de la mort cellulaire.

4.3.3. Dérégulations transcriptomiques communes entre les produits du tabac et du vapotage

Dans cette analyse, des voies la biosynthèse du cholestérol et de signalisation de la fibrose hépatique ont été dérégulées de manière commune aux trois dispositifs. Ces voies sont en lien avec le cancer (Gorin et al., 2012) la signalisation de la fibrose pulmonaire (Makarev et al., 2016). Les trois dispositifs ont activé des voies de survie, de prolifération et d'invasion cellulaire, qui apparaissent plus dérégulées pour le HTP qu'avec les deux autres dispositifs. Des ensembles de gènes similaires ont aussi été observés avec l'enrichissement, impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, l'inflammation et le stress oxydant.

Dans le top 5 des transcrits les plus dérégulés observé avec les volcano plots (Figure 30, Figure 31, Figure 32 et Figure 33, 1 ARNm commun est observé entre les deux produits du tabac et la Mb-30W : *FAM129A*

FAM129A inhibe l'apoptose et favorise la migration et la prolifération des cancers humains. Il jouerait un rôle d'oncogène dans le CBNPC, en régulant positivement les niveaux de protéines de MMP2 et de cycline D1 en activant la voie de signalisation FAK (Zhang et al., 2019). La diminution de l'expression de ce gène avec la cigarette (FC = - 2,7) et le HTP (FC = - 3,7) mais aussi la MB-30W (FC = - 2,4) pourrait aller dans le sens de l'activation de l'apoptose. Il est donc crucial de valider ces résultats au niveau phénotypique en étudiant chacune de ces voies par d'autres méthodes (par exemple utiliser la cytométrie en flux pour étudier l'apoptose/nécrose et le cycle cellulaire).

Les doses d'exposition pour l'analyse transcriptomique ont été choisies à des niveaux de cytotoxicité comparable afin d'observer des mécanismes de toxicité pour chaque dispositif. Cependant, en raison de la forte cytotoxicité de la cigarette, l'exposition à celle-ci a dû être limitée à 2 et 4 bouffées pour maintenir la cytotoxicité à un niveau comparable à celle des autres dispositifs. Cette limitation du nombre de bouffées a eu un impact sur la cinétique de l'exposition, c'est-à-dire la manière dont les cellules ont été exposées à la cigarette par rapport aux autres dispositifs. Cette différence dans la cinétique d'exposition pourrait être une explication des différences du nombre de transcrits dérégulés moins important avec la cigarette qu'avec les autres dispositifs, où davantage de bouffées étaient utilisées.

4.4. Validation des données transcriptomiques

Certains résultats obtenus par l'analyse bio-informatique sont des prédictions, il apparaît donc nécessaire de passer par une étape de validation des modulations transcriptomiques par des analyses au niveau phénotypique. Ainsi, nous avons choisi d'étudier les voies de signalisation et fonctions biologiques suivantes :

- Réponse antioxydante médiée par NRF2
- Voie de signalisation ERK1/2 et AKT
- Senescence
- Fonction mitochondriale et glycolyse

4.4.1. Evaluation de l'expression des ARNm par RTqPCR

Avant de valider les résultats au niveau phénotypique, nous avons voulu vérifier par une seconde technique, la RTqPCR, les dérégulations transcriptomiques observées avec la méthode de puces à ADN. Nous avons sélectionné 18 gènes d'intérêt (choisis parmi les plus dérégulés dans les différentes voies de signalisation) pour cette étape de validation de méthode (Tableau 20) :

Tableau 20 : Gènes choisis pour la validation de l'analyse transcriptomique par RTqPCR

Voies Canoniques/ Fonctions biologiques	Gènes	Voies Canoniques/ Fonctions biologiques	Gènes
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	<i>FOS</i>	Glycolyse I	<i>ENO1</i>
	<i>JUN</i>		<i>ALDOC</i>
	<i>NQO1</i>	Apoptose	<i>BCL2</i>
	<i>HMOX1</i>	Oncostatin M Signaling	<i>CHI3L1</i>
Acute Phase Response Signaling	<i>IL1B</i>		<i>MMP3</i>
	<i>IL6</i>		<i>MMP1</i>
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	<i>CYP1A1</i>	Inhibition of Matrix Metalloproteases	<i>TIMP1</i>
	<i>CYP1B1</i>	Estrogen Biosynthesis	<i>CYP4B1</i>
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	<i>MSMO1</i>		
	<i>HMGCS1</i>		

Les diagrammes ci-dessous représentent les niveaux d'expression par rapport au contrôle négatif pour les 18 gènes testés et pour chaque dispositif (Figure 39).

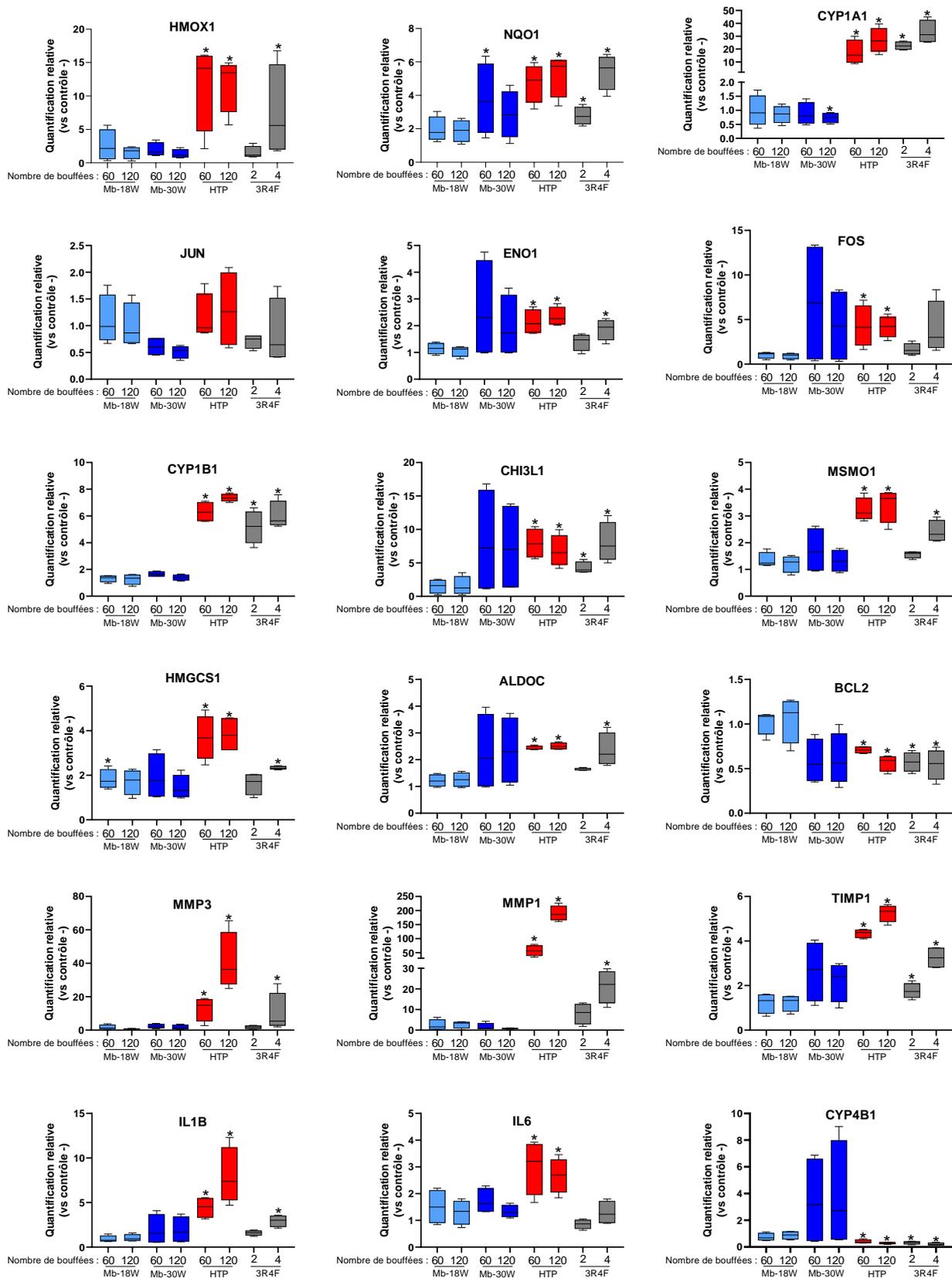


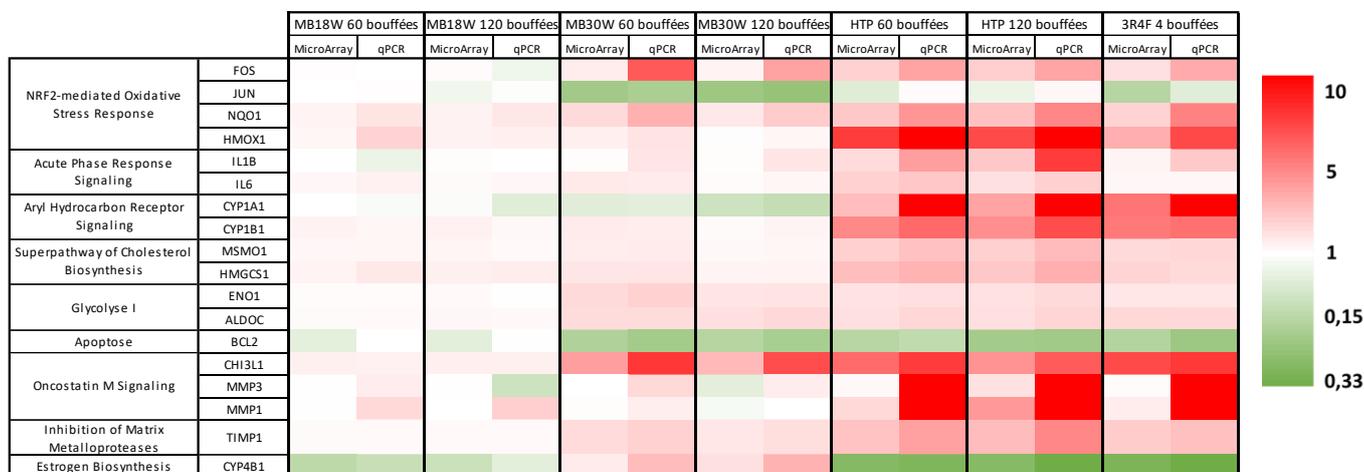
Figure 39 : Validation des données de microarray par RTqPCR pour 18 gènes d'intérêt

Les données de microarray ont été validées par RTqPCR pour 18 gènes d'intérêt, 24h après exposition aux émissions de Mb-18W, Mb-30W, HTP (60 et 120 bouffées) et cigarette (2 et 4 bouffées). Les résultats sont exprimés en quantité relative ($2^{-\Delta\Delta CT}$), par rapport au gène endogène *18S* et aux cellules témoins, arbitrairement fixé à la valeur 1. Résultats obtenus à partir de n=4 cultures indépendantes pour chaque condition et exprimés avec un boxplot représentant la médiane et l'écart interquartile \pm min et max. *(p<0,05, Mann Whitney)

Le Tableau 21 illustre la comparaison des données obtenues par les 2 techniques.

Tableau 21 : Comparaison des intensités relatives d'expression entre les résultats des microarray et de RTqPCR.

Échelle de couleur vert (min 0,33) – blanc (1) – rouge (max 10)



On peut remarquer que les résultats obtenus par les 2 techniques sont proches dans la majorité des cas, ce qui permet de valider les données obtenues par microarray. On peut noter cependant que, pour certains gènes, les facteurs d'induction sont beaucoup plus importants avec la RTqPCR qu'avec les microarrays (*IL1B*, *CYP1A1*, *MMP1*, *MMP3*).

4.4.2. Etude de la réponse antioxydante médiée par NRF2

4.4.2.1. Mesure de l'activité du facteur de transcription NRF2

Nous avons précédemment montré par l'utilisation d'IPA® que la voie « Stress oxydatif médié par NRF2 » était d'avantage induite par les produits du tabac que par la Mb-30W. De plus, l'enrichissement de gènes a mis en évidence un ensemble de gènes impliqués dans la voie des espèces réactives de l'oxygène, suggérant que les produits du tabac et la Mb-30W ont un impact significatif sur les mécanismes cellulaires liés à la réponse au stress oxydatif. Nous avons voulu étudier l'activité du facteur de transcription NRF2, responsable des défenses antioxydantes, après les expositions aux différentes émissions (Figure 40).

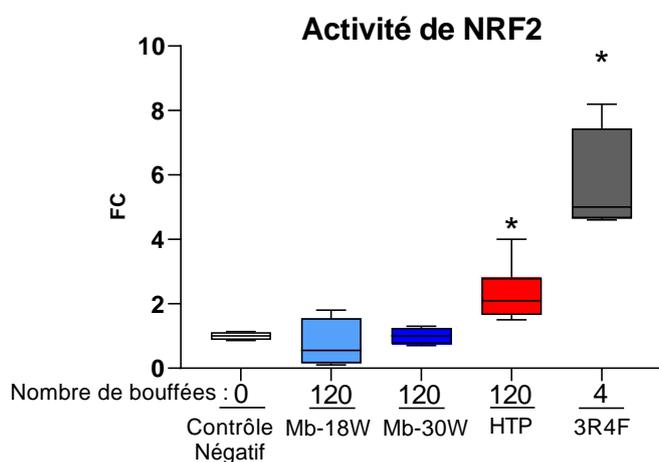


Figure 40 : Évaluation de l'activation de NRF2 dans les cellules BEAS-2B exposées aux émissions de HTP, d'e-cig et de cigarette.

Les cellules ont été exposées à 120 bouffées de HTP et e-cig (Mb-18W et Mb-30W), ou à 4 bouffées de cigarette 3R4F. L'activité nucléaire de NRF2 a été évaluée 4 heures après les expositions. Les résultats sont exprimés en fold-change (FC) par rapport à l'activité NRF2 dans les cellules non exposées (témoin négatif) fixée arbitrairement à la valeur de 1. Les données sont représentées sous forme d'un boxplot représentant la médiane et l'écart interquartile ± min et max de 4 cultures indépendantes. *($p < 0,05$, Mann Whitney)

Les émissions de HTP et de cigarette ont augmenté significativement l'activité de liaison à l'ADN de NRF2 par rapport aux cellules témoins avec des fold-changes de 2,3 et 5,7, respectivement. En revanche, les deux e-cig n'ont eu aucun effet sur l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription.

4.4.2.2. Analyse de l'expression de HMOX1 et NQO1

En présence d'un stress, le facteur de transcription NRF2 va se séparer de KEAP1, transloquer dans le noyau et se fixer à la séquence consensus (ARE) et ainsi augmenter la transcription de ses gènes cibles (*HMOX1* et *NQO1*). Nous avons bien une augmentation de l'expression transcriptomique de *HMOX1* et *NQO1* par les 2 produits du tabac (Figure 39). Nous avons ensuite étudié l'expression protéique de HMOX1 et NQO1 après l'exposition aux produits du tabac et du vapotage (Figure 41).

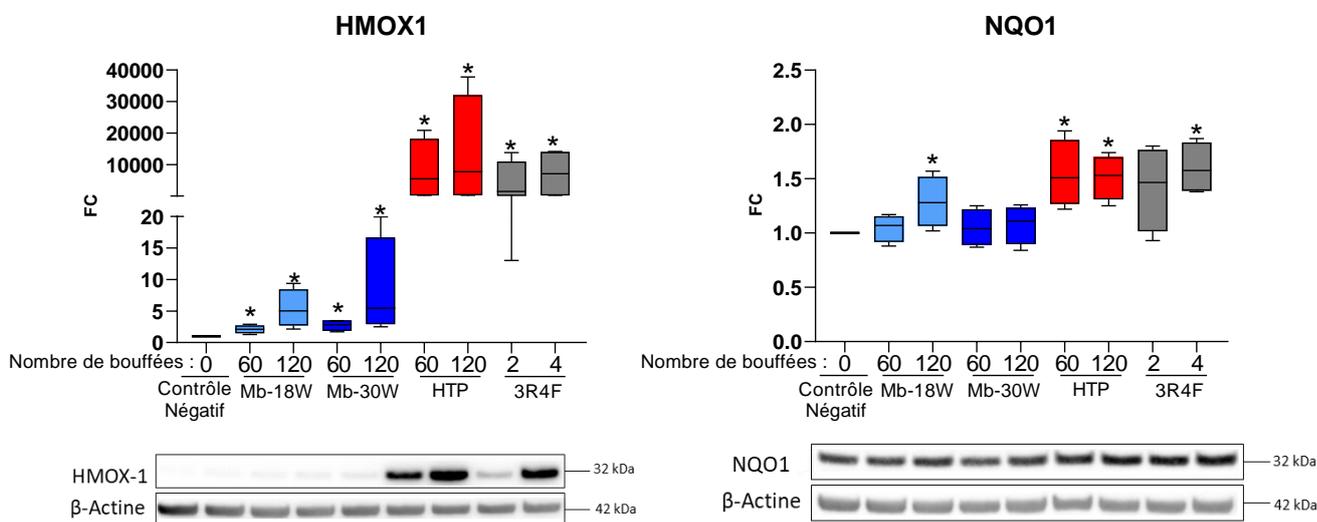


Figure 41 : Analyse de l'expression protéique des protéines HMOX1 et NQO1 par Western Blot

L'expression des protéines HMOX1 et NQO1 a été évaluée 24 heures après les expositions par Western Blot en utilisant des anticorps appropriés. Les résultats sont représentés par des images Western blot représentatives. Les histogrammes sont obtenus après normalisation avec l'expression de la β -actine. Les résultats sont exprimés en FC par rapport aux cellules témoins, arbitrairement fixé à une valeur de 1. Les données représentent la moyenne \pm écart type de quatre cultures indépendantes. * $p < 0,05$ (Mann Whitney) par rapport aux cellules témoins.

HMOX1 est augmenté pour tous les dispositifs mais à des intensités différentes. En effet, pour les e-cigs, HMOX1 est activé plus fortement avec 120 bouffées allant jusqu'à un FC de 5,0 et 5,5 pour la Mb-18W et la Mb-30W, respectivement. Pour les produits du tabac, cette augmentation est beaucoup plus importante (FC $\sim 7\ 000$). NQO1 est augmenté significativement uniquement après 120 bouffées de Mb-18W, 60 et 120 bouffées d'HTP et 4 bouffées de cigarette. Ces augmentations sont plus faibles que pour HMOX1 (FC maximum de 1,6 pour 4 bouffées de cigarette). Ainsi, ces résultats sont un argument supplémentaire pour valider l'activation de la voie NRF2.

4.4.2.3. Discussion

Une réponse antioxydante a été observée après exposition des cellules BEAS-2B au HTP ou à la cigarette conventionnelle. Avec les cigarettes électroniques, seules de légères augmentations, en comparaison aux produits du tabac, ont été observées avec la quantification de HMOX1. Les deux produits du tabac ont augmenté l'activité de liaison de NRF2 à l'élément de réponse antioxydant (ARE) et l'expression de ses cibles en aval HMOX1 et NQO1. Ces résultats sont conformes aux données de Giebe et al. qui ont montré que la stimulation des cellules endothéliales humaines primaires avec des extraits aqueux de HTP et de cigarette conduisait à l'activation du système de défense antioxydant NRF2 (Giebe et al., 2021). Dans cette dernière étude, comme dans la nôtre, les doses nécessaires pour induire un stress oxydatif étaient beaucoup plus faibles pour la cigarette que pour le HTP. De plus, de manière concordante dans les deux études, l'e-cig n'a eu aucun effet significatif sur la voie NRF2. En revanche, d'autres études ont montré que l'e-cig utilisée dans des conditions spécifiques induisait un stress oxydatif NRF2-dépendant. En effet, une augmentation de l'expression des gènes HMOX1 et NQO1 et des protéines carbonylées a été observée dans la lignée cellulaire 16HBE exposée au glycérol en aérosol lorsque le dispositif e-cig était utilisé à haute puissance (85 W) alors qu'aucun effet n'a été observé sur les gènes de réponse antioxydante après une exposition à une puissance de 40 W (Escobar et al., 2020). De plus, Canchola *et al.*, (2022) ont rapporté qu'un aérosol généré à partir d'un e-liquide contenant de l'acétate de vitamine E entraînait une augmentation de l'expression des gènes NQO1 et HMOX1 dans les cellules BEAS-2B, en raison des produits de décomposition thermique de l'acétate de vitamine E (Canchola et al., 2022). Dans notre étude, l'induction de la réponse antioxydante par les produits du tabac est également corrélée à la génération de dommages oxydatifs à l'ADN (mesurés par le test de comète modifié par hOGG1) et à des cassures de brins d'ADN dans les cellules BEAS-2B exposées au HTP et à la cigarette (Figure 24).

4.4.3. Evaluation de l'activation d'ERK1/2 et d'AKT

L'analyse transcriptomique prédisait l'activation des voies de signalisation cellulaire ERK1/2 et AKT après une exposition aux produits du tabac et à la Mb-30W. C'est pourquoi l'expression des formes phosphorylées et non-phosphorylées des 2 protéines (ERK1/2 et AKT) a été mesurée par Western blot (Figure 42) :

AKT, également connue sous le nom de protéine kinase B (PKB), est une sérine/thréonine kinase de 57 kDa, un médiateur essentiel de la survie cellulaire qui est impliqué dans la signalisation de la croissance et de la différenciation cellulaire. De plus, de nombreuses oncoprotéines et suppresseurs de tumeurs sont présents dans la voie AKT qui joue ainsi un rôle important dans la prolifération cellulaire, la différenciation, l'inhibition de l'apoptose et les réarrangements du cytosquelette. Dans le génome des mammifères, 3 gènes *AKT* ont été identifiés (*AKT1*, *AKT2* et *AKT3*) et l'isoforme principale de AKT est codée par *AKT1* qui module l'apoptose. L'activation d'*AKT1* peut se faire par phosphorylation de la Ser124, Thr308, Thr450 et Ser473. AKT est un

effecteur bien caractérisé de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dans la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et sa dérégulation joue un rôle crucial dans de nombreux cancers humains (Revathidevi and Munirajan, 2019).

La kinase ERK (Extracellular signal-regulated kinases) fait partie d'une cascade de signalisation jouant un rôle majeur dans la réponse mitogène et la survie cellulaire. Les enzymes ERK 1 et 2 sont des membres de la super famille des protéines kinases activées par les mitogènes qui peuvent médier la prolifération cellulaire et l'apoptose (Mebratu and Tesfaigzi, 2009). L'activation de ERK1/2 se produit par la phosphorylation de la Thr202 et de la Tyr204 par la protéine kinase MEK1/2 (Nadeau et al., 2012). Après activation, phospho-ERK1/2 est transloquée vers le noyau, où elle peut phosphoryler à son tour des facteurs de transcription régulateurs du cycle cellulaire (ex : FOS) (Mebratu and Tesfaigzi, 2009). La cascade RAF/MEK/ERK est activée par la protéine RAS, dont les formes oncogènes sont présentes dans 30 % des cancers humains. La perturbation de cette voie de signalisation, cruciale pour la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation ou de l'apoptose, pourrait jouer un rôle majeur dans la pathogenèse des cancers humains (Fernández-Medarde and Santos, 2011). La figure ci-dessous (Figure 42) présente l'expression de phospho-AKT (ser473) et de phospho-ERK après exposition aux différentes émissions.

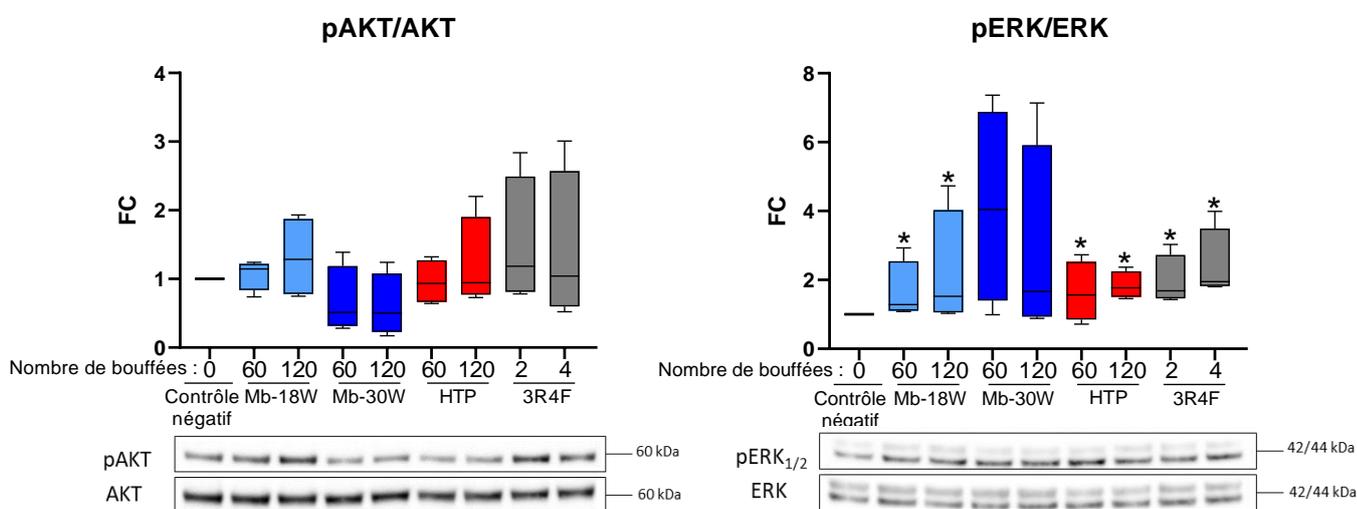


Figure 42 : Expression d'AKT et ERK évaluée par Western Blot

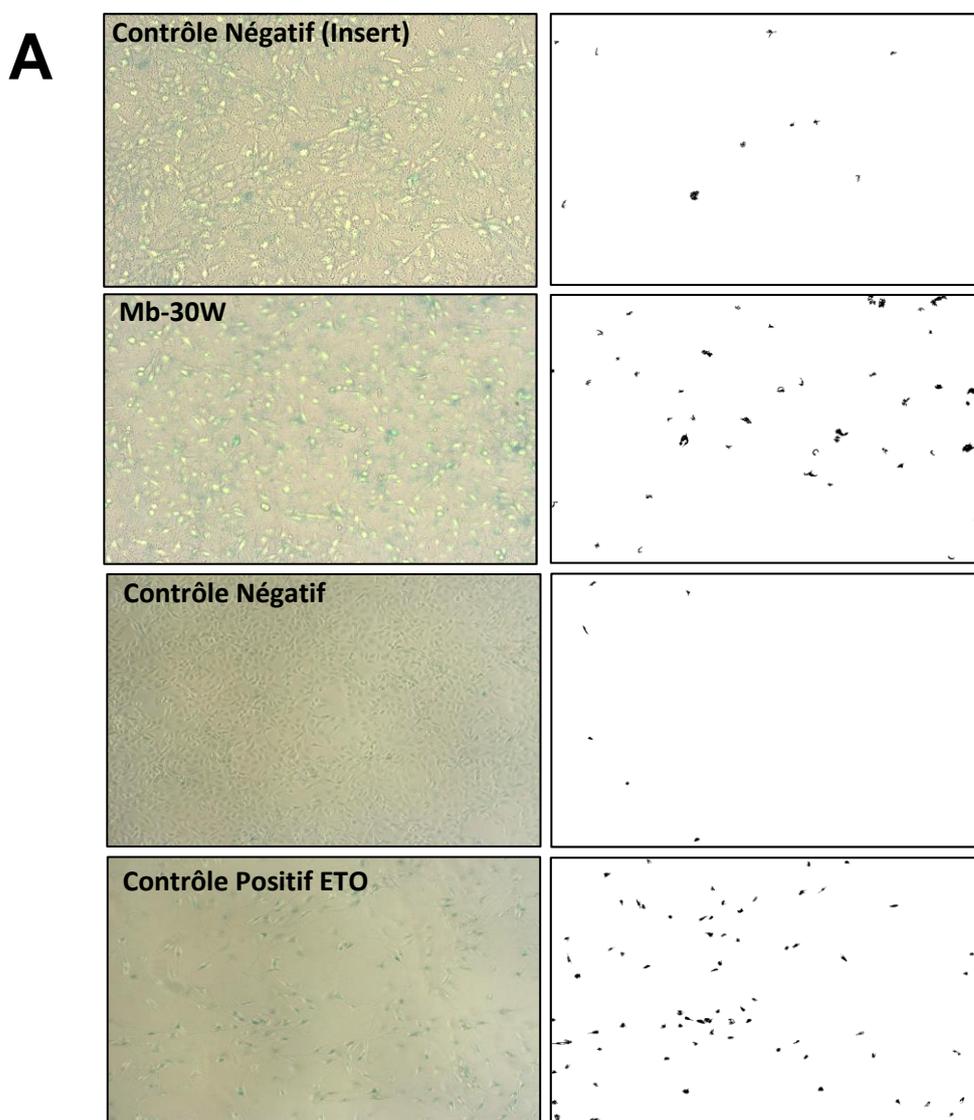
L'expression des protéines pAKT et pERK a été évaluée 24 heures après les expositions par Western Blot en utilisant des anticorps appropriés. Les résultats sont présentés par des images de Western blot représentatives. Les histogrammes sont obtenus après normalisation avec l'expression de leur forme non-phosphorylée (AKT et ERK). Les résultats sont exprimés en FC par rapport aux cellules témoins, arbitrairement fixé à une valeur de 1. Les données sont représentées sous forme d'un boxplot représentant la médiane et l'écart interquartile \pm min et max de 4 cultures indépendantes. *($p < 0,05$, Mann Whitney).

Aucune activation significative d'AKT n'est visible après exposition avec les différents dispositifs contrairement à ce qui était prédit dans nos données transcriptomiques. On peut remarquer malgré tout une légère tendance à la diminution (FC $\sim 0,5$) suite aux expositions à la Mb-30W mais cela ne s'avère pas

significatif, probablement dû à la variabilité importante des répliquâts biologiques. En revanche, on observe une augmentation significative de la phosphorylation d'ERK1/2 pour tous les dispositifs, mise à part la Mb-30W pour laquelle une augmentation est visible mais non significative due à une variabilité importante des répliquâts. Ces résultats confirment donc les prédictions des données transcriptomiques pour ERK1/2.

4.4.4. Etude de la sénescence

Pour continuer, l'activation de la voie de la sénescence, observée par l'analyse transcriptionnelle pour l'e-cig réglée à 30W, a été évaluée par la mesure de la β -galactosidase, qui est un marqueur de senescence (Cristofalo et al., 1998; Dimri et al., 1995; Linskens et al., 1995). L'étoposide (ETO), à 1,25 μ M, a été utilisé comme contrôle positif de senescence. Une photo représentative de chaque condition, ainsi que son interprétation par imageJ, sélectionné est présentée ci-dessous (Figure 43-A). Les données sont représentées en fold-change par rapport au contrôle négatif (Figure 43-B).



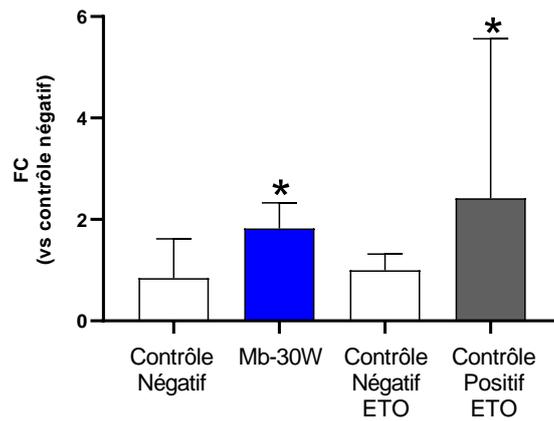
B

Figure 43 : Marquage de la β -Galactosidase dans les cellules exposées à la Mb-30W

L'activité de la β -galactosidase a été évaluée 48 heures après les expositions par marquage avec le kit Senescence β -Galactosidase Staining Kit #9860. L'intensité de bleu a été évaluée par le logiciel IMAGE J. (A) Une photo représentative de chaque condition ainsi que son interprétation par IMAGE J (sélection du marquage bleu) et (B) la quantification de la coloration sont représentées dans cette figure. Les résultats sont exprimés sous forme de fold-change (FC) par rapport aux cellules témoins, arbitrairement fixé à une valeur de 1. Les données représentent la médiane \pm l'écart interquartile de 10 photos évaluées à l'aveugle. * $p < 0,05$ (Mann Whitney) par rapport aux cellules témoins.

L'activation de la senescence par la Mb-30W prédite dans l'analyse fonctionnelle est validée. En effet, on observe une augmentation du marquage β -galactosidase d'un facteur 1,8 par rapport au contrôle. Par comparaison, le témoin positif induit une augmentation de l'activité β -Galactosidase d'un facteur 2,4. En revanche, aucune augmentation de l'activité de la β -galactosidase n'a été observée avec les produits du tabac (données non-présentées), ce qui est cohérent avec l'analyse transcriptomique puisque la voie de la senescence n'était pas activée significativement pour les 2 produits du tabac (Figure 36).

4.4.5. Évaluation de la fonction mitochondriale et de la glycolyse

Les analyses transcriptomiques montrent que la voie « Glycolyse I », est augmentée avec les produits du tabac. La glycolyse est impliquée dans le métabolisme énergétique. Cette augmentation pourrait signifier un dysfonctionnement mitochondrial. En effet, les cellules pourraient principalement utiliser la glycolyse pour générer de l'ATP, un métabolisme décrit dans les cellules cancéreuses par Otto Warburg. Les cellules cancéreuses n'utilisent pas leurs mitochondries dans la même mesure et de la même manière que les cellules non cancéreuses. La respiration mitochondriale est associée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui sont des composés très réactifs et potentiellement mortels. La capacité accrue de glycolyse, pour générer de l'ATP et la dépendance réduite au métabolisme mitochondrial (utilisant l'oxygène) protègent les cellules cancéreuses des conséquences négatives de l'augmentation des niveaux de ERO. Pour résumer, les cellules cancéreuses sont capables de diminuer la production d'ERO par leurs mitochondries en augmentant le taux de glycolyse aérobie (Harris and Johnson, 2019). Afin d'évaluer les modifications de la fonction mitochondriale et de la glycolyse, nous avons utilisé la technologie Seahorse® (Collaboration avec le Pr. Kluza

- INSERM UMR-S1172). Cette dernière nous permet de mesurer le taux de consommation d'oxygène ou « Oxygen Consumption Rate » (OCR) et le taux d'acidification extracellulaire ou « extracellular acidification rate » (ECAR).

Afin de réaliser ce test, nous avons dû adapter le protocole. Initialement les plaques Seahorse® sont directement exposées au toxique. Dans notre projet nous avons dû ajouter une étape préliminaire puisque les cellules sont exposées aux fumées/ aérosols sur des inserts 6 puits ; les plaques Seahorse ne peuvent pas être utilisées directement pour les expositions. Nous avons donc d'abord cultivé les cellules en IAL sur insert, avant de les exposer puis de les trypsiner 4h plus tard afin de les ensemercer sur une plaque 96 puits de Seahorse®. Cette plaque est ensuite lue par le Seahorse® le lendemain matin afin de mesurer la fonction mitochondriale 24h après les expositions. Dans un premier temps, nous avons dû réaliser une phase de mise au point pour choisir :

- La quantité de cellules à utiliser lors de l'ensemencement de la plaque de Seahorse® pour les mesures de l'OCR et l'ECAR
 - o 20 000 ou 40 000 cellules
- Les couples de concentrations de FCCP à utiliser pour inhiber le gradient de protons et la production d'ATP
 - o C1= 0,06/0,13 µM, C2= 0,19/0,25 µM, C3= 0,32/0,38 µM, C4= 0,53/0,79 µM, C5= 1,00/1,50 µM, C6= 2,00/2,50 µM

Le premier test consistait à mettre au point les deux éléments précédemment cités ainsi que de tester l'impact au niveau mitochondrial du passage des cellules en IAL. Pour cela nous avons comparé des cellules immergées à des cellules cultivées en IAL sur insert (Figure 44).



Figure 44 : Mise au point de la mesure de la fonction mitochondriale (OCR)

La courbe obtenue suite à ce premier test ne ressemblait pas à la courbe classiquement attendue. En effet, les premiers résultats obtenus ont démontré que le nombre de cellulesensemencées n'était pas suffisant et trop variable en fonction des puits. Nous avons donc réalisé un second test avec une quantité de cellules plus importante (40 000 ou 80 000 cellules). Certains puits étaient correctement remplis alors que d'autres étaient vides (résultats non-présentés). Nous avons émis l'hypothèse que les cellules n'adhéraient pas correctement et qu'un « coating » était nécessaire. La troisième mise au point a été réalisée avec un « coating » à la poly Lysine et 100 000 cellules par puits (Figure 45).

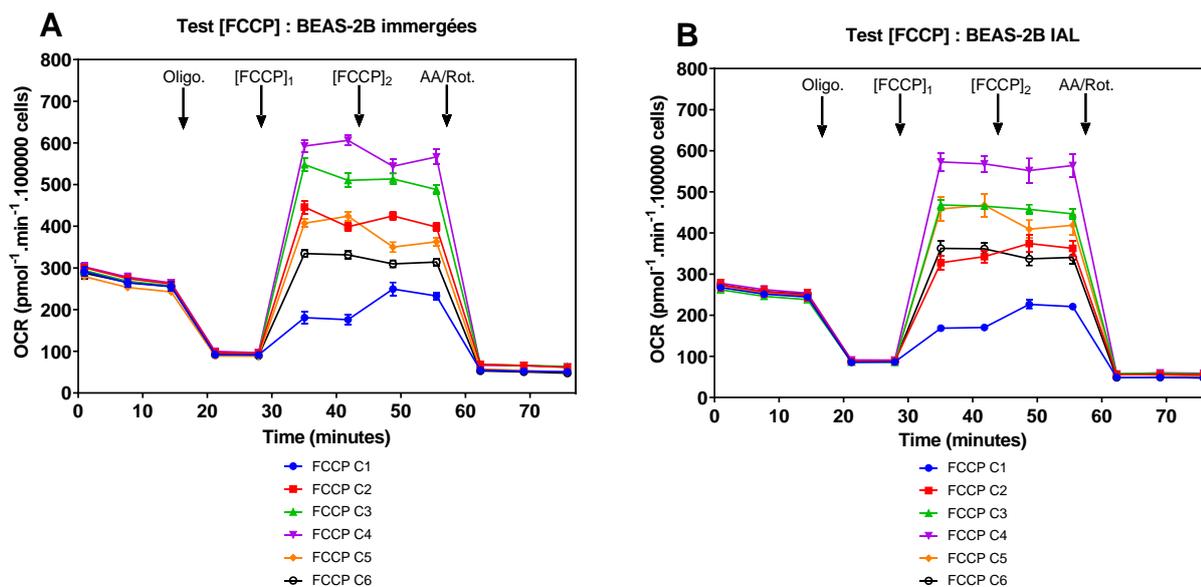


Figure 45: Mise au point de la concentration en FCCP pour la mesure de la fonction mitochondriale

(A) Cellules BEAS-2B immergées vs (B) Cellules BEAS-2B cultivées à l'interface air/liquide

Que ce soit pour les cellules cultivées en phase immergée et les cellules cultivées en IAL, on remarque que les concentrations optimales sont C3 et C4. En effet, on observe une augmentation croissante de l'OCR jusqu'à C4 puis celle-ci chute avec la 5^{ème} concentration testée. Si on s'intéresse aux différences entre les cellules immergées et les cellules cultivées en IAL, on ne remarque pas de modification de l'OCR. Ainsi, le passage en IAL n'a pas d'impact sur la fonction mitochondriale.

Pour la suite des manipulations, un ensemencement à 100 000 cellules a été sélectionné pour les mesures de l'OCR et de l'ECAR. Ces conditions pourront être utilisées afin d'étudier l'impact des émissions d'e-cig et d'HTP sur la fonction mitochondriale et la glycolyse.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

L'e-cig et le HTP offrent des alternatives aux fumeurs et sont de plus en plus utilisés comme aides au sevrage tabagique, alors que les effets de réduction des risques de ces nouveaux produits font toujours l'objet de débats controversés (Lam and West, 2015; Tattan-Birch et al., 2022). Dans ce contexte, cette thèse a eu pour but de comparer les effets toxiques des émissions d'e-cig, de HTP et de cigarettes. Dans un premier temps, le potentiel génotoxique et les effets épigénétiques de ces émissions ont été étudiés dans des cellules épithéliales bronchiques humaines cultivées à l'IAL. Puis dans un second temps, une étude transcriptomique pangénomique a été menée afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité mis en jeu et d'identifier une signature transcriptomique pour chacun de ces dispositifs.

Tout d'abord, la thèse a révélé des effets similaires entre le HTP et le tabac. Une cytotoxicité a été observée dans les cellules BEAS-2B exposées aux deux produits du tabac. Tant le tabac chauffé que la cigarette 3R4F ont provoqué des dommages primaires à l'ADN, tels que des cassures et des lésions oxydatives. L'apparition de micronoyaux, des mutations irréversibles, n'était visible qu'aux doses les plus élevées des deux produits du tabac. Toutefois, il convient de noter que ces effets similaires se sont manifestés après des expositions plus intenses avec le HTP par rapport à la cigarette. En revanche, l'e-cig, aux deux puissances testées, n'était pas cytotoxique et n'a eu aucun effet sur les paramètres de génotoxicité mesurés.

Ensuite, l'analyse transcriptomique a révélé une plus grande perturbation des transcrits après exposition au tabac chauffé par rapport aux cigarettes électroniques (les 2 dispositifs étaient exposés à la même « dose » de 120 bouffées). Alors qu'un effet dose-réponse a été observé entre les expositions 60 et 120 bouffée du HTP, ce n'était pas le cas pour les e-cigs où le nombre de dérégulations était plus important après 60 bouffées qu'à 120 bouffées. Ce résultat pourrait être expliqué par un phénomène d'adaptation des cellules au cours du temps après expositions à l'e-cig. Cette hypothèse reste cependant à vérifier par des analyses complémentaires. Par ailleurs, Il est intéressant de noter que davantage de transcrits ont été dérégulés après l'exposition à la Mb-30W par rapport à la Mb-18W, démontrant que l'augmentation de la puissance de l'e-cig affecte le transcriptome. Concernant les principales fonctions biologiques affectées par les différents dispositifs, on observe que les cellules exposées au HTP et à la cigarette affectent principalement les mêmes voies de signalisation : augmentation de la réponse au stress oxydatif médiée par NRF2, activation de la voie ERK, induction de la prolifération cellulaire, augmentation de la glycolyse et de la biosynthèse du cholestérol. La cigarette électronique, uniquement à la plus forte puissance (30W), induit plutôt une augmentation de la signalisation de l'interféron, de la biosynthèse du cholestérol et de la voie de la sénescence. Il semble donc qu'une signature transcriptomique différente se dessine pour les produits du tabac d'une part (IQOS et cigarette), et pour l'e-cig d'autre part.

L'analyse fonctionnelle nous a également fourni des indices concernant les processus de cancérogenèse. Des voies telles que la biosynthèse du cholestérol et la glycolyse, toutes deux associées au cancer, ont été identifiées. Une augmentation de la glycolyse pourrait indiquer un dysfonctionnement mitochondrial, une caractéristique couramment observée dans les cellules cancéreuses selon la théorie de Warburg. De plus, la

phosphorylation d'ERK suggère une activation de la cascade RAF/MEK/ERK, généralement régulée par la protéine RAS. La perturbation de cette voie de signalisation, cruciale pour la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose, peut jouer un rôle central dans le développement de cancers humains.

Afin de confirmer les effets transcriptomiques mis en évidence dans notre étude, des analyses complémentaires ont été réalisées. Ainsi l'activation du facteur de transcription NRF2 et l'induction de ses cibles HMOX1 et NQO1 a été mis en évidence avec les produits du tabac, confirmant la réponse antioxydante mise en place par les cellules BEAS-2B. Nous avons également démontré l'activation de la voie de signalisation ERK via la mesure de la phosphorylation d'ERK1/2 par les produits du tabac et l'e-cig. D'autre part, l'induction de sénescence avec l'e-cig réglée à 30 W a été validée par un marquage de la β -galactosidase. Ces analyses phénotypiques permettent de valider les résultats obtenus au niveau transcriptomique et mettent en avant l'activation de certaines voies de signalisation en lien avec les processus de cancérogenèse. Cependant, il est important de rappeler que le cancer est un processus multifactoriel qui se développe sur une période prolongée. Notre étude a principalement exploré les altérations cellulaires et moléculaires déclenchées par l'exposition court terme au tabac et au tabac chauffé, offrant ainsi un aperçu des premières étapes potentielles conduisant à la transformation cancéreuse. Une compréhension plus complète de ces mécanismes nécessiterait des études à long terme sur des modèles animaux ou cellulaires plus complexes pour mieux refléter la complexité de la carcinogenèse.

Les effets plus importants observés avec les produits du tabac (en termes de cytotoxicité, génotoxicité, altérations transcriptomiques...) peuvent être expliqués par la composition chimique des émissions qui varie grandement d'un dispositif à l'autre en termes de composés carbonylés, HAP, composés organiques volatils, métaux lourds... Dans une précédente étude (Dusautoir et al., 2021), nous avons comparé la composition chimique des différentes émissions utilisées dans la présente étude. Les différences de toxicité *in vitro* entre les dispositifs sont cohérentes avec les concentrations de composés chimiques mesurées précédemment. En effet, nous avons montré que le HTP émettaient environ 85% moins de composés carbonylés que la cigarette mais, d'autre part, nous avons constaté que la concentration de ces composés était encore plus faible dans les aérosols d'e-cig, avec une réduction d'au moins 98% par rapport au HTP. En particulier, la présence d'acétaldéhyde dans les émissions de cigarette et d'HTP indique une pyrolyse potentielle ou une dégradation thermique des constituants des feuilles de tabac (Auer et al. 2017). De même, les mesures de HAP ont montré que le HTP émettait 96 % moins de HAP que la cigarette de référence 3R4F et que l'e-cig émettait environ 75 % moins d'HAP que le HTP (Dusautoir et al. 2021). Les HAP sont des composés résultant de processus de combustion incomplets du tabac, ils se trouvaient donc principalement dans les émissions de cigarette (Xiangyu Li et al. 2019). Un processus de pyrolyse pourrait avoir lieu dans les feuilles de tabac et être à l'origine de la génération de HAP. La présence de concentrations plus élevées d'aldéhydes, de HAP, de quinones, de cétones et d'espèces de radicaux libres dans les émissions

de produits du tabac peut contribuer à un stress oxydatif accru dans les cellules exposées (Emma et al., 2022). Parmi ces composés, le formaldéhyde, l'acétaldéhyde et le benzo-[a]-pyrène sont des agents endommageant l'ADN bien connus et leur présence à des concentrations élevées peut expliquer la génération de lésions oxydatives de l'ADN et/ou de cassures de brins d'ADN dans les cellules BEAS-2B exposées au HTP et à la cigarette. En revanche, les concentrations de composés carbonylés et de HAP mesurées dans les émissions d'e-cig étaient suffisamment faibles, en raison de l'absence de combustion lors de l'utilisation d'e-cig, ce qui peut expliquer l'absence de cytotoxicité, de réponse antioxydante NRF2 et de génotoxicité dans les cellules BEAS-2B exposées à l'e-cig.

Dans cette étude, nous avons essayé de simuler des conditions d'utilisation réelles en utilisant une machine à fumer avec des profils d'exposition standardisés, censés représenter des conditions proches de l'utilisation réelle par les fumeurs ou vapoteurs. De plus, nous avons vérifié que nos conditions d'exposition à l'e-cig n'ont pas provoqué de surchauffe de la résistance. En effet, nous avons surveillé la température de l'aérosol généré, ce qui est un indicateur du réalisme expérimental et de la pertinence de l'étude, selon les recommandations de l'organisme national français de normalisation (AFNOR). La température des aérosols générés par chaque appareil avec le profil HCl n'a pas dépassé 60 °C pendant toutes les périodes d'exposition (Dusautoir et al., 2021), confirmant que nous n'étions pas dans des conditions de surchauffe de l'e-cig. En effet, des conditions de surchauffe ne sont pas représentatives d'une utilisation réelle de l'e-cig par le vapoteur, et une telle utilisation générerait artificiellement des quantités importantes de composés toxiques.

Nous l'avons vu dans l'état de l'art, il existe parfois des données contradictoires dans la littérature sur la toxicité de l'e-cig et du HTP. Cela peut être expliqué par plusieurs facteurs qui varient entre toutes ces études, tels que les modèles d'e-cig ou de HTP, le type de produit testé (aérosol ou fumée, condensat ou extrait de fumée, phase particulaire/gazeuse, e-liquide lui-même...), la composition du l'e-liquide, les modes d'utilisation (profils de bouffées, puissance de l'e-cig), les modèles cellulaires (cellules épithéliales pulmonaires, cellules épithéliales orales, cellules oropharyngées, origine rongeur vs humain, statut p53, capacités antioxydantes...), le mode d'exposition cellulaire (cellules immergées ou condition IAL), ou encore divers paramètres et durées d'exposition (aiguë ou répétée). Dans notre étude, nous avons évalué la toxicité des différentes émissions avec des cellules BEAS-2B (cellules bronchiques humaines immortalisées compétentes en p53) cultivées en IAL. Cependant, le poumon humain est un organe dynamique et multifonctionnel, impliquant une variété de types cellulaires distincts, tels que notamment les cellules sécrétrices de mucus, les cellules ciliées, les macrophages alvéolaires, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules immunitaires. Chacun de ces types cellulaires a des fonctions spécifiques dans le fonctionnement normal du poumon. Par exemple, les cellules épithéliales bronchiques servent de barrière protectrice contre les agents pathogènes et les irritants, tandis que les cellules sécrétrices de mucus contribuent à éliminer les particules étrangères et à maintenir la muqueuse pulmonaire hydratée. Les macrophages alvéolaires jouent un rôle clé dans la défense immunitaire et la clearance des particules

inhalées. En utilisant uniquement la lignée cellulaire BEAS-2B, nous simplifions considérablement l'exposition pulmonaire en nous concentrant sur un seul type cellulaire. Par conséquent, les résultats obtenus dans ces expériences peuvent ne refléter qu'une partie de la complexité des réponses pulmonaires aux substances testées.

De plus, les cellules BEAS-2B ont été immortalisées par l'adénovirus SV40 et sont donc des organismes génétiquement modifiés. Cela nous apporte un certain nombre d'avantages par rapport aux cellules primaires, tels que la possibilité de produire de plus grandes quantités de cellules et de les utiliser pendant des périodes plus longues, l'absence de variabilité inter-donneur lorsque l'on compare les résultats de différentes expériences, etc. En revanche, l'immortalisation présente tout de même des inconvénients : des possibilités de transformation en cellules malignes et/ou des changements phénotypiques majeurs dues à la modification génétique elle-même ou à une culture à long terme peuvent apparaître (Voloshin et al., 2023). Un autre inconvénient réside dans le fait que, une fois que les cellules BEAS-2B atteignent leur confluence, elles se différencient en cellules squameuses terminales ("BEAS-2B Cell Line human," n.d.). Des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires (y compris les cellules sécrétrices de mucus et les cellules ciliées) qui offrent une défense supplémentaire absente dans le modèle BEAS-2B. Une étude a comparé les profils d'expression de 380 gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques dans 10 lignées de cellules pulmonaires couramment utilisées (A549, H292, H358, H460, H727, Calu-1, 16HBE, 1 HAEO, BEAS-2B et L-132), quatre cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines, et des tissus pulmonaires humains non tumoraux et tumoraux. Les cultures de cellules primaires présentaient les plus grandes similitudes avec la muqueuse bronchique en termes de profil de transcription et semblent donc constituer le modèle *in vitro* le plus pertinent pour étudier le métabolisme et la bioactivation de substances toxiques dans l'épithélium bronchique. Toutefois, les auteurs ont montré que la lignée cellulaire BEAS-2B présentait la plus grande homologie avec les cellules primaires (Courcot et al., 2012).

Ainsi, malgré les limites de ce modèle cellulaire, la lignée cellulaire BEAS-2B s'avère être un choix judicieux pour notre étude visant à comprendre les effets de différentes alternatives à la cigarette sur les cellules pulmonaires. Leurs capacités à maintenir des caractéristiques cellulaires humaines pertinentes et leur « immortalité » en culture en font un modèle de choix. Elles offrent une grande reproductibilité des résultats, ce qui est essentiel pour des études de toxicologie comparative, et permettent de réaliser des expérimentations à haut débit, facilitant ainsi l'analyse d'un grand nombre d'échantillons en parallèle. De plus, l'utilisation de cellules immortalisées permet de réduire la variabilité inhérente aux cultures primaires, qui peut résulter de donneurs présentant des différences génétiques. Cette variabilité s'ajouterait aux autres facteurs de variabilité déjà présents dans nos expositions. Par exemple, l'utilisation de l'e-cig elle-même peut entraîner une variabilité notable, marquée par des consommations de e-liquide parfois significativement différentes entre les expériences. De plus, l'utilisation de la machine à fumer, un système complexe

nécessitant de nombreux réglages, peut ajouter une autre source de variabilité aux expérimentations. L'utilisation de la lignée BEAS-2B permet ainsi de ne pas ajouter une source de variabilité supplémentaire.

L'étude comparative de trois dispositifs différents (HTP, e-cig et cigarette) dans un même modèle cellulaire nous fournit d'importantes d'informations concernant leur toxicité aiguë et les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au niveau pulmonaire. Cela représente une étape essentielle dans la caractérisation des effets nocifs potentiels de ces dispositifs. Cependant, il serait désormais pertinent de valider certains des résultats obtenus dans des modèles plus complexes, tels que des cultures primaires, des co-cultures ou des études chez l'animal, afin d'obtenir une meilleure compréhension de l'impact de ces substances sur un organisme dans son ensemble. Ces approches permettraient d'obtenir des informations plus globales et plus proches de la réalité biologique, en tenant compte des interactions cellulaires et des réponses systémiques qui ne peuvent être pleinement reproduites avec la lignée BEAS-2B. En outre, elle permettrait d'évaluer les effets à long terme. C'est dans ce contexte que le laboratoire a précédemment démontré, à l'aide d'un modèle murin *in vivo*, qu'une exposition chronique (6 mois) à la cigarette 3R4F, mais aussi à l'e-cig réglée à forte puissance (30 W), induisait des dommages oxydatifs à l'ADN dans les poumons et le foie (Platel et al., 2022). En revanche, l'e-cig réglée à faible puissance (18 W) n'induisait pas de dommages à l'ADN. De plus, aucune aberration chromosomique ou mutation génique n'a été mise en évidence dans ce modèle murin quel que soit le type de produit. Il sera maintenant intéressant d'évaluer la génotoxicité et la mutagénicité du HTP chez des animaux exposés de manière chronique aux émissions, étant donné qu'il a provoqué des aberrations chromosomiques après une exposition aiguë des cellules BEAS-2B. L'induction répétée de dommages à l'ADN due à une exposition à long terme, combinée à un dysfonctionnement des voies de réparation de l'ADN, pourrait générer des mutations et favoriser la cancérogenèse. C'est pourquoi, un projet visant à réaliser une exposition long-terme au HTP est en cours au laboratoire. Son objectif est d'explorer les éventuels effets cancérogènes du HTP en utilisant un protocole d'exposition éprouvé pour la cigarette classique, avec une exposition continue de cinq mois suivie d'une période de récupération de quatre mois, afin de surveiller l'incidence de l'apparition de tumeurs chez la souris.

Pour conclure, une évaluation complète de la toxicité potentielle du tabac et des produits de vapotage implique une combinaison d'études *in vitro*, *in vivo* et épidémiologiques pour comprendre les effets cellulaires et systémiques dans des conditions de laboratoire contrôlées et des scénarios réels. Chaque type d'étude a ses forces et ses limites, et les agences réglementaires doivent intégrer les résultats de plusieurs approches afin de fournir une compréhension plus complète des risques associés à ces nouveaux produits. Ce projet de thèse a comparé la toxicité *in vitro* de l'e-cig, du HTP et de la cigarette dans les mêmes conditions expérimentales et a apporté des résultats importants et innovants pour l'évaluation du risque sanitaire. Elle a permis de classer les dispositifs selon leur toxicité aiguë. Ainsi, les résultats révèlent que le HTP, contrairement à l'e-cig, provoque une réponse biologique très similaire à celle de la cigarette, mais seulement

après une exposition plus intensive : les deux produits du tabac induisent une cytotoxicité, un stress oxydatif dépendant de NRF2, des lésions génétiques dans les cellules pulmonaires épithéliales humaines. Par ailleurs, l'e-cig et le HTP induisent des dérégulations transcriptomiques, dont certaines en lien avec la cancérogenèse, il ne faut donc pas sous-estimer le risque pour la santé de ces dispositifs. Des études animales devraient compléter ce travail afin de déterminer la toxicité à long terme et le potentiel tumorigène de ces nouveaux produits du tabac et du vapotage.

BIBLIOGRAPHIE

AFNOR, 2016. Norme XP D90-300-3 Cigarettes électroniques et e-liquides. Partie 3 : Exigences et méthodes d'essais reatives.

Alberg, A., Samet, J., 2003. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 123. https://doi.org/10.1378/chest.123.1_suppl.21s

Al-Saleh, I., Elkhatib, R., Al-Rajoudi, T., Al-Qudaihi, G., Manogarannogaran, P., Eltabache, C., Alotaibi, A., Mummer, A.B., Almugbel, S., 2020. Cytotoxic and genotoxic effects of e-liquids and their potential associations with nicotine, menthol and phthalate esters. *Chemosphere* 249, 126153. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126153>

Androutsopoulos, V.P., Tsatsakis, A.M., Spandidos, D.A., 2009. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer* 9, 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-187>

ANSES, 2022. Étude sur les pratiques de consommation des usagers de cigarettes électroniques en France : appui à la caractérisation des expositions. (No. (saisine 2020-SA-0017). Maisons-Alfort.

ANSES, 2020. Produits du tabac et du vapotage : l'Anses publie un panorama inédit des produits vendus en France [WWW Document]. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. URL <https://www.anses.fr/fr/content/produits-du-tabac-et-du-vapotage-%E2%80%99anses-publie-un-panorama-in%C3%A9dit-des-produits-vendus-en> (accessed 10.3.23).

Anthenelli, R.M., Benowitz, N.L., West, R., Aubin, L.S., McRae, T., Lawrence, D., Ascher, J., Russ, C., Krishen, A., Evins, A.E., 2016. Neuropsychiatric safety and efficacy of varenicline, bupropion, and nicotine patch in smokers with and without psychiatric disorders (EAGLES): a double-blind, randomised, placebo-controlled clinical trial. *The Lancet* 387, 2507–2520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30272-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30272-0)

Anthérieu, S., Garat, A., Beauval, N., Soyez, M., Allorge, D., Garçon, G., Lo-Guidice, J.-M., 2017. Comparison of cellular and transcriptomic effects between electronic cigarette vapor and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. *Toxicology in Vitro* 45, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.12.015>

Aokage, T., Tsukahara, K., Fukuda, Y., Tokioka, F., Taniguchi, A., Naito, H., Nakao, A., 2018. Heat-not-burn cigarettes induce fulminant acute eosinophilic pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation. *Respir Med Case Rep* 26, 87–90. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2018.12.002>

Auer, R., Concha-Lozano, N., Jacot-Sadowski, I., Cornuz, J., Berthet, A., 2017. Heat-Not-Burn Tobacco Cigarettes: Smoke by Any Other Name. *JAMA Internal Medicine* 177, 1050. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2017.1419>

Azzopardi, D., Patel, K., Jaunky, T., Santopietro, S., Camacho, O.M., McAughey, J., Gaça, M., 2016. Electronic cigarette aerosol induces significantly less cytotoxicity than tobacco smoke. *Toxicology Mechanisms and Methods* 26, 477–491. <https://doi.org/10.1080/15376516.2016.1217112>

Banerjee, A., Haswell, L.E., Baxter, A., Parmar, A., Azzopardi, D., Corke, S., Thorne, D., Adamson, J., Mushonganono, J., Gaca, M.D., Minet, E., 2017. Differential Gene Expression Using RNA Sequencing Profiling in a Reconstituted Airway Epithelium Exposed to Conventional Cigarette Smoke or Electronic Cigarette Aerosols. *Applied In Vitro Toxicology* 3, 84–98. <https://doi.org/10.1089/aivt.2016.0024>

Bankovic, J., Stojsic, J., Jovanovic, D., Andjelkovic, T., Milinkovic, V., Ruzdijic, S., Tanic, N., 2010. Identification of genes associated with non-small-cell lung cancer promotion and progression. *Lung Cancer* 67, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.04.010>

Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21, 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>

Beane, J., Vick, J., Schembri, F., Anderlind, C., Gower, A., Campbell, J., Luo, L., Zhang, X.H., Xiao, J., Alekseyev, Y.O., Wang, S., Levy, S., Massion, P.P., Lenburg, M., Spira, A., 2011. Characterizing the Impact of Smoking and Lung Cancer on the Airway Transcriptome Using RNA-Seq. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 803–817. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0212>

BEAS-2B Cell Line human [WWW Document], n.d. URL <http://www.sigmaaldrich.com/> (accessed 9.21.23).

BEAS-2B [WWW Document], n.d. URL https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-9609.aspx?geo_country=fr#characteristics

Beauval, N., Antherieu, S., Soyez, M., Gengler, N., Grova, N., Howsam, M., Hardy, E.M., Fischer, M., Appenzeller, B.M.R., Goossens, J.-F., Allorge, D., Garçon, G., Lo-Guidice, J.-M., Garat, A., 2017. Chemical Evaluation of Electronic Cigarettes: Multicomponent Analysis of Liquid Refills and their Corresponding Aerosols. *Journal of Analytical Toxicology* 41, 670–678. <https://doi.org/10.1093/jat/bkx054>

Bekki, K., Uchiyama, S., Ohta, K., Inaba, Y., Nakagome, H., Kunugita, N., 2014. Carbonyl Compounds Generated from Electronic Cigarettes. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 11192–11200. <https://doi.org/10.3390/ijerph111111192>

Berger, J., Moller, D.E., 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53, 409–435. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104018>

Bhalla, D.K., Hirata, F., Rishi, A.K., Gairola, C.G., 2009. Cigarette Smoke, Inflammation, and Lung Injury: A Mechanistic Perspective. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 12, 45–64. <https://doi.org/10.1080/10937400802545094>

Bhat, T.A., Kalathil, S.G., Leigh, N., Muthumalage, T., Rahman, I., Goniewicz, M.L., Thanavala, Y.M., 2021. Acute Effects of Heated Tobacco Product (IQOS) Aerosol Inhalation on Lung Tissue Damage and Inflammatory Changes in the Lungs. *Nicotine Tob Res* 23, 1160–1167. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntaa267>

- Bielak-Zmijewska, A., Mosieniak, G., Sikora, E., 2018. Is DNA damage indispensable for stress-induced senescence? *Mechanisms of Ageing and Development, Stress and Senescence: A Special Issue dedicated to Dr. Olivier Toussaint* 170, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.004>
- Bishop, E., Haswell, L., Adamson, J., Costigan, S., Thorne, D., Gaca, M., 2018. An approach to testing undiluted e-cigarette aerosol in vitro using 3D reconstituted human airway epithelium. *Toxicology in Vitro*. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.010>
- Borrelli, B., O'Connor, G.T., 2019. E-Cigarettes to Assist with Smoking Cessation. *New England Journal of Medicine* 380, 678–679. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1816406>
- Brady, B.R., De La Rosa, J.S., Nair, U.S., Leischow, S.J., 2019. Electronic Cigarette Policy Recommendations: A Scoping Review. *Am J Health Behav* 43, 88–104. <https://doi.org/10.5993/AJHB.43.1.8>
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M., 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3, e85. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030085>
- Brossard, P., Weitkunat, R., Poux, V., Lama, N., Haziza, C., Picavet, P., Baker, G., Lüdicke, F., 2017. Nicotine pharmacokinetic profiles of the Tobacco Heating System 2.2, cigarettes and nicotine gum in Japanese smokers. *Regul Toxicol Pharmacol* 89, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.032>
- Buracool, 2020. IQOS STICK HEET POUR TABAC A CHAUFFER [WWW Document]. URL <https://www.buracool.com/blog-old/vaporisateur-de-tabac-a-chauffer/iqos-gamme-sticks-heets-tabac-a-chauffer/> (accessed 10.14.23).
- Caliri, A.W., Caceres, A., Tommasi, S., Besaratinia, A., 2020. Hypomethylation of LINE-1 repeat elements and global loss of DNA hydroxymethylation in vapers and smokers. *Epigenetics* 15, 816–829. <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1724401>
- Caliri, A.W., Tommasi, S., Besaratinia, A., 2021. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 787, 108365. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108365>
- Canchola, A., Ahmed, C.M.S., Chen, K., Chen, J.Y., Lin, Y.-H., 2022. Formation of Redox-Active Duroquinone from Vaping of Vitamin E Acetate Contributes to Oxidative Lung Injury. *Chem. Res. Toxicol.* 35, 254–264. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00309>
- Canistro, D., Vivarelli, F., Cirillo, S., Babot Marquillas, C., Buschini, A., Lazzaretti, M., Marchi, L., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M.T., Lodovici, M., Cipriani, C., Lorenzini, A., Croco, E., Marchionni, S., Franchi, P., Lucarini, M., Longo, V., Della Croce, C.M., Vornoli, A., Colacci, A., Vaccari, M., Sapone, A., Paolini, M., 2017. E-cigarettes induce toxicological effects that can raise the cancer risk. *Sci Rep* 7, 2028. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02317-8>

- 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. *Toxicology in Vitro* 28, 999–1005. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.04.012>
- Chapman, F., Sticken, E.T., Wieczorek, R., Pour, S.J., Dethloff, O., Budde, J., Rudd, K., Mason, E., Czekala, L., Yu, F., Simms, L., Nahde, T., O'Connell, G., Stevenson, M., 2023. Multiple endpoint in vitro toxicity assessment of a prototype heated tobacco product indicates substantially reduced effects compared to those of combustible cigarette. *Toxicology in Vitro* 86, 105510. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105510>
- Chatterjee, S., Tao, J.-Q., Johncola, A., Guo, W., Caporale, A., Langham, M.C., Wehrli, F.W., 2019. Acute exposure to e-cigarettes causes inflammation and pulmonary endothelial oxidative stress in nonsmoking, healthy young subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 317, L155–L166. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00110.2019>
- Chen, H., Li, G., Chan, Y.L., Chapman, D.G., Sukjamnong, S., Nguyen, T., Annissa, T., McGrath, K.C., Sharma, P., Oliver, B.G., 2018. Maternal E-Cigarette Exposure in Mice Alters DNA Methylation and Lung Cytokine Expression in Offspring. *Am J Respir Cell Mol Biol* 58, 366–377. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0206RC>
- Chen, X., Guan, X., Peng, X., Cui, Z., Luan, C., Guo, X., 2015. Acetylation of lysine 9 on histone H3 is associated with increased pro-inflammatory cytokine release in a cigarette smoke-induced rat model through HDAC1 depression. *Inflamm. Res.* 64, 513–526. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0832-y>
- Choukrallah, M.-A., Hoeng, J., Peitsch, M.C., Martin, F., 2020. Lung transcriptomic clock predicts premature aging in cigarette smoke-exposed mice. *BMC Genomics* 21, 291. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6712-z>
- Choukrallah, M.-A., Sierro, N., Martin, F., Baumer, K., Thomas, J., Ouadi, S., Hoeng, J., Peitsch, M.C., Ivanov, N.V., 2019. Tobacco Heating System 2.2 has a limited impact on DNA methylation of candidate enhancers in mouse lung compared with cigarette smoke. *Food Chem. Toxicol.* 123, 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.020>
- Chun, L.F., Moazed, F., Calfee, C.S., Matthay, M.A., Gotts, J.E., 2017. Pulmonary toxicity of e-cigarettes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 313, L193–L206. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00071.2017>
- Commission Européenne, 2021. Rapport de la commission au parlement européen, au conseil, au comité économique et social européen et au comité des régions sur l'application de la directive 2014/40/ue en matière de fabrication, de présentation et de vente des produits du tabac et des produits connexes. European Commission, Bruxelles.

Committee on the Review of the Health Effects of Electronic Nicotine Delivery Systems, Board on Population Health and Public Health Practice, Health and Medicine Division, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2018. Public Health Consequences of E-Cigarettes. National Academies Press, Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/24952>

Courcot, E., Leclerc, J., Lafitte, J.-J., Mensier, E., Jaillard, S., Gosset, P., Shirali, P., Pottier, N., Broly, F., Lo-Guidice, J.-M., 2012. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with in vivo expression profiles. *Drug Metab Dispos* 40, 1953–1965. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.046896>

Cristofalo, V.J., Volker, C., Francis, M.K., Tresini, M., 1998. Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8, 43–80. <https://doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v8.i1.30>

Crooks, I., Neilson, L., Scott, K., Reynolds, L., Oke, T., Forster, M., Meredith, C., McAdam, K., Proctor, C., 2018. Evaluation of flavourings potentially used in a heated tobacco product: Chemical analysis, in vitro mutagenicity, genotoxicity, cytotoxicity and in vitro tumour promoting activity. *Food and Chemical Toxicology* 118, 940–952. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.058>

Czekala, L., Chapman, F., Simms, L., Rudd, K., Trelles Sticken, E., Wieczorek, R., Bode, L.M., Pani, J., Moelijker, N., Derr, R., Brandsma, I., Hendriks, G., Stevenson, M., Walele, T., 2021. The *in vitro* ToxTracker and Aneugen Clastogen Evaluation extension assay as a tool in the assessment of relative genotoxic potential of e-liquids and their aerosols. *Mutagenesis* 36, 129–142. <https://doi.org/10.1093/mutage/geaa033>

Czoli, C.D., White, C.M., Reid, J.L., OConnor, R.J., Hammond, D., 2020. Awareness and interest in IQOS heated tobacco products among youth in Canada, England and the USA. *Tobacco Control* 29, 89–95. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2018-054654>

Dahlet, T., Argüeso Lleida, A., Al Adhami, H., Dumas, M., Bender, A., Ngondo, R.P., Tanguy, M., Vallet, J., Auclair, G., Bardet, A.F., Weber, M., 2020. Genome-wide analysis in the mouse embryo reveals the importance of DNA methylation for transcription integrity. *Nat Commun* 11, 3153. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16919-w>

Dautzenberg, B., Dautzenberg, M.-D., 2019. Le tabac chauffé : revue systématique de la littérature. *Revue des Maladies Respiratoires* 36, 82–103. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.10.010>

Davis, B., To, V., Talbot, P., 2019a. Comparison of cytotoxicity of IQOS aerosols to smoke from Marlboro Red and 3R4F reference cigarettes. *Toxicol In Vitro* 61, 104652. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104652>

Davis, B., Williams, M., Talbot, P., 2019b. iQOS: evidence of pyrolysis and release of a toxicant from plastic. *Tob Control* 28, 34–41. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2017-054104>

Delrieu, A., Osman, J., Sommero, P., Baril, S., Delrieu, A., Deutsch, A., Maître, B., Mathern, G., Schmitt, A.-A., Radu-Loghin, C., Thomas, D., Underner, M., 2013. Rapport et avis d'expert sur l'e-cigarette. Office français de prévention du tabagisme.

Denisenko, T.V., Budkevich, I.N., Zhivotovsky, B., 2018. Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma. *Cell Death Dis* 9, 117. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0063-y>

Di Cicco, M., Sepich, M., Ragazzo, V., Peroni, D., Comberiat, P., 2020. Potential effects of E-cigarettes and vaping in pediatric asthma. *Minerva pediatrica* 72. <https://doi.org/10.23736/S0026-4946.20.05973-3>

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>

Divakaruni, A.S., Rogers, G.W., Murphy, A.N., 2014. Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark-Type Oxygen Electrode. *Curr Protoc Toxicol* 60, 25.2.1–16. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2502s60>

Doll, R., Peto, R., Boreham, J., Sutherland, I., 2004. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* 328, 1519. <https://doi.org/10.1136/bmj.38142.554479.AE>

Drazen, J.M., Morrissey, S., Campion, E.W., 2019. The Dangerous Flavors of E-Cigarettes. *New England Journal of Medicine* 380, 679–680. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1900484>

Dusautoir, R., Zarcone, G., Verrielle, M., Garçon, G., Fronval, I., Beauval, N., Allorge, D., Riffault, V., Locoge, N., Lo-Guidice, J.-M., Anthérieu, S., 2021. Comparison of the chemical composition of aerosols from heated tobacco products, electronic cigarettes and tobacco cigarettes and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *J Hazard Mater* 401, 123417. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123417>

Dutra, L.M., Grana, R., Glantz, S.A., 2017. Philip Morris research on precursors to the modern e-cigarette since 1990. *Tob Control* 26, e97–e105. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2016-053406>

Eldridge, A., Betson, T.R., Gama, M.V., McAdam, K., 2015. Variation in tobacco and mainstream smoke toxicant yields from selected commercial cigarette products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71, 409–427. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.01.006>

Emma, R., Caruso, M., Campagna, D., Pulvirenti, R., Li Volti, G., 2022. The Impact of Tobacco Cigarettes, Vaping Products and Tobacco Heating Products on Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)* 11, 1829. <https://doi.org/10.3390/antiox11091829>

Engstrom, P.F., Clapper, M.L., Schnoll, R.A., 2003. Physiochemical Composition of Tobacco Smoke, in: Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. BC Decker.

Escobar, Y.-N.H., Nipp, G., Cui, T., Petters, S.S., Surratt, J.D., Jaspers, I., 2020. *In Vitro* Toxicity and Chemical Characterization of Aerosol Derived from Electronic Cigarette Humectants Using a Newly Developed Exposure System. *Chem. Res. Toxicol.* 33, 1677–1688. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00490>

European Commission. Directorate General for Health and Food Safety., Directorate-General for Communication, Directorate-General for Health and Food Safety, 2021. Attitudes of Europeans towards tobacco and electronic cigarettes: executive summary. European Commission, LU.

Farsalinos, K., 2017. Electronic cigarettes: an aid in smoking cessation, or a new health hazard? *Ther Adv Respir Dis* 12, 1753465817744960. <https://doi.org/10.1177/1753465817744960>

Farsalinos, K., Poulas, K., Voudris, V., 2018. Changes in Puffing Topography and Nicotine Consumption Depending on the Power Setting of Electronic Cigarettes. *Nicotine Tob Res* 20, 993–997. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntx219>

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

Farsalinos, K.E., Yannovits, N., Sarri, T., Voudris, V., Poulas, K., Leischow, S.J., 2018. Carbonyl emissions from a novel heated tobacco product (IQOS): comparison with an e-cigarette and a tobacco cigarette: Carbonyl emissions in heated tobacco product. *Addiction* 113, 2099–2106. <https://doi.org/10.1111/add.14365>

Fernández-Medarde, A., Santos, E., 2011. Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes Cancer* 2, 344–358. <https://doi.org/10.1177/1947601911411084>

Fontaine, A., Artigas, F., 2017. Étude qualitative auprès des utilisateurs de cigarette électronique : pratiques, usages, représentations. *Santé Publique* 29, 793–801. <https://doi.org/10.3917/spub.176.0793>

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 7.5.18).

Gabrielson, E., 2006. Worldwide trends in lung cancer pathology. *Respirology* 11, 533–538. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00909.x>

- Gallus, S., Borroni, E., Odone, A., van den Brandt, P.A., Gorini, G., Spizzichino, L., Pacifici, R., Lugo, A., 2021. The Role of Novel (Tobacco) Products on Tobacco Control in Italy. *Int J Environ Res Public Health* 18, 1895. <https://doi.org/10.3390/ijerph18041895>
- Ganapathy, V., Manyanga, J., Brame, L., McGuire, D., Sadhasivam, B., Floyd, E., Rubenstein, D.A., Ramachandran, I., Wagener, T., Queimado, L., 2017. Electronic cigarette aerosols suppress cellular antioxidant defenses and induce significant oxidative DNA damage. *PLoS ONE* 12, e0177780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177780>
- Gandini, S., Botteri, E., Iodice, S., Boniol, M., Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P., Boyle, P., 2008. Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *International Journal of Cancer* 122, 155–164. <https://doi.org/10.1002/ijc.23033>
- Garcia-Arcos, I., Geraghty, P., Baumlin, N., Campos, M., Dabo, A.J., Jundi, B., Cummins, N., Eden, E., Grosche, A., Salathe, M., Foronjy, R., 2016. Chronic electronic cigarette exposure in mice induces features of COPD in a nicotine-dependent manner. *Thorax* 71, 1119–1129. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-208039>
- Gerloff, J., Sundar, I.K., Freter, R., Sekera, E.R., Friedman, A.E., Robinson, R., Pagano, T., Rahman, I., 2017. Inflammatory Response and Barrier Dysfunction by Different e-Cigarette Flavoring Chemicals Identified by Gas Chromatography–Mass Spectrometry in e-Liquids and e-Vapors on Human Lung Epithelial Cells and Fibroblasts. *Applied In Vitro Toxicology* 3, 28–40. <https://doi.org/10.1089/aivt.2016.0030>
- Giebe, S., Hofmann, A., Brux, M., Lowe, F., Breheny, D., Morawietz, H., Brunssen, C., 2021. Comparative study of the effects of cigarette smoke versus next generation tobacco and nicotine product extracts on endothelial function. *Redox Biology* 47, 102150. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102150>
- Gilbert, H.A., 1965. Smokeless non-tobacco cigarette. US3200819A.
- 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 75, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.12.019>
- Glynos, C., Bibli, S.-I., Katsaounou, P., Pavlidou, A., Magkou, C., Karavana, V., Topouzis, S., Kalomenidis, I., Zakyntinos, S., Papapetropoulos, A., 2018. Comparison of the effects of e-cigarette vapor with cigarette smoke on lung function and inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 315, L662–L672. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00389.2017>
- 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. *Tobacco Control* 23, 133–139. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2012-050859>

Gorin, A., Gabitova, L., Astsaturov, I., 2012. Regulation of cholesterol biosynthesis and cancer signaling. *Curr Opin Pharmacol* 12, 710–716. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.06.011>

Guerrero-Preston, R., Báez, A., Blanco, A., Berdasco, M., Fraga, M., Esteller, M., 2009. Global DNA methylation: a common early event in oral cancer cases with exposure to environmental carcinogens or viral agents. *P R Health Sci J* 28, 24–29.

Hajek, P., Phillips-Waller, A., Przulj, D., Pesola, F., Myers Smith, K., Bisal, N., Li, J., Parrott, S., Sasieni, P., Dawkins, L., Ross, L., Goniewicz, M., Wu, Q., McRobbie, H.J., 2019. A Randomized Trial of E-Cigarettes versus Nicotine-Replacement Therapy. *N Engl J Med* 380, 629–637. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1808779>

Hamad, S.H., Brinkman, M.C., Tsai, Y.-H., Mellouk, N., Cross, K., Jaspers, I., Clark, P.I., Granville, C.A., 2021. Pilot Study to Detect Genes Involved in DNA Damage and Cancer in Humans: Potential Biomarkers of Exposure to E-Cigarette Aerosols. *Genes* 12, 448. <https://doi.org/10.3390/genes12030448>

Harris, R.A., Johnson, J.S., 2019. Glycolysis Overview, in: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, p. B978012801238311342X. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11342-X>

Haswell, L.E., Baxter, A., Banerjee, A., Verrastro, I., Mushonganono, J., Adamson, J., Thorne, D., Gaça, M., Minet, E., 2017. Reduced biological effect of e-cigarette aerosol compared to cigarette smoke evaluated in vitro using normalized nicotine dose and RNA-seq-based toxicogenomics. *Sci Rep* 7, 888. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00852-y>

Haswell, L.E., Corke, S., Verrastro, I., Baxter, A., Banerjee, A., Adamson, J., Jaunky, T., Proctor, C., Gaça, M., Minet, E., 2018. In vitro RNA-seq-based toxicogenomics assessment shows reduced biological effect of tobacco heating products when compared to cigarette smoke. *Sci Rep* 8, 1145. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19627-0>

Haut Conseil de la santé publique, 2021. Avis relatif aux bénéfices-risques de la cigarette électronique.

Haziza, C., de La Bourdonnaye, G., Donelli, A., Poux, V., Skiada, D., Weitkunat, R., Baker, G., Picavet, P., Lüdicke, F., 2020. Reduction in Exposure to Selected Harmful and Potentially Harmful Constituents Approaching Those Observed Upon Smoking Abstinence in Smokers Switching to the Menthol Tobacco Heating System 2.2 for 3 Months (Part 1). *Nicotine Tob Res* 22, 539–548. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntz013>

Haziza, C., de La Bourdonnaye, G., Donelli, A., Skiada, D., Poux, V., Weitkunat, R., Baker, G., Picavet, P., Lüdicke, F., 2019. Favorable Changes in Biomarkers of Potential Harm to Reduce the Adverse Health Effects of Smoking in Smokers Switching to the Menthol Tobacco Heating System 2.2 for Three Months (Part 2). *Nicotine & Tobacco Research* ntz084. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntz084>

Health Canada, 2000. Health Canada Official Method T-115. Determination of “Tar”, Nicotine and Carbon Monoxide in Mainstream Tobacco Smoke [WWW Document]. URL <https://www.canada.ca/en/health->

canada/services/health-concerns/reports-publications/tobacco/tobacco-products-information-regulations.html

Hiemstra, P.S., Bals, R., 2016. Basic science of electronic cigarettes: assessment in cell culture and in vivo models. *Respiratory Research* 17. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0447-z>

Hill, C., 2012. *Tobacco epidemiology* 62, 327–329.

Hlozková, K., Starková, J., 2018. Assessment of the Metabolic Profile of Primary Leukemia Cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e58426. <https://doi.org/10.3791/58426>

Horinouchi, T., Miwa, S., 2021. Comparison of cytotoxicity of cigarette smoke extract derived from heat-not-burn and combustion cigarettes in human vascular endothelial cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 147, 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2021.07.005>

Huang, H., Ji, Y., Zhang, J., Su, Z., Liu, M., Tong, J., Ge, C., Chen, T., Li, J., 2017. Aberrant DNA methylation in radon and/or cigarette smoke-induced malignant transformation in BEAS-2B human lung cell line. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 80, 1321–1330. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1384156>

Husari, A., Shihadeh, A., Talih, S., Hashem, Y., El Sabban, M., Zaatari, G., 2016. Acute Exposure to Electronic and Combustible Cigarette Aerosols: Effects in an Animal Model and in Human Alveolar Cells. *Nicotine & Tobacco Research* 18, 613–619. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntv169>

Hwang, J.H., Ryu, D.H., Park, S.-W., 2019. Heated tobacco products: Cigarette complements, not substitutes. *Drug and Alcohol Dependence* 204, 107576. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2019.107576>

IARC, 2018. List of classifications, Volumes 1–122 – IARC. URL <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications-volumes/> (accessed 7.9.18).

INGENUITY SYSTEMS, n.d. Ingenuity Upstream Regulator Analysis in IPA.

Institut national du cancer (INCa), 2017. Guides Patients : Les traitements des cancers du poumon. Institut national du cancer (INCa) et la Ligue contre le cancer.

Iskandar, A.R., Carole, M., Florian, M., Patrice, L., Alain, S., Shoaib, M., Diana, K., Keyur, T., Davide, G., Maciej, C., Emmanuel, G., Celine, M., Stefan, F., Nikolai V., I., Manuel C., P., Julia, H., 2016. 3-D nasal cultures: Systems toxicological assessment of a candidate modified-risk tobacco product. *ALTEX* 23–48. <https://doi.org/10.14573/altex.1605041>

Iskandar, A.R., Martinez, Y., Martin, F., Schlage, W.K., Leroy, P., Sewer, A., Torres, L.O., Majeed, S., Merg, C., Trivedi, K., Guedj, E., Frenzel, S., Mathis, C., Ivanov, N.V., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2017a. Comparative effects of a candidate modified-risk tobacco product Aerosol and cigarette smoke on human organotypic small

airway cultures: a systems toxicology approach. *Toxicol. Res.* 6, 930–946. <https://doi.org/10.1039/C7TX00152E>

Iskandar, A.R., Mathis, C., Schlage, W.K., Frentzel, S., Leroy, P., Xiang, Y., Sewer, A., Majeed, S., Ortega-Torres, L., Johne, S., Guedj, E., Trivedi, K., Kratzer, G., Merg, C., Elamin, A., Martin, F., Ivanov, N.V., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2017b. A systems toxicology approach for comparative assessment: Biological impact of an aerosol from a candidate modified-risk tobacco product and cigarette smoke on human organotypic bronchial epithelial cultures. *Toxicology in Vitro* 39, 29–51. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.11.009>

Iskandar, A.R., Zanetti, F., Marescotti, D., Titz, B., Sewer, A., Kondylis, A., Leroy, P., Belcastro, V., Torres, L.O., Acali, S., Majeed, S., Steiner, S., Trivedi, K., Guedj, E., Merg, C., Schneider, T., Frentzel, S., Martin, F., Ivanov, N.V., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2019. Application of a multi-layer systems toxicology framework for in vitro assessment of the biological effects of Classic Tobacco e-liquid and its corresponding aerosol using an e-cigarette device with MESH™ technology. *Arch Toxicol* 93, 3229–3247. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02565-9>

Ito, K., Lim, S., Caramori, G., Chung, K.F., Barnes, P.J., Adcock, I.M., 2001. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 15, 1110–1112.

Ito, Y., Oshinden, K., Kutsuzawa, N., Kohno, C., Isaki, S., Yokoyama, K., Sato, T., Tanaka, M., Asano, K., 2020. Heat-Not-Burn cigarette induces oxidative stress response in primary rat alveolar epithelial cells. *PLoS One* 15, e0242789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242789>

Johnson, M.W., Johnson, P.S., Rass, O., Pacek, L.R., 2017. Behavioral economic substitutability of e-cigarettes, tobacco cigarettes, and nicotine gum. *J Psychopharmacol* 31, 851–860. <https://doi.org/10.1177/0269881117711921>

Kamada, T., Yamashita, Y., Tomioka, H., 2016. Acute eosinophilic pneumonia following heat-not-burn cigarette smoking. *Respirol Case Rep* 4, e00190. <https://doi.org/10.1002/rcr2.190>

Kaur, G., Singh, K., Maremanda, K.P., Li, D., Chand, H.S., Rahman, I., 2020. Differential plasma exosomal long non-coding RNAs expression profiles and their emerging role in E-cigarette users, cigarette, waterpipe, and dual smokers. *PLoS One* 15, e0243065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243065>

Khalil, C., Chahine, J.B., Haykal, T., Al Hageh, C., Rizk, S., Khnayzer, R.S., 2021. E-cigarette aerosol induced cytotoxicity, DNA damages and late apoptosis in dynamically exposed A549 cells. *Chemosphere* 263, 127874. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127874>

Kim, J., Yu, H., Lee, S., Paek, Y.-J., 2018. Awareness, experience and prevalence of heated tobacco product, IQOS, among young Korean adults. *Tob Control* 27, s74–s77. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2018-054390>

Kogel, U., Schlage, W.K., Martin, F., Xiang, Y., Ansari, S., Leroy, P., Vanscheeuwijck, P., Gebel, S., Buettner, A., Wyss, C., Esposito, M., Hoeng, J., Peitsch, M.C., 2014. A 28-day rat inhalation study with an integrated molecular toxicology endpoint demonstrates reduced exposure effects for a prototypic modified risk tobacco product compared with conventional cigarettes. *Food and Chemical Toxicology* 68, 204–217. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.034>

Kogel, U., Titz, B., Schlage, W.K., Nury, C., Martin, F., Oviedo, A., Lebrun, S., Elamin, A., Guedj, E., Trivedi, K., Ivanov, N.V., Vanscheeuwijck, P., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2016. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 7: Systems toxicological assessment of a mentholated version revealed reduced cellular and molecular exposure effects compared with mentholated and non-mentholated cigarette smoke. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81, S123–S138. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.001>

Kopp, 2015. Le coût social des drogues en France OFDT.

Koppula, P., Zhang, Y., Zhuang, L., Gan, B., 2018. Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer Commun (Lond)* 38, 12. <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0288-x>

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 & Tobacco Research* 16, 1319–1326. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntu078>

Lam, C., West, A., 2015. Are electronic nicotine delivery systems an effective smoking cessation tool? *Can J Respir Ther* 51, 93–98.

Laverty, A.A., Vardavas, C.I., Filippidis, F.T., 2021. Prevalence and reasons for use of Heated Tobacco Products (HTP) in Europe: an analysis of Eurobarometer data in 28 countries. *Lancet Reg Health Eur* 8, 100159. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100159>

Leduc, C., Quoix, E., 2015. Is there a role for e-cigarettes in smoking cessation? *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 10. <https://doi.org/10.1177/1753465815621233>

Lee, B., Mazar, J., Aftab, M.N., Qi, F., Shelley, J., Li, J.-L., Govindarajan, S., Valerio, F., Rivera, I., Thurn, T., Tran, T.A., Kameh, D., Patel, V., Perera, R.J., 2014. Long Noncoding RNAs as Putative Biomarkers for Prostate Cancer Detection. *The Journal of Molecular Diagnostics* 16, 615–626. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.06.009>

Lee, H.-W., Park, S.-H., Weng, M., Wang, H.-T., Huang, W.C., Lepor, H., Wu, X.-R., Chen, L.-C., Tang, M., 2018. E-cigarette smoke damages DNA and reduces repair activity in mouse lung, heart, and bladder as well as in

human lung and bladder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, E1560–E1569. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718185115>

Lee, K.M., Hoeng, J., Harbo, S., Kogel, U., Gardner, W., Oldham, M., Benson, E., Talikka, M., Kondylis, A., Martin, F., Titz, B., Ansari, S., Trivedi, K., Guedj, E., Elamin, A., Ivanov, N.V., Vanscheeuwijck, P., Peitsch, M.C., McKinney, W.J., 2018. Biological changes in C57BL/6 mice following 3 weeks of inhalation exposure to cigarette smoke or e-vapor aerosols. *Inhalation Toxicology* 30, 553–567. <https://doi.org/10.1080/08958378.2019.1576807>

Leigh, N.J., Lawton, R.I., Hershberger, P.A., Goniewicz, M.L., 2016. Flavourings significantly affect inhalation toxicity of aerosol generated from electronic nicotine delivery systems (ENDS). *Tobacco Control* 25, ii81–ii87. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2016-053205>

Leigh, N.J., Tran, P.L., O'Connor, R.J., Goniewicz, M.L., 2018. Cytotoxic effects of heated tobacco products (HTP) on human bronchial epithelial cells. *Tobacco Control* 27, s26–s29. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2018-054317>

Li, P., Yu, J., Huang, F., Zhu, Y.-Y., Chen, D.-D., Zhang, Z.-X., Xie, Z.-C., Liu, Z.-Y., Hou, Q., Xie, N., Peng, T.-H., Chen, X., Li, L., Xie, W., 2023. SLC7A11-associated ferroptosis in acute injury diseases: mechanisms and strategies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 27, 4386–4398. https://doi.org/10.26355/eurev_202305_32444

Li, X., 2016. In vitro toxicity testing of cigarette smoke based on the air-liquid interface exposure: A review. *Toxicology in Vitro* 36, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.019>

Li, X., Luo, Y., Jiang, X., Zhang, H., Zhu, F., Hu, S., Hou, H., Hu, Q., Pang, Y., 2018. Chemical Analysis and Simulated Pyrolysis of Tobacco Heating System 2.2 Compared to Conventional Cigarettes. *Nicotine & Tobacco Research*.

Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J.P., Tamayo, P., 2015. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *cels* 1, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>

Lindson, N., Theodoulou, A., Ordóñez-Mena, J.M., Fanshawe, T.R., Sutton, A.J., Livingstone-Banks, J., Hajizadeh, A., Zhu, S., Aveyard, P., Freeman, S.C., Agrawal, S., Hartmann-Boyce, J., 2023. Pharmacological and electronic cigarette interventions for smoking cessation in adults: component network meta-analyses. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD015226.pub2>

Linskens, M.H., Feng, J., Andrews, W.H., Enlow, B.E., Saati, S.M., Tonkin, L.A., Funk, W.D., Villeponteau, B., 1995. Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res* 23, 3244–3251. <https://doi.org/10.1093/nar/23.16.3244>

- Liu, Xue-ling, Ding, J., Meng, L., 2018. Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer. *Acta Pharmacol Sin* 39, 1553–1558. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.198>
- Liu, Xiaoqiu, Lugo, A., Spizzichino, L., Tabuchi, T., Gorini, G., Gallus, S., 2018. Heat-Not-Burn Tobacco Products Are Getting Hot in Italy. *Journal of Epidemiology* 28, 274–275. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20180040>
- Liu, X., Lugo, A., Spizzichino, L., Tabuchi, T., Pacifici, R., Gallus, S., 2019. Heat-not-burn tobacco products: concerns from the Italian experience. *Tobacco Control* 28, 113–114. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2017-054054>
- Liu, Xiaowen, Qian, D., Liu, H., Abbruzzese, J.L., Luo, S., Walsh, K.M., Wei, Q., 2020. Genetic variants of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling pathway genes and risk of pancreatic cancer. *Mol Carcinog* 59, 930–939. <https://doi.org/10.1002/mc.23208>
- Liu, Xiaoli, Wang, J., Luo, H., Xu, C., Chen, X., Zhang, R., 2020. MiR-218 Inhibits CSE-Induced Apoptosis and Inflammation in BEAS-2B by Targeting BRD4. *COPD Volume* 15, 3407–3416. <https://doi.org/10.2147/COPD.S278553>
- Lo Sasso, G., Titz, B., Nury, C., Boué, S., Phillips, B., Belcastro, V., Schneider, T., Dijon, S., Baumer, K., Peric, D., Dulize, R., Elamin, A., Guedj, E., Buettner, A., Leroy, P., Kleinhans, S., Vuillaume, G., Veljkovic, E., Ivanov, N.V., Martin, F., Vanscheeuwijck, P., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2016. Effects of cigarette smoke, cessation and switching to a candidate modified risk tobacco product on the liver in Apoe -/- mice--a systems toxicology analysis. *Inhal Toxicol* 28, 226–240. <https://doi.org/10.3109/08958378.2016.1150368>
- Lu, L., Qi, H., Luo, F., Xu, H., Ling, M., Qin, Y., Yang, P., Liu, X., Yang, Q., Xue, J., Chen, C., Lu, J., Xiang, Q., Liu, Q., Bian, Q., 2017. Feedback circuitry via let-7c between lncRNA CCAT1 and c-Myc is involved in cigarette smoke extract-induced malignant transformation of HBE cells. *Oncotarget* 8, 19285–19297. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15195>
- Lüdicke, F., Ansari, S.M., Lama, N., Blanc, N., Bosilkovska, M., Donelli, A., Picavet, P., Baker, G., Haziza, C., Peitsch, M., Weitkunat, R., 2019. Effects of Switching to a Heat-Not-Burn Tobacco Product on Biologically Relevant Biomarkers to Assess a Candidate Modified Risk Tobacco Product: A Randomized Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 28, 1934–1943. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-0915>
- Lüdicke, F., Picavet, P., Baker, G., Haziza, C., Poux, V., Lama, N., Weitkunat, R., 2018a. Effects of Switching to the Menthol Tobacco Heating System 2.2, Smoking Abstinence, or Continued Cigarette Smoking on Clinically Relevant Risk Markers: A Randomized, Controlled, Open-Label, Multicenter Study in Sequential Confinement and Ambulatory Settings (Part 2). *Nicotine Tob. Res.* 20, 173–182. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntx028>
- Lüdicke, F., Picavet, P., Baker, G., Haziza, C., Poux, V., Lama, N., Weitkunat, R., 2018b. Effects of Switching to the Tobacco Heating System 2.2 Menthol, Smoking Abstinence, or Continued Cigarette Smoking on

Biomarkers of Exposure: A Randomized, Controlled, Open-Label, Multicenter Study in Sequential Confinement and Ambulatory Settings (Part 1). *Nicotine Tob Res* 20, 161–172. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntw287>

Machin, M., Amaral, A.F.S., Wielscher, M., Rezwan, F.I., Imboden, M., Jarvelin, M.-R., Adcock, I.M., Probst-Hensch, N., Holloway, J.W., Jarvis, D.L., ALEC study, 2017. Systematic review of lung function and COPD with peripheral blood DNA methylation in population based studies. *BMC Pulm Med* 17, 54. <https://doi.org/10.1186/s12890-017-0397-3>

Mallock, N., Böss, L., Burk, R., Danziger, M., Welsch, T., Hahn, H., Trieu, H.-L., Hahn, J., Pieper, E., Henkler-Stephani, F., Hutzler, C., Luch, A., 2018. Levels of selected analytes in the emissions of “heat not burn” tobacco products that are relevant to assess human health risks. *Arch Toxicol* 92, 2145–2149. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2215-y>

Martin, E.M., Clapp, P.W., Rebuli, M.E., Pawlak, E.A., Glista-Baker, E., Benowitz, N.L., Fry, R.C., Jaspers, I., 2016. E-cigarette use results in suppression of immune and inflammatory-response genes in nasal epithelial cells similar to cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 311, L135-144. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00170.2016>

Martinet, Y., Béguinot, E., Diethelm, P., 2021. Industrie de la nicotine : réduction des risques, un objectif exclusivement financier. *La Revue du praticien* 27–32.

Marwick, J.A., Kirkham, P.A., Stevenson, C.S., Danahay, H., Giddings, J., Butler, K., Donaldson, K., Macnee, W., Rahman, I., 2004. Cigarette smoke alters chromatin remodeling and induces proinflammatory genes in rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 633–642. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2004-0006OC>

McAdam, K., Davis, P., Ashmore, L., Eaton, D., Jakaj, B., Eldridge, A., Liu, C., 2019. Influence of machine-based puffing parameters on aerosol and smoke emissions from next generation nicotine inhalation products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 101, 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.11.006>

McAlinden, K.D., Sohal, S.S., Sharma, P., 2019. There can be smoke without fire: warranted caution in promoting electronic cigarettes and heat not burn devices as a safer alternative to cigarette smoking. *ERJ Open Research* 5. <https://doi.org/10.1183/23120541.00114-2019>

Mebratu, Y., Tesfaigzi, Y., 2009. How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer? *Cell Cycle* 8, 1168–1175.

Misra, M., Leverette, R., Cooper, B., Bennett, M., Brown, S., 2014. Comparative In Vitro Toxicity Profile of Electronic and Tobacco Cigarettes, Smokeless Tobacco and Nicotine Replacement Therapy Products: E-Liquids, Extracts and Collected Aerosols. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 11325–11347. <https://doi.org/10.3390/ijerph111111325>

- Moses, E., Wang, T., Corbett, S., Jackson, G.R., Drizik, E., Perdomo, Catalina, Perdomo, Claudia, Kleerup, E., Brooks, D., O'Connor, G., Dubinett, S., Hayden, P., Lenburg, M.E., Spira, A., 2017. Molecular Impact of Electronic Cigarette Aerosol Exposure in Human Bronchial Epithelium. *Toxicol. Sci.* 155, 248–257. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw198>
- Murin, S., Hilbert, J., Reilly, S.J., 1997. Cigaret smoking and the lung. *Clinic Rev Allerg Immunol* 15, 307–361. <https://doi.org/10.1007/BF02737703>
- Myers Smith, K., Phillips-Waller, A., Pesola, F., McRobbie, H., Przulj, D., Orzol, M., Hajek, P., 2022. E-cigarettes versus nicotine replacement treatment as harm reduction interventions for smokers who find quitting difficult: randomized controlled trial. *Addiction* 117, 224–233. <https://doi.org/10.1111/add.15628>
- Nadeau, V., Bissonauth, V., Charron, J., 2012. Le rôle des kinases Mek1 et Mek2 dans la formation de la barrière hématoplacentaire chez la souris. *Med Sci (Paris)* 28, 409–415. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012284019>
- Ngoubo Ngangué-Courcot, E., 2012. Implication des microARN dans le développement des maladies pulmonaires à composante environnementale : exemple de la fibrose pulmonaire idiopathique (These de doctorat). Lille 2.
- Nguyen, T., Li, G.E., Chen, H., Cranfield, C.G., McGrath, K.C., Gorrie, C.A., 2018. Maternal E-Cigarette Exposure Results in Cognitive and Epigenetic Alterations in Offspring in a Mouse Model. *Chem Res Toxicol* 31, 601–611. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00084>
- Nitta, N.A., Sato, T., Komura, M., Yoshikawa, H., Suzuki, Y., Mitsui, A., Kuwasaki, E., Takahashi, F., Kodama, Y., Seyama, K., Takahashi, K., 2022. Exposure to the heated tobacco product IQOS generates apoptosis-mediated pulmonary emphysema in murine lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 322, L699–L711. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00215.2021>
- OCDE, 2016. Essai n° 487 : Essai in vitro de micronoyaux sur cellules de mammifères | fr | OCDE [WWW Document]. URL <https://www.oecd.org/fr/securitechimique/essai-n-487-essai-in-vitro-de-micronoyaux-sur-cellules-de-mammiferes-9789264264878-fr.htm> (accessed 10.4.21).
- Odani, S., Tabuchi, T., 2022. Prevalence of heated tobacco product use in Japan: the 2020 JASTIS study. *Tobacco Control* 31, e64–e65. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2020-056257>
- OFDT, 2023. Les drogues à 17 ans - Analyse de l'enquête ESCAPAD 2022.
- OFDT, 2022. ESCAPAD, 20 ans d'observation des usages à l'adolescence. Observatoire français des drogues et des tendances addictives.

Ohmomo, H., Harada, S., Komaki, S., Ono, K., Sutoh, Y., Otomo, R., Umekage, S., Hachiya, T., Katanoda, K., Takebayashi, T., Shimizu, A., 2022. DNA Methylation Abnormalities and Altered Whole Transcriptome Profiles after Switching from Combustible Tobacco Smoking to Heated Tobacco Products. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 31, 269–279. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-0444>

Olmedo, P., Goessler, W., Tanda, S., Grau-Perez, M., Jarmul, S., Aherrera, A., Chen, R., Hilpert, M., Cohen, J.E., Navas-Acien, A., Rule, A.M., 2018. Metal Concentrations in e-Cigarette Liquid and Aerosol Samples: The Contribution of Metallic Coils. *Environmental Health Perspectives* 126. <https://doi.org/10.1289/EHP2175>

OMS, 2021. WHO REPORT ON THE GLOBAL TOBACCO EPIDEMIC, 2021 Addressing new and emerging products.

Oviedo, A., Lebrun, S., Kogel, U., Ho, J., Tan, W.T., Titz, B., Leroy, P., Vuillaume, G., Bera, M., Martin, F., Rodrigo, G., Esposito, M., Dempsey, R., Ivanov, N.V., Hoeng, J., Peitsch, M.C., Vanscheeuwijck, P., 2016. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 6: 90-day OECD 413 rat inhalation study with systems toxicology endpoints demonstrates reduced exposure effects of a mentholated version compared with mentholated and non-mentholated cigarette smoke. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81, S93–S122. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.004>

Pasquereau, A., Andler, R., Arwidson, P., Guignard, R., Nguyen-Thanh, V., 2020. CONSOMMATION DE TABAC PARMIS LES ADULTES : BILAN DE CINQ ANNÉES DE PROGRAMME NATIONAL CONTRE LE TABAGISME, 2014-2019 / TOBACCO USE AMONG ADULTS: FIVE-YEAR REVIEW OF THE NATIONAL TOBACCO CONTROL PROGRAMME, 2014-2019 8.

Pasquereau, A., Andler, R., Guignard, R., Nguyen-Thanh, V., 2022. Prevalence of vaping in France in 2021: results from the Santé publique France Health Barometer.

Pasquereau, A., Andler, R., Guignard, R., Soullier, N., Beck, F., Nguyen-Thanh, V., 2023. PRÉVALENCE DU TABAGISME ET DU VAPOTAGE EN FRANCE MÉTROPOLITAINE EN 2022 PARMIS LES 18-75 ANS / PREVALENCE OF SMOKING AND VAPING IN FRANCE IN 2022 AMONG 18-75 YEAR OLDS.

Pasquereau, A., Quatremère, G., Guignard, R., Andler, R., Verrier, F., Pourchez, J., Nguyen-Thanh, V., le groupe Baromètre de Santé publique France 2017, 2019. Usage de la cigarette électronique, tabagisme et opinions des 18-75 ans., Baromètre de Santé publique France 2017. Baromètre de Santé publique France 2017.

Pauwels, C.G.G.M., 2021. Smoking topography and the assessment of exposure to cigarette smoke compounds. *maastricht university*. <https://doi.org/10.26481/dis.20211004cp>

Pei, Z., Qin, Y., Fu, X., Yang, F., Huo, F., Liang, X., Wang, S., Cui, H., Lin, P., Zhou, G., Yan, J., Wu, J., Chen, Z.-N., Zhu, P., 2022. Inhibition of ferroptosis and iron accumulation alleviates pulmonary fibrosis in a bleomycin model. *Redox Biol* 57, 102509. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102509>

Pfeffer, S.R., Yang, C.H., Pfeffer, L.M., 2015. The Role of miR-21 in Cancer: The Role of miR-21 In Cancer. *Drug Dev. Res.* 76, 270–277. <https://doi.org/10.1002/ddr.21257>

Philip Morris International, 2021a. IQOS [WWW Document]. URL <https://www.pmi.com/smoke-free-products/iqos-our-tobacco-heating-system> (accessed 7.26.21).

Philip Morris International, 2021b. Philip Morris International Launches New IQOS ILUMA in Japan to Accelerate the Achievement of a Smoke-Free Future [WWW Document]. URL <https://www.pmi.com/media-center/press-releases/press-details> (accessed 5.15.23).

Philip Morris International, n.d. Our Smoke-Free Products [WWW Document]. URL <https://www.pmi.com/smoke-free-products> (accessed 5.10.23a).

Philip Morris International, n.d. Making Heated Tobacco Products [WWW Document]. URL <https://www.pmi.com/investor-relations/overview/making-heated-tobacco-products> (accessed 10.12.21b).

Philip Morris International INC, 2023a. Reports 2022 fourth-quarter and full-year results (No. Q4 2022). PHILIP MORRIS INTERNATIONAL INC., STAMFORD.

Philip Morris International INC, 2023b. Report 2023 First-quarter Result (No. PM-EX 99.1-Q1 2023). PHILIP MORRIS INTERNATIONAL INC., STAMFORD.

Philip Morris International INC, 2022. Reports 2021 fourth-quarter & full-year results (No. PM-EX 99.1-Q4 2021). PHILIP MORRIS INTERNATIONAL INC., New York.

Philip Morris International Science, 2022. Tobacco Heating System [WWW Document]. www.pmiscience.com. URL <https://www.pmiscience.com/content/pmiscience/language-master/en/products/tobacco-heating-system.html> (accessed 5.15.23).

Phillips, B., Szostak, J., Titz, B., Schlage, W.K., Guedj, E., Leroy, P., Vuillaume, G., Martin, F., Buettner, A., Elamin, A., Sewer, A., Sierro, N., Choukrallah, M.A., Schneider, T., Ivanov, N.V., Teng, C., Tung, C.K., Lim, W.T., Yeo, Y.S., Vanscheeuwijck, P., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2019. A six-month systems toxicology inhalation/cessation study in ApoE^{-/-} mice to investigate cardiovascular and respiratory exposure effects of modified risk tobacco products, CHTP 1.2 and THS 2.2, compared with conventional cigarettes. *Food and Chemical Toxicology* 126, 113–141. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.008>

Phillips, B., Titz, B., Kogel, U., Sharma, D., Leroy, P., Xiang, Y., Vuillaume, G., Lebrun, S., Sciuscio, D., Ho, J., Nury, C., Guedj, E., Elamin, A., Esposito, M., Krishnan, S., Schlage, W.K., Veljkovic, E., Ivanov, N.V., Martin, F.,

Peitsch, M.C., Hoeng, J., Vanscheeuwijck, P., 2017. Toxicity of the main electronic cigarette components, propylene glycol, glycerin, and nicotine, in Sprague-Dawley rats in a 90-day OECD inhalation study complemented by molecular endpoints. *Food and Chemical Toxicology* 109, 315–332. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.09.001>

Phillips, B., Veljkovic, E., Boué, S., Schlage, W.K., Vuillaume, G., Martin, F., Titz, B., Leroy, P., Buettner, A., Elamin, A., Oviedo, A., Cabanski, M., De León, H., Guedj, E., Schneider, T., Talikka, M., Ivanov, N.V., Vanscheeuwijck, P., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2016. An 8-Month Systems Toxicology Inhalation/Cessation Study in Apoe Mice to Investigate Cardiovascular and Respiratory Exposure Effects of a Candidate Modified Risk Tobacco Product, THS 2.2, Compared With Conventional Cigarettes. *Toxicol. Sci.* 149, 411–432. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv243>

Phillips, B., Veljkovic, E., Peck, M.J., Buettner, A., Elamin, A., Guedj, E., Vuillaume, G., Ivanov, N.V., Martin, F., Boué, S., Schlage, W.K., Schneider, T., Titz, B., Talikka, M., Vanscheeuwijck, P., Hoeng, J., Peitsch, M.C., 2015. A 7-month cigarette smoke inhalation study in C57BL/6 mice demonstrates reduced lung inflammation and emphysema following smoking cessation or aerosol exposure from a prototypic modified risk tobacco product. *Food Chem. Toxicol.* 80, 328–345. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.009>

Planchard, D., Silvia Novello, Solange Peters, Raffaele Califano, Jean-Yves Douillard, Francesca Longo, Claire Bramley, Svetlana Jezdic, 2019. Qu'est-ce que le Cancer Du Poumon Non À Petites Cellules? European Society for Medical Oncology.

Platel, A., Dusautoir, R., Kervoaze, G., Dourdin, G., Gateau, E., Talahari, S., Huot, L., Simar, S., Ollivier, A., Laine, W., Kluza, J., Gosset, P., Garçon, G., Anthérieu, S., Guidice, J.-M.L., Nessler, F., 2022. Comparison of the in vivo genotoxicity of electronic and conventional cigarettes aerosols after subacute, subchronic and chronic exposures. *Journal of Hazardous Materials* 423, 127246. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127246>

Polosa, R., Cibella, F., Caponnetto, P., Maglia, M., Prosperini, U., Russo, C., Tashkin, D., 2017. Health impact of E-cigarettes: a prospective 3.5-year study of regular daily users who have never smoked. *Sci Rep* 7, 13825. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14043-2>

Polosa, R., Morjaria, J.B., Prosperini, U., Busà, B., Pennisi, A., Gussoni, G., Rust, S., Maglia, M., Caponnetto, P., 2021. Health outcomes in COPD smokers using heated tobacco products: a 3-year follow-up. *Intern Emerg Med* 16, 687–696. <https://doi.org/10.1007/s11739-021-02674-3>

Poussin, C., Laurent, A., Peitsch, M.C., Hoeng, J., De Leon, H., 2016. Systems toxicology-based assessment of the candidate modified risk tobacco product THS2.2 for the adhesion of monocytic cells to human coronary arterial endothelial cells. *Toxicology* 339, 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.11.007>

Poussin, C., Van Der Toorn, M., Scheuner, S., Piault, R., Kondylis, A., Savioz, R., Dulize, R., Peric, D., Guedj, E., Maranzano, F., Merg, C., Morelli, M., Egesipe, A.-L., Johne, S., Majeed, S., Pak, C., Schneider, T., Schlage, W.K.,

Ivanov, N.V., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2021. Systems toxicology study reveals reduced impact of heated tobacco product aerosol extract relative to cigarette smoke on premature aging and exacerbation effects in aged aortic cells in vitro. *Arch Toxicol* 95, 3341–3359. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03123-y>

Promega Corporation, n.d. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Instructions for Use of Products G7570, G7571, G7572 and G7573.

PubChem, 2008. CYP1B1 - cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1 (human) [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/CYP1B1/human> (accessed 8.24.23).

Rayner, R.E., Makena, P., Liu, G., Prasad, G.L., Cormet-Boyaka, E., 2022. Differential gene expression of 3D primary human airway cultures exposed to cigarette smoke and electronic nicotine delivery system (ENDS) preparations. *BMC Med Genomics* 15, 76. <https://doi.org/10.1186/s12920-022-01215-x>

Razungles, J., Cavailles, V., Jalaguier, S., Teyssier, C., 2013. L'effet Warburg: De la théorie du cancer aux applications thérapeutiques en cancérologie. *Med Sci (Paris)* 29, 1026–1033. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132911020>

République Française, 2021. Interdiction de vapoter (cigarette électronique) [WWW Document]. URL <https://www.service-public.fr/particuliers/vosdroits/F35111> (accessed 5.3.23).

Revathidevi, S., Munirajan, A.K., 2019. Akt in cancer: Mediator and more. *Seminars in Cancer Biology* 59, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.06.002>

Rizk, S.A., Metwally, F.M., Elfiky, A.M., Mahmoud, A.A., Badawi, N.A., Sharaf, N.E., Elhefnawi, M.M., 2018. Down-regulation of circulating microRNA let-7a in Egyptian smokers. *J Genet Eng Biotechnol* 16, 53–56. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.02.003>

Roffel, M.P., Maes, T., Brandsma, C.-A., van den Berge, M., Vanaudenaerde, B.M., Joos, G.F., Brusselle, G.G., Heijink, I.H., Bracke, K.R., 2021. MiR-223 is increased in lungs of patients with COPD and modulates cigarette smoke-induced pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 321, L1091–L1104. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00252.2021>

Rosen, L.J., Galili, T., Kott, J., Goodman, M., Freedman, L.S., 2018. Diminishing benefit of smoking cessation medications during the first year: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Addiction* 113, 805–816. <https://doi.org/10.1111/add.14134>

Rudd, K., Stevenson, M., Wieczorek, R., Pani, J., Trelles-Sticken, E., Dethloff, O., Czekala, L., Simms, L., Buchanan, F., O'Connell, G., Walele, T., 2020. Chemical Composition and In Vitro Toxicity Profile of a Pod-Based E-Cigarette Aerosol Compared to Cigarette Smoke. *Applied In Vitro Toxicology* 6, 11–41. <https://doi.org/10.1089/aivt.2019.0015>

Ruprecht, A.A., De Marco, C., Saffari, A., Pozzi, P., Mazza, R., Veronese, C., Angellotti, G., Munarini, E., Ogliari, A.C., Westerdahl, D., Hasheminassab, S., Shafer, M.M., Schauer, J.J., Repace, J., Sioutas, C., Boffi, R., 2017. Environmental pollution and emission factors of electronic cigarettes, heat-not-burn tobacco products, and conventional cigarettes. *Aerosol Science and Technology* 51, 674–684. <https://doi.org/10.1080/02786826.2017.1300231>

Saada, A., Ben-Shalom, E., Zyslin, R., Miller, C., Mandel, H., Elpeleg, O., 2003. Mitochondrial deoxyribonucleoside triphosphate pools in thymidine kinase 2 deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 963–966. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.104>

Saha, P., Jain, S., Mukherjee, I., Panda, S.R., Zeki, A.A., Naidu, V.G.M., Sharma, P., 2023. The effects of dual IQOS and cigarette smoke exposure on airway epithelial cells: implications for lung health and respiratory disease pathogenesis. *ERJ Open Res* 9, 00558–02022. <https://doi.org/10.1183/23120541.00558-2022>

Santé Publique France, 2023a. En 2022, la France compte toujours près de 12 millions de fumeurs quotidiens. Santé publique France, Saint-Maurice, France.

Santé Publique France, 2023b. Sevrage tabagique, quels traitements ? [WWW Document]. URL <https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/tabac/sevrage-tabagique-quels-sont-les-traitements-efficaces> (accessed 8.21.23).

Sato, A., Ishigami, A., 2023. Effects of heated tobacco product aerosol extracts on DNA methylation and gene transcription in lung epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 475, 116637. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116637>

Sawa, M., Ushiyama, A., Inaba, Y., Hattori, K., 2022. Increased oxidative stress and effects on inflammatory cytokine secretion by heated tobacco products aerosol exposure to mice. *Biochem Biophys Res Commun* 610, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.04.042>

Schaller, J.-P., Keller, D., Poget, L., Pratte, P., Kaelin, E., McHugh, D., Cudazzo, G., Smart, D., Tricker, A.R., Gautier, L., Yerly, M., Reis Pires, R., Le Bouhellec, S., Ghosh, D., Hofer, I., Garcia, E., Vanscheeuwijck, P., Maeder, S., 2016. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 2: Chemical composition, genotoxicity, cytotoxicity, and physical properties of the aerosol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81, S27–S47. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.10.001>

Scheffler, S., Dieken, H., Krischenowski, O., Förster, C., Branscheid, D., Aufderheide, M., 2015. Evaluation of E-Cigarette Liquid Vapor and Mainstream Cigarette Smoke after Direct Exposure of Primary Human Bronchial Epithelial Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12, 3915–3925. <https://doi.org/10.3390/ijerph120403915>

- Schweitzer, K.S., Chen, S.X., Law, S., Van Demark, M., Poirier, C., Justice, M.J., Hubbard, W.C., Kim, E.S., Lai, X., Wang, M., Kranz, W.D., Carroll, C.J., Ray, B.D., Bittman, R., Goodpaster, J., Petrache, I., 2015. Endothelial disruptive proinflammatory effects of nicotine and e-cigarette vapor exposures. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 309, L175–L187. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00411.2014>
- Sewer, A., Zanetti, F., Iskandar, A.R., Guedj, E., Dulize, R., Peric, D., Bornand, D., Mathis, C., Martin, F., Ivanov, N.V., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2020. A meta-analysis of microRNAs expressed in human aerodigestive epithelial cultures and their role as potential biomarkers of exposure response to nicotine-containing products. *Toxicol Rep* 7, 1282–1295. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.09.001>
- Sharma, S., Kelly, T.K., Jones, P.A., 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27–36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>
- Shen, Y., Wolkowicz, M.J., Kotova, T., Fan, L., Timko, M.P., 2016. Transcriptome sequencing reveals e-cigarette vapor and mainstream-smoke from tobacco cigarettes activate different gene expression profiles in human bronchial epithelial cells. *Sci Rep* 6, 23984. <https://doi.org/10.1038/srep23984>
- Sher, T., Dy, G.K., Adjei, A.A., 2008. Small Cell Lung Cancer. *Mayo Clinic Proceedings* 83, 355–367. <https://doi.org/10.4065/83.3.355>
- Sherwood, C.L., Boitano, S., 2016. Airway epithelial cell exposure to distinct e-cigarette liquid flavorings reveals toxicity thresholds and activation of CFTR by the chocolate flavoring 2,5-dimethylpyrazine. *Respiratory Research* 17. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0369-9>
- Shukla, S., Khan, S., Tollefsbol, T.O., Meeran, S.M., 2013. Genetics and Epigenetics of Lung Cancer: Mechanisms and Future Perspectives. *Current Cancer Therapy Reviews* 9, 97–110.
- Simonavicius, E., McNeill, A., Shahab, L., Brose, L.S., 2019. Heat-not-burn tobacco products: a systematic literature review. *Tob Control* 28, 582–594. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2018-054419>
- Singh, K.P., Lawyer, G., Muthumalage, T., Maremanda, K.P., Khan, N.A., McDonough, S.R., Ye, D., McIntosh, S., Rahman, I., 2019. Systemic biomarkers in electronic cigarette users: implications for noninvasive assessment of vaping-associated pulmonary injuries. *ERJ Open Res* 5, 00182–02019. <https://doi.org/10.1183/23120541.00182-2019>
- Singh, K.P., Maremanda, K.P., Li, D., Rahman, I., 2020. Exosomal microRNAs are novel circulating biomarkers in cigarette, waterpipe smokers, E-cigarette users and dual smokers. *BMC Med Genomics* 13, 128. <https://doi.org/10.1186/s12920-020-00748-3>

Smith, M.R., Clark, B., Lüdicke, F., Schaller, J.-P., Vanscheeuwijck, P., Hoeng, J., Peitsch, M.C., 2016. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 1: Description of the system and the scientific assessment program. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81, S17–S26. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.07.006>

Sohal, S.S., Eapen, M.S., Naidu, V.G.M., Sharma, P., 2019. IQOS exposure impairs human airway cell homeostasis: direct comparison with traditional cigarette and e-cigarette. *ERJ Open Research* 5, 00159–02018. <https://doi.org/10.1183/23120541.00159-2018>

Solleti, S.K., Bhattacharya, S., Ahmad, A., Wang, Q., Mereness, J., Rangasamy, T., Mariani, T.J., 2017. MicroRNA expression profiling defines the impact of electronic cigarettes on human airway epithelial cells. *Sci Rep* 7, 1081. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01167-8>

Song, M.-A., Reisinger, S.A., Freudenheim, J.L., Brasky, T.M., Mathé, E.A., McElroy, J.P., Nickerson, Q.A., Weng, D.Y., Wewers, M.D., Shields, P.G., 2020. Effects of Electronic Cigarette Constituents on the Human Lung: A Pilot Clinical Trial. *Cancer Prevention Research* 13, 145–152. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0400>

Sotty, J., 2019. Toxicité in vitro des particules atmosphériques fines et ultrafines : focus sur les bronchopneumopathies chroniques et la fonction mitochondriale (These de doctorat). Université de Lille (2018-2021).

Spilka, S., Godeau, E., Nézet, O.L., Janssen, É., Philippon, A., Roversi, A., Ehlinger, V., 2020. LES CONSOMMATIONS D’ALCOOL, TABAC ET CANNABIS CHEZ LES ÉLÈVES DE 11, 13 ET 15 ANS.

Stapleton, J.A., Russell, M.A., Sutherland, G., Feyerabend, C., 1998. Nicotine availability from Eclipse tobacco-heating cigarette. *Psychopharmacology* 139, 288–290.

St.Helen, G., Jacob III, P., Nardone, N., Benowitz, N.L., 2018. IQOS: examination of Philip Morris International’s claim of reduced exposure. *Tobacco Control* 27, s30–s36. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2018-054321>

Stone, M.D., DeAtley, T., Pianin, S., Strasser, A.A., Audrain-McGovern, J., 2022. Switching from cigarettes to IQOS: A pilot examination of IQOS-associated reward, reinforcement, and abstinence relief. *Drug Alcohol Depend* 238, 109569. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2022.109569>

Sun, B., Cong, D., Chen, K., Bai, Y., Li, J., 2021. Prognostic value of microRNA-4521 in non-small cell lung cancer and its regulatory effect on tumor progression. *Open Medicine* 16, 1150–1159. <https://doi.org/10.1515/med-2021-0312>

Sundar, I.K., Javed, F., Romanos, G.E., Rahman, I., 2016. E-cigarettes and flavorings induce inflammatory and pro-senescence responses in oral epithelial cells and periodontal fibroblasts. *Oncotarget* 7, 77196–77204. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12857>

- Sundar, I.K., Yao, H., Rahman, I., 2013. Oxidative Stress and Chromatin Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Smoking-Related Diseases. *Antioxid Redox Signal* 18, 1956–1971. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4863>
- Sutherland, G., Russell, M.A., Stapleton, J.A., Feyerabend, C., 1993. Glycerol particle cigarettes: a less harmful option for chronic smokers. *Thorax* 48, 385–387.
- Szostak, J., Titz, B., Schlage, W.K., Guedj, E., Sewer, A., Phillips, B., Leroy, P., Buettner, A., Neau, L., Trivedi, K., Martin, F., Ivanov, N.V., Vanscheeuwijck, P., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2020a. Structural, functional, and molecular impact on the cardiovascular system in ApoE^{-/-} mice exposed to aerosol from candidate modified risk tobacco products, Carbon Heated Tobacco Product 1.2 and Tobacco Heating System 2.2, compared with cigarette smoke. *Chemico-Biological Interactions* 315, 108887. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108887>
- Szostak, J., Wong, E.T., Titz, B., Lee, T., Wong, S.K., Low, T., Lee, K.M., Zhang, J., Kumar, A., Schlage, W.K., Guedj, E., Phillips, B., Leroy, P., Buettner, A., Xiang, Y., Martin, F., Sewer, A., Kuczaj, A., Ivanov, N.V., Luettich, K., Vanscheeuwijck, P., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2020b. A 6-month systems toxicology inhalation study in ApoE^{-/-} mice demonstrates reduced cardiovascular effects of E-vapor aerosols compared with cigarette smoke. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 318, H604–H631. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00613.2019>
- Szulakowski, P., Crowther, A.J.L., Jiménez, L.A., Donaldson, K., Mayer, R., Leonard, T.B., MacNee, W., Drost, E.M., 2006. The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 41–50. <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-725OC>
- Tabuchi, T., Gallus, S., Shinozaki, T., Nakaya, T., Kunugita, N., Colwell, B., 2018. Heat-not-burn tobacco product use in Japan: its prevalence, predictors and perceived symptoms from exposure to secondhand heat-not-burn tobacco aerosol. *Tob Control* 27, e25–e33. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2017-053947>
- Tabuchi, T., Kiyohara, K., Hoshino, T., Bekki, K., Inaba, Y., Kunugita, N., 2016. Awareness and use of electronic cigarettes and heat-not-burn tobacco products in Japan: Awareness and use of e-cigarettes in Japan. *Addiction* 111, 706–713. <https://doi.org/10.1111/add.13231>
- Tang, M., Lee, H.-W., Weng, M., Wang, H.-T., Hu, Y., Chen, L.-C., Park, S.-H., Chan, H., Xu, J., Wu, X.-R., Wang, H., Yang, R., Galdane, K., Jackson, K., Chu, A., Halzack, E., 2022. DNA damage, DNA repair and carcinogenicity: Tobacco smoke versus electronic cigarette aerosol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 789, 108409. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108409>
- Tattan-Birch, H., Hartmann-Boyce, J., Kock, L., Simonavicius, E., Brose, L., Jackson, S., Shahab, L., Brown, J., 2022. Heated tobacco products for smoking cessation and reducing smoking prevalence. *Cochrane Database Syst Rev* 1, CD013790. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013790.pub2>

Taylor, M., Carr, T., Oke, O., Jaunky, T., Breheny, D., Lowe, F., Gaça, M., 2016. E-cigarette aerosols induce lower oxidative stress in vitro when compared to tobacco smoke. *Toxicology Mechanisms and Methods* 26, 465–476. <https://doi.org/10.1080/15376516.2016.1222473>

Tellez, C.S., Juri, D.E., Phillips, L.M., Do, K., Yingling, C.M., Thomas, C.L., Dye, W.W., Wu, G., Kishida, S., Kiyono, T., Belinsky, S.A., 2021. Cytotoxicity and Genotoxicity of E-Cigarette Generated Aerosols Containing Diverse Flavoring Products and Nicotine in Oral Epithelial Cell Lines. *Toxicological Sciences* 179, 220–228. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa174>

Thorne, D., Leverette, R., Breheny, D., Lloyd, M., McEnaney, S., Whitwell, J., Clements, J., Bombick, B., Gaça, M., 2019a. Genotoxicity evaluation of tobacco and nicotine delivery products: Part Two. In vitro micronucleus assay. *Food Chem Toxicol* 132, 110546. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.054>

Thorne, D., Leverette, R., Breheny, D., Lloyd, M., McEnaney, S., Whitwell, J., Clements, J., Bombick, B., Gaca, M., 2019b. Genotoxicity evaluation of tobacco and nicotine delivery products: Part One. Mouse lymphoma assay. *Food and Chemical Toxicology* 132, 110584. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110584>

Thorne, D., Whitwell, J., Clements, J., Walker, P., Breheny, D., Gaca, M., 2020. The genotoxicological assessment of a tobacco heating product relative to cigarette smoke using the in vitro micronucleus assay. *Toxicology Reports* 7, 1010–1019. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.013>

Titz, B., Kogel, U., Martin, F., Schlage, W.K., Xiang, Y., Nury, C., Dijon, S., Baumer, K., Peric, D., Bornand, D., Dulize, R., Phillips, B., Leroy, P., Vuillaume, G., Lebrun, S., Elamin, A., Guedj, E., Trivedi, K., Ivanov, N.V., Vanscheeuwijck, P., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2018. A 90-day OECD TG 413 rat inhalation study with systems toxicology endpoints demonstrates reduced exposure effects of the aerosol from the carbon heated tobacco product version 1.2 (CHTP1.2) compared with cigarette smoke. II. Systems toxicology assessment. *Food and Chemical Toxicology* 115, 284–301. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.058>

Titz, B., Szostak, J., Sewer, A., Phillips, B., Nury, C., Schneider, T., Dijon, S., Lavrynenko, O., Elamin, A., Guedj, E., Tsin Wong, E., Lebrun, S., Vuillaume, G., Kondylis, A., Gubian, S., Cano, S., Leroy, P., Keppler, B., Ivanov, N.V., Vanscheeuwijck, P., Martin, F., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2020. Multi-omics systems toxicology study of mouse lung assessing the effects of aerosols from two heat-not-burn tobacco products and cigarette smoke. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18, 1056–1073. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.04.011>

Tommasi, S., Caliri, A., Caceres, A., Moreno, D., Li, M., Chen, Y., Siegmund, K., Besaratinia, A., 2019. Deregulation of Biologically Significant Genes and Associated Molecular Pathways in the Oral Epithelium of Electronic Cigarette Users. *IJMS* 20, 738. <https://doi.org/10.3390/ijms20030738>

Underwood, E., Redell, J.B., Zhao, J., Moore, A.N., Dash, P.K., 2020. A method for assessing tissue respiration in anatomically defined brain regions. *Sci Rep* 10, 13179. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69867-2>

Urvalek, A.M., Osei-Sarfo, K., Tang, X.-H., Zhang, T., Scognamiglio, T., Gudas, L.J., 2015. Identification of Ethanol and 4-Nitroquinoline-1-Oxide Induced Epigenetic and Oxidative Stress Markers During Oral Cavity Carcinogenesis. *Alcohol Clin Exp Res* 39, 1360–1372. <https://doi.org/10.1111/acer.12772>

U.S. Department of Health, Education, and Welfare, 1964. *Smoking and Health: Report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Service*. Washington: U.S. Department of Health, Education, and Welfare, (No. PHS Publication No. 1103). Public Health Service, Center for Disease Control.

van der Toorn, M., Frentzel, S., De Leon, H., Goedertier, D., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2015. Aerosol from a candidate modified risk tobacco product has reduced effects on chemotaxis and transendothelial migration compared to combustion of conventional cigarettes. *Food and Chemical Toxicology* 86, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.09.016>

Vitrocell systems, n.d. Smoking machine VC 1 [WWW Document]. URL <https://www.vitrocell.com/inhalation-toxicology/smoking-machines/vc-1> (accessed 5.28.18).

Vivarelli, F., Canistro, D., Cirillo, S., Elias, R.J., Granata, S., Mussoni, M., Burattini, S., Falcieri, E., Turrini, E., Fimognari, C., Buschini, A., Lazzaretti, M., Beghi, S., Girotti, S., Sangiorgi, S., Bolelli, L., Ghini, S., Ferri, E.N., Fagiolino, I., Franchi, P., Lucarini, M., Mercatante, D., Rodriguez-Estrada, M.T., Lorenzini, A., Marchionni, S., Gabriele, M., Longo, V., Paolini, M., 2021. Unburned tobacco cigarette smoke alters rat ultrastructural lung airways and DNA. *Nicotine Tob Res* ntab108. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntab108>

Voloshin, N., Tyurin-Kuzmin, P., Karagyaur, M., Akopyan, Z., Kulebyakin, K., 2023. Practical Use of Immortalized Cells in Medicine: Current Advances and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 24, 12716. <https://doi.org/10.3390/ijms241612716>

Wagner, N., Wagner, K.-D., 2020. PPAR Beta/Delta and the Hallmarks of Cancer. *Cells* 9, E1133. <https://doi.org/10.3390/cells9051133>

Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., Kim, Y.Y., 2010. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta* 1803, 1231–1243. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.013>

Walczak, J., Malińska, D., Drabik, K., Michalska, B., Prill, M., John, S., Luettich, K., Szymański, J., Peitsch, M.C., Hoeng, J., Duszyński, J., Więckowski, M.R., van der Toorn, M., Szczepanowska, J., 2020. Mitochondrial Network and Biogenesis in Response to Short and Long-Term Exposure of Human BEAS-2B Cells to Aerosol Extracts from the Tobacco Heating System 2.2. *Cell Physiol Biochem* 54, 230–251. <https://doi.org/10.33594/000000216>

Wang, B., Liu, Y., Luo, F., Xu, Y., Qin, Y., Lu, X., Xu, W., Shi, L., Liu, Q., Xiang, Q., 2016. Epigenetic silencing of microRNA-218 via EZH2-mediated H3K27 trimethylation is involved in malignant transformation of HBE cells induced by cigarette smoke extract. *Arch Toxicol* 90, 449–461. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1435-z>

Wang, J., Hou, F., Tang, L., Xiao, K., Yang, T., Wang, Z., Liu, G., 2022. The interaction between long non-coding RNA LINC01564 and POU2F1 promotes the proliferation and metastasis of gastric cancer. *Journal of Translational Medicine* 20, 220. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03391-x>

Wang, J., Yao, R., Luo, Q., Tan, L., Jia, B., Ouyang, N., Li, Y., Tong, J., Li, J., 2021. miR-200b upregulation promotes migration of BEAS-2B cells following long-term exposure to cigarette smoke by targeting ETS1. *Mol Med Rep* 24, 562. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12201>

Wang, L., Wang, Y., Chen, J., Yang, X.-M., Jiang, X.-T., Liu, P., Li, M., 2021. Comparison of biological and transcriptomic effects of conventional cigarette and electronic cigarette smoke exposure at toxicological dose in BEAS-2B cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 222, 112472. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112472>

Wei, M.-C., Wang, Y.-M., Wang, D.-W., 2021. miR-130a-Mediated KLF3 Can Inhibit the Growth of Lung Cancer Cells. *CMAR* 13, 2995–3004. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S281203>

Wen, J., Fu, J., Zhang, W., Guo, M., 2011. Genetic and epigenetic changes in lung carcinoma and their clinical implications. *Modern Pathology* 24, 932–943. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.46>

WHO, 2020. Report on the global tobacco epidemic.

Wieczorek, R., Phillips, G., Czekala, L., Trelles Sticken, E., O’Connell, G., Simms, L., Rudd, K., Stevenson, M., Walele, T., 2020. A comparative in vitro toxicity assessment of electronic vaping product e-liquids and aerosols with tobacco cigarette smoke. *Toxicology in Vitro* 66, 104866. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104866>

Wiley, C.D., Velarde, M.C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E.A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H.W., Davis, S.S., Ramanathan, A., Gerencser, A.A., Verdin, E., Campisi, J., 2016. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism* 23, 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>

Williams, M., Talbot, P., 2019. Design Features in Multiple Generations of Electronic Cigarette Atomizers. *Int J Environ Res Public Health* 16, 2904. <https://doi.org/10.3390/ijerph16162904>

Winickoff, J.P., Friebely, J., Tanski, S.E., Sherrod, C., Matt, G.E., Hovell, M.F., McMillen, R.C., 2009. Beliefs about the health effects of “thirdhand” smoke and home smoking bans. *Pediatrics* 123, e74-79. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-2184>

Wong, E.T., Kogel, U., Veljkovic, E., Martin, F., Xiang, Y., Boue, S., Vuillaume, G., Leroy, P., Guedj, E., Rodrigo, G., Ivanov, N.V., Hoeng, J., Peitsch, M.C., Vanscheeuwijck, P., 2016. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 4: 90-day OECD 413 rat inhalation study with systems toxicology endpoints demonstrates reduced

exposure effects compared with cigarette smoke. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81, S59–S81. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.10.015>

World Health Organization, 2014. Conference of the Parties to the WHO Framework Convention on Tobacco Control, sixth session (No. FCTC/COP/6/10 Rev.1). WHO Framework Convention on Tobacco Control, Moscow, Russian Federation.

Wu, J., Minikes, A.M., Gao, M., Bian, H., Li, Y., Stockwell, B.R., Chen, Z.-N., Jiang, X., 2019. Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via Merlin-YAP signalling. *Nature* 572, 402–406. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1426-6>

Wu, Q., Jiang, D., Minor, M., Chu, H.W., 2014. Electronic Cigarette Liquid Increases Inflammation and Virus Infection in Primary Human Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE* 9, e108342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108342>

Wu, Y., Guan, S., Ge, Y., Yang, Y., Cao, Y., Zhou, J., 2020. Cigarette smoke promotes chronic obstructive pulmonary disease (COPD) through the miR-130a/Wnt1 axis. *Toxicology in Vitro* 65, 104770. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104770>

Xie, Z., Rahman, I., Goniewicz, M.L., Li, D., 2021. Perspectives on Epigenetics Alterations Associated with Smoking and Vaping. *Function* 2, zqab022. <https://doi.org/10.1093/function/zqab022>

Xue, H., Li, M., 2018. MicroRNA-150 protects against cigarette smoke-induced lung inflammation and airway epithelial cell apoptosis through repressing p53: MicroRNA-150 in CS-induced lung inflammation. *Hum Exp Toxicol* 37, 920–928. <https://doi.org/10.1177/0960327117741749>

Yan, R., 2021. Epimutational effects of electronic cigarettes. *Environ Sci Pollut Res* 24.

Yu, V., Rahimy, M., Korrapati, A., Xuan, Y., Zou, A.E., Krishnan, A.R., Tsui, T., Aguilera, J.A., Advani, S., Crotty Alexander, L.E., Brumund, K.T., Wang-Rodriguez, J., Ongkeko, W.M., 2016. Electronic cigarettes induce DNA strand breaks and cell death independently of nicotine in cell lines. *Oral Oncology* 52, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.10.018>

Yu, X.-F., Wang, J., OUYang, N., Guo, S., Sun, H., Tong, J., Chen, T., Li, J., 2019. The role of miR-130a-3p and SPOCK1 in tobacco exposed bronchial epithelial BEAS-2B transformed cells: Comparison to A549 and H1299 lung cancer cell lines. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 82, 862–869. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1664479>

Zanetti, F., Titz, B., Sewer, A., Lo Sasso, G., Scotti, E., Schlage, W.K., Mathis, C., Leroy, P., Majeed, S., Torres, L.O., Keppler, B.R., Elamin, A., Trivedi, K., Guedj, E., Martin, F., Frentzel, S., Ivanov, N.V., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2017. Comparative systems toxicology analysis of cigarette smoke and aerosol from a candidate modified

risk tobacco product in organotypic human gingival epithelial cultures: A 3-day repeated exposure study. *Food and Chemical Toxicology* 101, 15–35. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.027>

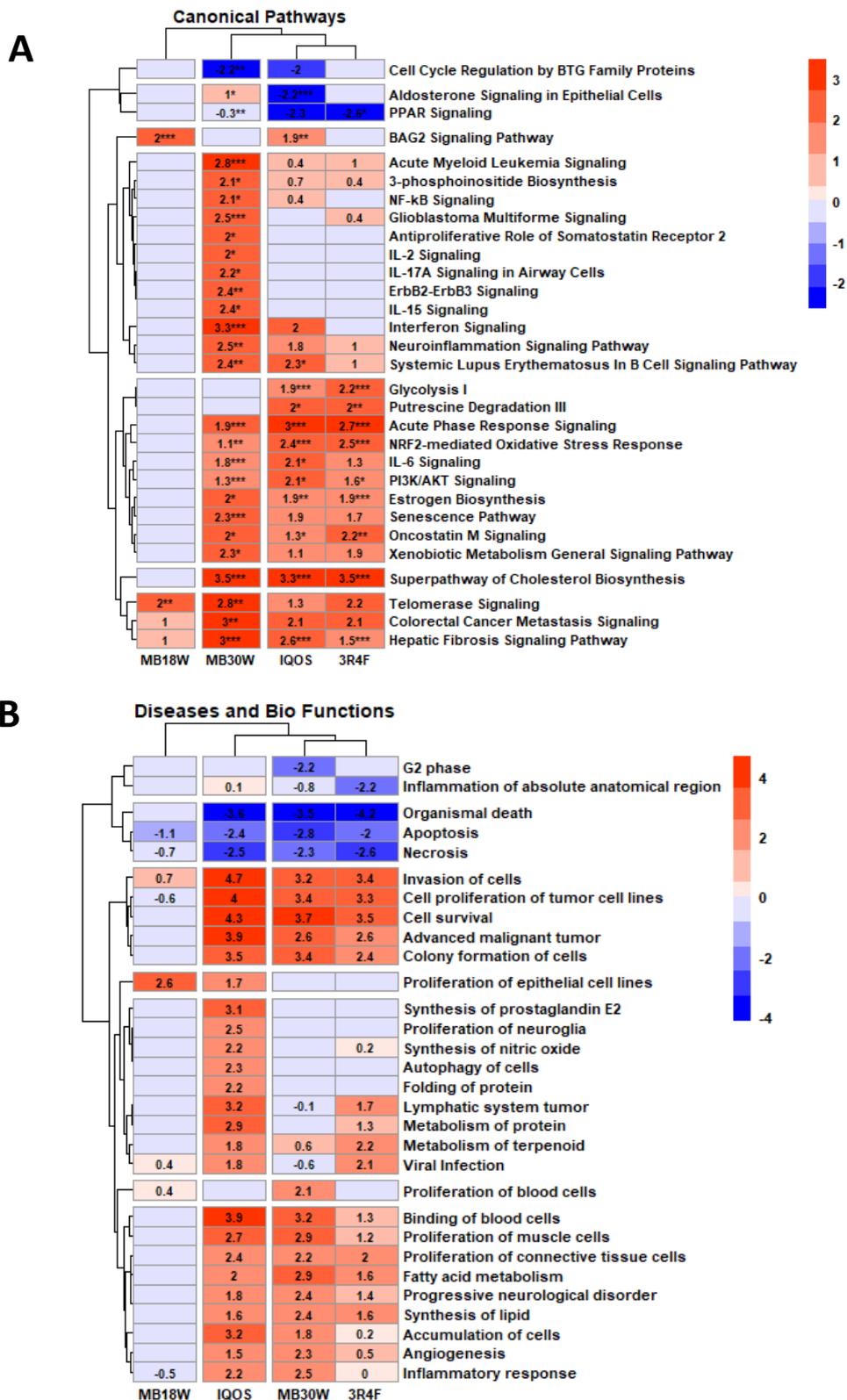
Zhang, N., Zhou, X.-M., Yang, F.-F., Zhang, Q., Miao, Y., Hou, G., 2019. FAM129A promotes invasion and proliferation by activating FAK signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 12, 893–900.

Znyk, M., Jurewicz, J., Kaleta, D., 2021. Exposure to Heated Tobacco Products and Adverse Health Effects, a Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, 6651. <https://doi.org/10.3390/ijerph18126651>

ANNEXES

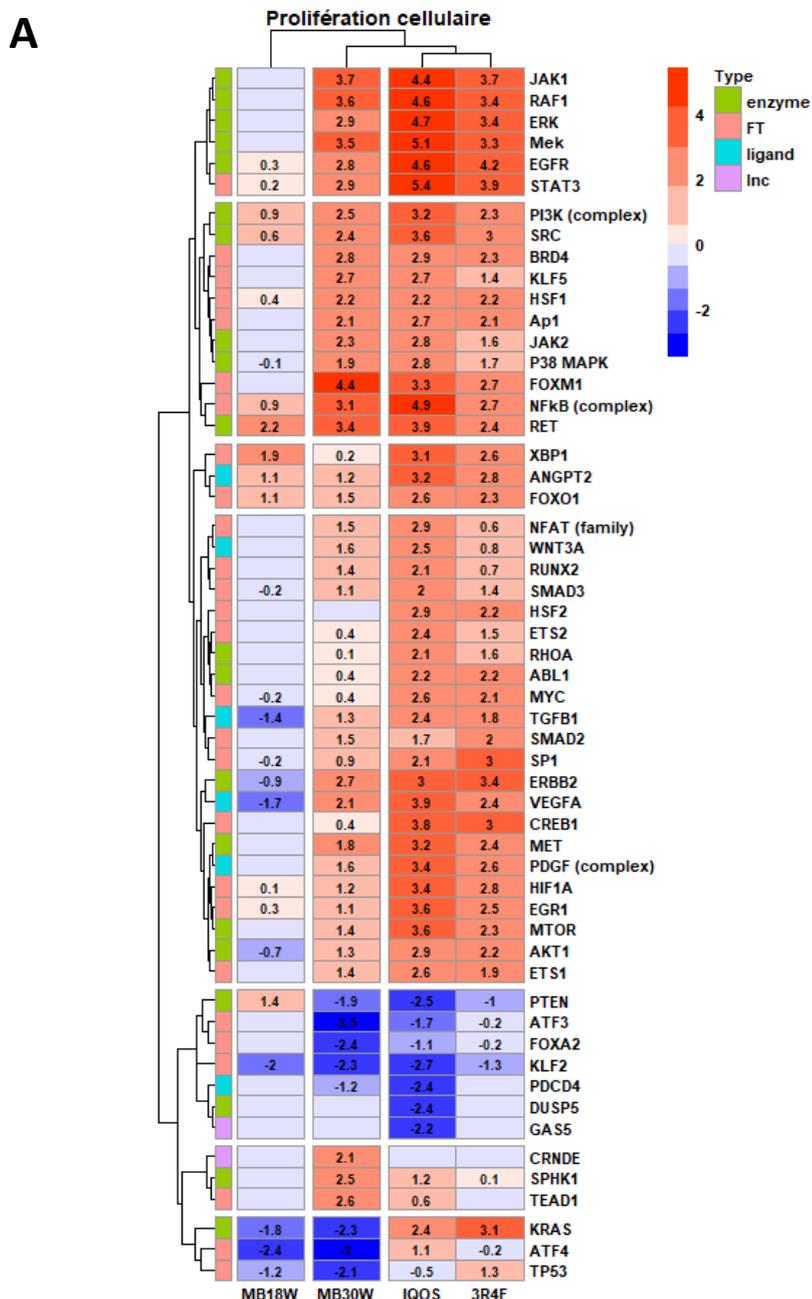
1. Heatmaps des voies canoniques (A) et des fonctions biologiques (B)

Heatmaps obtenus avec les expositions à 60 bouffées de Mb-18W, Mb-30W, HTP et 4 bouffées de cigarette. Analyses issues du logiciel « Ingenuity Pathway Analysis » (IPA®) avec le gradient de couleur suivant : la couleur « rouge » indique une activation prédite (z-score > 0), la couleur « bleue » indique une inhibition prédite (z-score < 0), la couleur « grise » indique une absence d'activation ou d'inhibition prédite (z-score ≈ 0). La significativité donne la p-value du test statistique réalisé : * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001. Résultats obtenus à partir de n=4 cultures différentes pour chaque condition. (A) La voie canonique présentée a été filtrée sur 2 conditions : |Z-score| > 2 dans au moins une condition et p-value d'association < 0,05. B) La fonction biologique a été filtrée sur 2 conditions : |Z-score| > 2 dans au moins une condition et p-value d'association < 0,05. Pour l'ensemble des fonctions biologiques, toutes les valeurs sont très largement significatives mais les étoiles n'ont pas été indiquées ici.

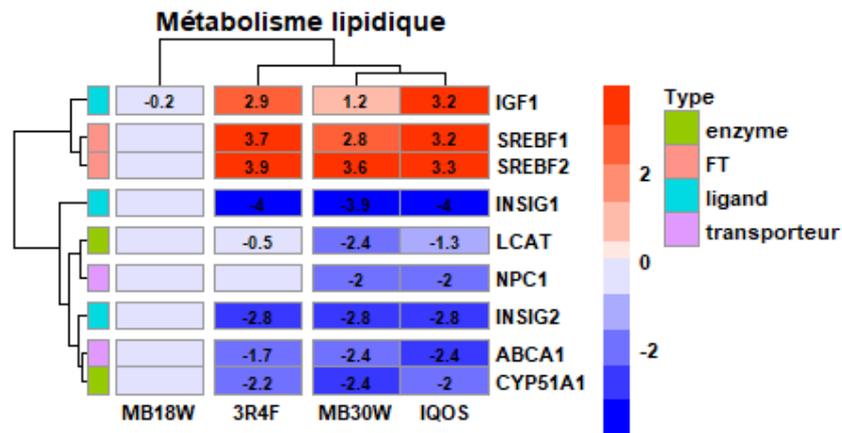


2. Heatmaps des régulateurs en amont : Prolifération cellulaire (A), Métabolisme lipidique (B) et inflammation (C)

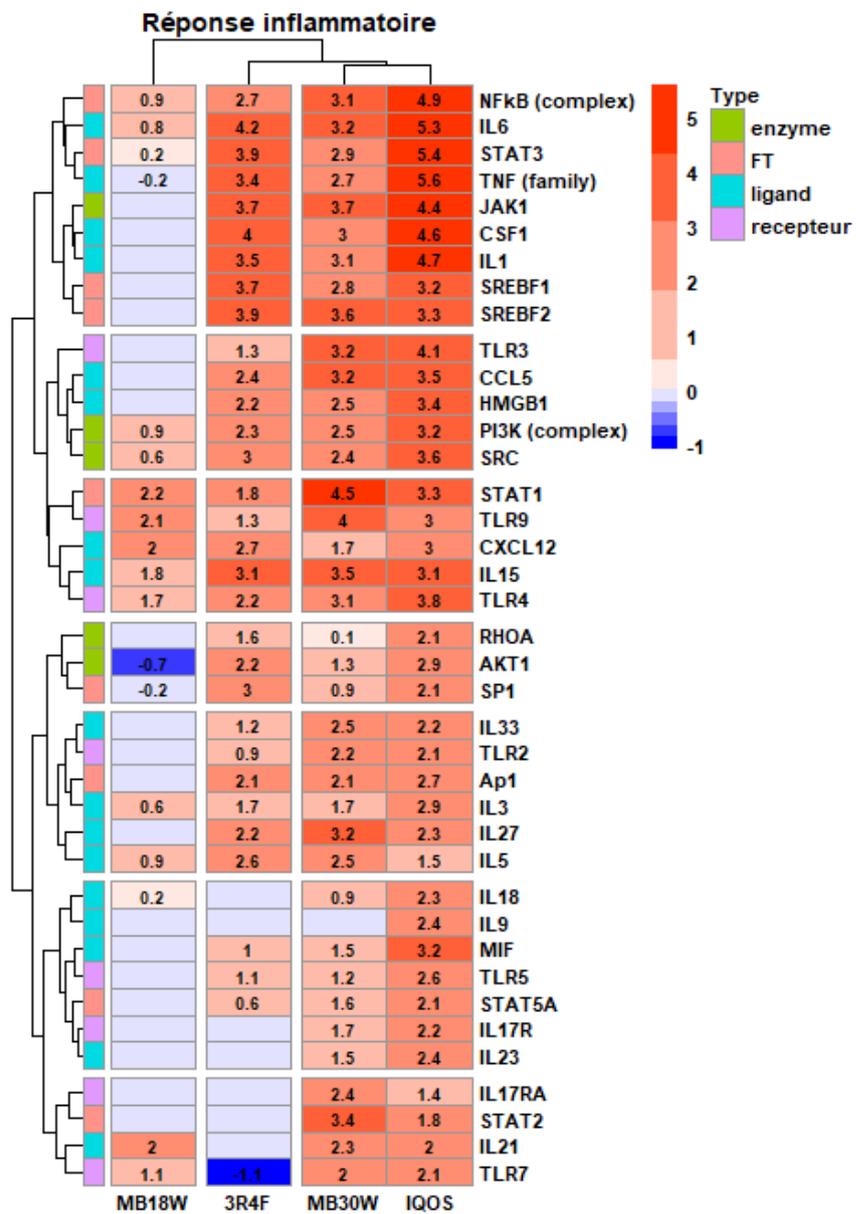
Prédits à partir du logiciel « Ingenuity Pathway Analysis » (IPA®) et impliqués dans la prolifération tumorale (A), la réponse inflammatoire (B) et le métabolisme lipidique (C). Gradient de couleur : la couleur « rouge » indique une activation prédite (z-score > 0), la couleur « bleue » indique une inhibition prédite (z-score < 0), la couleur « grise » indique une absence d'activation ou d'inhibition prédite (z-score ≈ 0). Résultats obtenus à partir d'un n=4 pour chaque condition. Les régulateurs en amont présentés ont été filtrés sur 3 conditions : 1) |Z-score| > 2 dans au moins une condition 2) p-value d'association < 0,05 3) Abondance dans la littérature. Toutes les valeurs sont significatives.



B



C



ARTICLE

Article

Impact of Electronic Cigarettes, Heated Tobacco Products and Conventional Cigarettes on the Generation of Oxidative Stress and Genetic and Epigenetic Lesions in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells

Gianni Zarcone , Marie Lenski , Thomas Martinez, Smaïl Talahari, Ophélie Simonin, Guillaume Garçon ,
Delphine Allorge, Fabrice Nesslany, Jean-Marc Lo-Guidice, Anne Platel [†] and Sébastien Antherieu ^{*,†}

Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, ULR 4483, IMPECS-IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé, F-59000 Lille, France; gianni.zarcone@univ-lille.fr (G.Z.); marie.lenski@chu-lille.fr (M.L.); smail.talahari@pasteur-lille.fr (S.T.); ophelie.simonin@univ-lille.fr (O.S.); guillaume.garcon@univ-lille.fr (G.G.); delphine.allorge@univ-lille.fr (D.A.); fnesslany@erbc-group.com (F.N.); jean-marc.lo-guidice@univ-lille.fr (J.-M.L.-G.); anne.platel@pasteur-lille.fr (A.P.)

* Correspondence: sebastien.antherieu@univ-lille.fr; Tel.: +33-3-20-62-68-18

[†] These authors contributed equally to this work.

Abstract: Electronic cigarettes (e-cig) and heated tobacco products (HTP) are often used as smoking cessation aids, while the harm reduction effects of these alternatives to cigarettes are still the subject of controversial debate, in particular regarding their carcinogenic potential. The objective of this study is to compare the effects of e-cig, HTP and conventional cigarette emissions on the generation of oxidative stress and genetic and epigenetic lesions in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. Our results show that HTP were less cytotoxic than conventional cigarettes while e-cig were not substantially cytotoxic in BEAS-2B cells. E-cig had no significant effect on the Nrf2 pathway, whereas HTP and cigarettes increased the binding activity of Nrf2 to antioxidant response elements and the expression of its downstream targets HMOX1 and NQO1. Concordantly, only HTP and cigarettes induced oxidative DNA damage and significantly increased DNA strand breaks and chromosomal aberrations. Neither histone modulations nor global DNA methylation changes were found after acute exposure, regardless of the type of emissions. In conclusion, this study reveals that HTP, unlike e-cig, elicit a biological response very similar to that of cigarettes, but only after a more intensive exposure: both tobacco products induce cytotoxicity, Nrf2-dependent oxidative stress and genetic lesions in human epithelial pulmonary cells. Therefore, the health risk of HTP should not be underestimated and animal studies are required in order to determine the tumorigenic potential of these emerging products.

Keywords: heat-not-burn tobacco; e-cigarette; lung; cytotoxicity; genotoxicity; Nrf2

1. Introduction

Smoking is an established risk factor for a variety of diseases, including lung cancer. About 80% of lung cancer deaths are attributable to cigarette smoking and the mix of carcinogens to which bronchial airways are exposed [1]. During cigarette smoking, both the chemicals naturally present in the tobacco and the secondary chemicals generated by pyrolysis are inhaled by the smoker. To date, over 7000 chemicals have been identified in tobacco smoke, including hundreds of chemicals that are toxic and more than 70 that can cause, initiate or promote cancer (formaldehyde, acetaldehyde, benzene, nitrosamines, arsenic, cadmium, etc.) [2]. Smoking cessation is now the only way to eliminate this risk factor. In recent years, new electronic nicotine delivery products (i.e., e-cigarettes (e-cig)) and new tobacco products (i.e., heated tobacco products (HTP)) have emerged, and many smokers use them as an alternative to conventional tobacco cigarettes in order to stop or



Citation: Zarcone, G.; Lenski, M.; Martinez, T.; Talahari, S.; Simonin, O.; Garçon, G.; Allorge, D.; Nesslany, F.; Lo-Guidice, J.-M.; Platel, A.; et al. Impact of Electronic Cigarettes, Heated Tobacco Products and Conventional Cigarettes on the Generation of Oxidative Stress and Genetic and Epigenetic Lesions in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells. *Toxics* **2023**, *11*, 847. <https://doi.org/10.3390/toxics11100847>

Academic Editors: Rosalia Emma and Massimo Caruso

Received: 6 September 2023

Revised: 5 October 2023

Accepted: 5 October 2023

Published: 10 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

reduce their cigarette consumption. These devices are generally perceived as less harmful than cigarettes and have rapidly gained popularity in the absence of any real evidence of their safety.

E-cig are battery-powered devices with prefilled cartridges/pods or refillable tanks containing a liquid mixture (called e-liquid) composed of propylene glycol and/or glycerol, nicotine and flavors. The user activates the atomizer's heating coil by depressing the device's power button during inhalation [3–6]. More recently, the tobacco industry launched HTP, devices that heat tobacco and glycerin sticks (called "heets") at temperatures less than 350 °C [7]. The tobacco industry claims that these products present fewer health risks than smoking tobacco products [8–10]. Tobacco companies, such as Philips Morris International, state that HTP emit, on average, 90% lower levels of harmful chemicals than cigarette smoke (CS) due to the lack of combustion of tobacco [11]. In a previous study, we compared the chemical composition of HTP, e-cig and cigarette emissions and confirmed that HTP emitted lower amounts of carbonyl compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) than tobacco cigarettes, but we showed that HTP produced higher amounts than e-cig [12]. Despite the reduction in emissions of harmful compounds compared to cigarettes, a proportional reduction in risk to users of HTP or e-cig cannot be guaranteed. The levels of harmful constituents produced may still be significant and pose a risk to health, in particular the presence of genotoxic carcinogenic chemicals, such as formaldehyde, acetaldehyde and benzo[a]pyrene [12,13]. Due to their DNA interaction properties, these chemicals are considered to have no safe threshold or dose [14]. Therefore, they are expected to cause genotoxic and carcinogenic risks in humans, even at very low concentrations.

E-cig and especially HTP have not yet been used long enough for epidemiological studies to conclude whether or not they are carcinogenic in humans. Indeed, it is known that it usually takes between one and two decades for tobacco smokers to develop lung cancer [15]. Therefore, animal models and in vitro mechanistic studies are necessary as surrogates to study the carcinogenic effects of HTP and e-cig and to better understand the molecular and cellular changes induced by these new products. The development of lung cancer is a complex process, involving a series of genetic and epigenetic alterations such as DNA methylation, histone post-translational modifications and abnormal expression of non-coding RNAs including microRNAs (miRNAs) [16,17]. Smoking directly induces oxidative stress and may activate normally inactive proto-oncogenes, inactivate otherwise active tumor suppressor genes and may induce mutations in DNA repair genes [18]. In addition, exposure to CS has been found to be associated with epigenetic changes in the respiratory tract [19]. Indeed, CS caused global DNA hypomethylation and post-translational modifications of histone residues in human smokers [20–22], in the lungs of exposed mice [23,24] and in human bronchial epithelial cells treated with CS extract [25–27]. These genetic and epigenetic alterations interact at all stages of cancer development, working together to promote cancer progression [28].

While the genotoxic potential and epigenetic alterations of cigarettes are well known, studies on the genotoxicity of e-cig [3,29–33] and HTP [11,34–39] give contradictory conclusions and the epigenetic impacts of these new products are still poorly described in the literature [19,24]. More importantly, there are currently few studies that compare the potential genetic and epigenetic effects of HTP and e-cig emissions, although such a comparison, by independent works, seems essential since they are both alternatives to cigarettes and are increasingly recommended as smoking cessation aids. Therefore, the objectives of this study are to evaluate and compare the impact of e-cig (low- or high-power setting), HTP (IQOS system) and conventional cigarette emissions on the induction of oxidative stress, primary DNA damage, chromosomal aberrations and epigenetic lesions in a human bronchial epithelial cell model (BEAS-2B cell line).

2. Materials and Methods

2.1. E-Cig and Tobacco Products

The e-cig used in this study was the model “ModBox TC” (third-generation model) manufactured by NHOSS[®] (Bondues, France). It was used with an “Air Tank” clearomizer equipped with a 0.5 Ω Kanthal coil and a partially closed air flow. Heating was activated one second before releasing the puff. The ModBox e-cig was tested at two power settings, 18 W (Mb-18W) and 30 W (Mb-30W), which corresponded to the lower- and upper-range power supplies recommended by the manufacturer for the coils used. The e-liquid used was a “blond tobacco” flavor (NHOSS[®] brand) and contained propylene glycol <65%, glycerol <35%, food flavorings and nicotine at a concentration of 16 mg/mL. The HTP device used in this study was the IQOS 2.4 model manufactured by Philip Morris International (Neuchâtel, Switzerland), with IQOS heats (amber flavor from Philip Morris International) purchased from a local tobacco shop (Lille, France). The IQOS device was regularly cleaned every 20 heats, as recommended by the manufacturer. 3R4F research cigarettes were purchased from the University of Kentucky (Lexington, KY, USA).

2.2. Cell Culture

The adherent human bronchial epithelial BEAS-2B cell line (CLR-3588) was purchased from ATCC[®] and was cultured as previously described [12]. For exposure experiments, cells were seeded onto Transwell-clear culture inserts with 0.4 μ m pore size (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pre-coated with 0.03 mg/mL type I collagen solution (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Cells were kept submerged for 4 days in LHC-9 medium (Thermo Fisher Scientific), then an air–liquid interface (ALI) was established 24 h before the exposure by removing medium from the apical surface, exposing only the basal surface to medium.

2.3. Aerosol Generation and Cell Exposure

The different aerosols were delivered using a Vitrocell[®] System (Vitrocell, Waldkirch, Germany), as previously described [12,40] (Figure 1), except for the rate of emissions dilution. In the present study, aerosols were diluted in synthetic air consisting of 80% nitrogen and 20% oxygen (Linde, Noyal sur Vilaine, France), using a flow rate of 0.5 L/min. Cell culture inserts were transferred into the exposure module (Vitrocell 6/3 CF module) and exposed to different doses (defined in puff number) of the diluted HTP, e-cig or cigarette aerosol generated by the Vitrocell[®] system. The negative control used in this study consisted of cells cultured at ALI and left in the incubator for the duration of exposure, as preliminary experiments showed that exposure to sterile air did not induce cytotoxicity, oxidative stress or inflammation and did not affect the transcriptome of BEAS-2B cells cultured at an ALI [40].

The Health Canada Intense (HCI) puff profile, which involved a 55 mL puff volume, 2 s puff duration and 30 s interpuff interval, was used for all products. For the 3R4F cigarette, all ventilation holes were blocked using adhesive tape during the experiments, in accordance with the recommendations for this smoking regime [41]. To ensure realistic experimental conditions and to avoid the generation of dry puffs, two regular e-cig users tested the e-cig using the puff duration and power settings as tested with the smoking machine. The users confirmed no dry puff sensation and sufficient aerosol production. In addition, the temperature of the generated aerosol can be considered as an indicator of experimental relevance and realism, according to the recommendations of French national organization and standardization [42]. The temperature of the aerosols generated from each device did not exceed 60 °C during all exposure periods [12], confirming the realism and the relevance of the exposures.

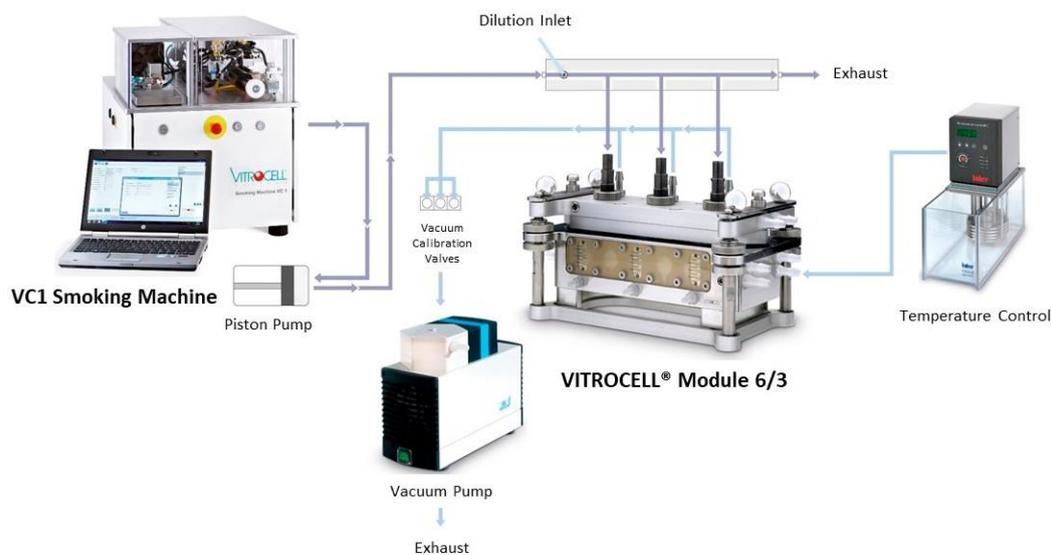


Figure 1. Vitrocell[®] exposure system. VC1 smoking machine (for generation of e-cig, HTP and cigarette emissions) connected to a 6/3 exposure module allowing the direct exposure of cells cultured at the air–liquid interface on 6-well inserts.

2.4. Intracellular ATP Assay

BEAS-2B cells were exposed to different puff numbers of diluted emissions (12, 60, 120, 240 and 360 puffs for HTP; 60, 120, 240 and 360 puffs for e-cig; 2, 4, 10, 20, 30 puffs for 3R4F cigarette). Cell viability was measured 24 h after exposure using the Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability assay kit (Promega, Charbonnières, France), as described previously [40]. Intracellular ATP was determined as percentages related to the ATP content in control cells arbitrarily set at a value of 100%, based on the number of puffs or nicotine content (mg) of each device's emissions.

Nicotine content in the different emissions (under the same experimental conditions) was previously determined [12]. Briefly, nicotine was first transferred from 10 puffs of aerosols into two glass impingers with fritted nozzles placed in series containing methanol maintained at -40 °C. Quantification of nicotine in aerosol extracts was then performed by ultra-performance liquid chromatography as previously described [43]. Results showed that Mb-18W, Mb-30W, HTP and 3R4F cigarette tests delivered 60, 137, 63 and 95 μg of nicotine/puff, respectively, under the HCl puffing profile [12]. Finally, nicotine content indicated on the abscissa of the cytotoxicity figure (Figure 2B) was determined by the nicotine concentration per puff (depending on the device) multiplied by the number of puffs (depending on the exposure duration).

2.5. Measure of the Nuclear Activity of the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2)

Nuclear extracts were first collected using the Nuclear Extract Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA). Transcription factor DNA-binding activity was then studied using the TransAM[®] Nrf2 kit (Active Motif), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, nuclear proteins (10 μg) were added to wells containing consensus Nrf2-binding site element oligonucleotides and incubated for 2 h at room temperature. Spectrophotometric quantification was accomplished after the addition of secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. The binding activity values were presented relative to activity measured in the negative control.

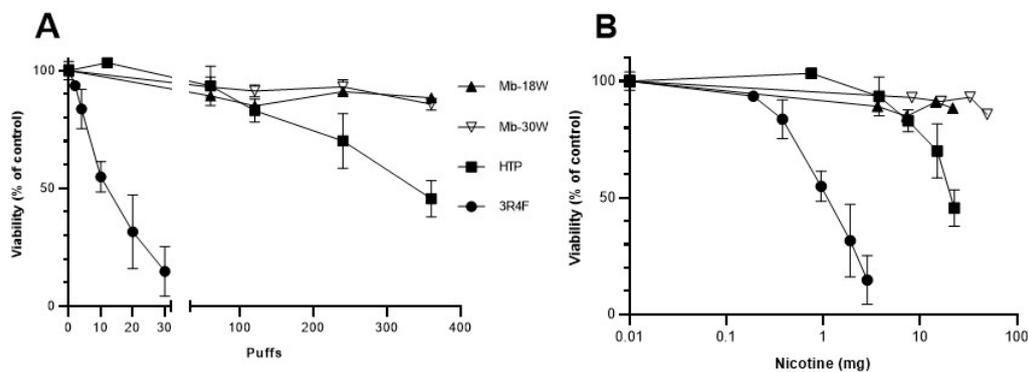


Figure 2. In vitro cytotoxicity of HTP, e-cig and cigarette emissions. BEAS-2B cells were exposed to an increasing number of puffs from HTP, e-cig (Mb-18W and Mb-30W) and 3R4F cigarette. Cell viability was evaluated by measuring the intracellular ATP level 24 h after exposure. Results are expressed as percentages relative to the ATP content in the unexposed cells, arbitrarily set at a value of 100%. Cell viability is expressed as a function of the number of puffs (A) or the nicotine content (mg) of each device's emissions (B). Data represent the mean \pm standard deviation (SD) of four independent culture replicates.

2.6. Gene Expression Analysis

Total RNAs were extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) on the QIAcube automaton, following the manufacturer's instructions. Expression of target genes was measured by quantitative real-time PCR of corresponding reverse-transcribed mRNAs. One microgram of total RNAs was reverse-transcribed into cDNAs using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). qPCRs were carried out with the StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems), using the TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) and the following TaqMan Assays: Hs01110250_m1 for *HMOX1*, Hs01045993_g1 for *NQO1* and Hs99999901_s1 for *18S*. Amplification curves were read with StepOne software V2.1 using the comparative cycle threshold method. The relative quantification of the steady-state mRNA levels was normalized against *18S* RNA. Results are expressed as the fold-change relative to the levels in control cells arbitrarily set at a value of 1.

2.7. Western Blot Analyses

Total cellular protein extracts were obtained by way of cell lysis. Twenty micrograms of protein underwent electrophoresis, and immunoblotting was performed with mouse monoclonal anti-human HO-1/HMOX1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, sc-136960), mouse monoclonal anti-human NQO-1 (1:1000, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA, NB200-209) and mouse monoclonal anti-human β -actin (1:50,000, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA, MAB8929).

2.8. Comet Assay

The comet assay was performed under alkaline conditions (pH >13) with or without the presence of hOGG1 (to detect specifically oxidative DNA damage) in compliance with previously described protocols [44–47]. A positive control was carried out in parallel with cells treated for 3 h with methyl methanesulfonate (MMS) (15 μ g/mL). After exposure, cells were washed with PBS and immediately harvested by trypsinization. Cell viability was assessed using the Trypan Blue assay. To exclude cytotoxicity as a confounding factor, inserts showing more than 70% relative cell viability, as recommended by Tice et al. [46], were then immediately submitted to the comet assay. For each condition, 2 independent exposures (i.e., 2 inserts) were realized and 4 technical replicates were carried out for each insert (i.e., 2 slides with hOGG1 and 2 slides without hOGG1). One hundred randomly selected cells per slide were then blindly examined (i.e., four hundred cells per condition).

The level of primary DNA damage was expressed as the percentage of DNA in the tail (% tail intensity).

2.9. Micronucleus Test

The micronucleus test was performed in compliance with our previously described protocol [44]. Briefly, at the end of each exposure, cells were washed, trypsinized, reseeded in a new 6-well plate and then incubated at 37 °C for an additional 2-day recovery period (i.e., 48 h). A positive control of Mitomycin C (0.1 µg/mL) was included (3 h of treatment). For each condition, 3 independent exposures (i.e., 3 inserts) were realized and duplicate technical replicates per insert were prepared for analysis (i.e., 6 slides in total per condition). Slides were independently coded and analyzed. Micronuclei (MN) were identified according to recommended criteria [48,49] and scored in 1000 intact mononucleated cells per slide (i.e., 6000 mononucleated cells/condition). Each treatment was coupled with an assessment of cytotoxicity evaluated by calculating the percentage of relative population doubling (RPD). According to the OECD 487 guideline [50], concentrations that led to a relative population doubling greater than $45 \pm 5\%$ were considered to have low or no cytotoxicity.

2.10. Global DNA Methylation

The global DNA was extracted using the Qiacube automaton (Qiagen, Redwood City, CA, USA) following the instructions of the QiaAmp DNA mini kit (Qiagen). Then, the quantification of methylated DNA was carried out by the 5-mC DNA ELISA Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Levels of 5-methylcytosine (5-mC) were determined using an indirect ELISA technique, where denatured single-stranded DNA samples (100 ng) were applied to well surfaces coated with 5-mC-binding buffer. Wells were first incubated with a monoclonal anti-5-mC antibody and then with the secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase. Detection of 5-mC occurred after the addition of the horseradish peroxidase developer. The colorimetric readout was quantifiable by spectrophotometry using a microplate reader at 405–450 nm. Percent 5-mC in a DNA sample was accurately quantified from a standard curve generated with specially designed controls included with the kit.

2.11. ELISA Assay to Detect Histone Modifications

The EpiQuik™ Total Histone Extraction kit (Epigentek, Farmingdale, NY, USA) was used according to the manufacturer to obtain acid extracts containing histones. Different histone modifications were then measured using the following EpiQuik™ Global Histone Quantification kits (Epigentek): acetylation of lysine 9 of histone H3 (H3K9ac), tri-methylation of lysine 4 of histone H3 (H3K4me3), tri-methylation of lysine 9 of histone H3 (H3K9me3) and tri-methylation of lysine 27 of histone H3 (H3K27me3). The total histone H3 was assessed in order to standardize the results. Total or modified histone H3 was captured in wells coated with anti-histone H3 antibody or one of the modifications. The captured H3 histones could then be detected with a specific detection antibody for each modification, followed by a fluorescence development reagent (fluorescent secondary antibody). The amount of histone was proportional to the fluorescence intensity obtained with a wavelength of 530ex/590em nm.

2.12. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the non-parametric Mann–Whitney test, except for the micronucleus test for which Fisher’s exact test was used, as recommended by Matsushima et al. [51]. Data were considered significantly different when $p < 0.05$. Data analyses and graphs were made with PRISM 8.0.2 software (Graph Pad, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Evaluation of the Cytotoxicity after Exposure to E-Cig or Tobacco Product Emissions

In order to compare the cytotoxicity of the different devices, BEAS-2B cells were exposed to a wide range of doses of HTP, e-cig (Modbox set to 18 or 30 W) or 3R4F cigarette emissions. A cell viability assay was performed 24 h after exposure by measuring the intracellular ATP content, which is directly proportional to the number of living cells. HTP emissions caused a decrease in ATP concentration when the number of puffs increased from 120 puffs (83% viability); ATP concentration reached 45% of cell viability after exposure to 360 puffs (Figure 2A). Cytotoxicity was more pronounced for 3R4F cigarette emissions, which caused a 45% decrease in cell viability after 10 puffs. Viability reached 15% after exposure to only 30 puffs of CS. By contrast, no significant decrease in cell viability was observed for up to 360 puffs of e-cig, both at low (18 W)- and high (30 W)-power settings. When the cell viability after the different emissions was expressed as a function of the amount of nicotine (Figure 2B), the ranking of devices based on their cytotoxicity remained similar: HTP was less cytotoxic than conventional cigarettes whereas the e-cig was not cytotoxic. The EC₅₀ (dose decreasing to 50% cell viability) was 12 puffs or 0.87 mg of nicotine for the 3R4F cigarette whereas it was 350 puffs or 22 mg of nicotine for the HTP. Doses not overly toxic (i.e., >85% of cell viability) within the 24 h exposure were chosen for further analyses of oxidative stress: 60 and 120 puffs for the e-cig and HTP, and 2 and 4 puffs for the 3R4F cigarette.

3.2. Study of Oxidative Stress after Exposure to E-Cig or Tobacco Product Emissions

The study of oxidative stress was first assessed by measuring the nuclear activity of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in response to e-cig, HTP or cigarette exposures. Indeed, the activation of Nrf2 is an efficient antioxidant defensive mechanism used by cells to counteract oxidative stress. The activation of Nrf2 was tested 4 h after exposure of BEAS-2B cells to the different emissions (Figure 3A). Both HTP (120 puffs) and cigarette (4 puffs) emissions significantly increased nuclear Nrf2 DNA-binding activity compared with negative control cells. By contrast, Mb-18W and Mb-30W (120 puffs) had no effect on this transcription factor's DNA-binding activity. Expression of the downstream targets of the Nrf2 transcription factor was then analyzed 24 h after cell exposure: the mRNA and protein levels of HMOX1 and NQO1 were measured by RT-qPCR and by Western blotting, respectively. Exposure to HTP (60 or 120 puffs) and 3R4F cigarette (4 puffs) emissions induced a strong increase in HMOX1 mRNA (Figure 3B). HMOX1 was also strongly enhanced at the protein level by both tobacco products, while the expression of the HMOX1 protein was increased to a smaller extent by e-cig (Figure 3D). In addition, 60 or 120 puffs of HTP and 4 puffs of the cigarette induced the expression of NQO1 in a similar manner, with an approximately 5-fold increase at the mRNA level (Figure 3C) and a 1.5-fold increase at the protein level (Figure 3E). A weak (but statistically significant) induction of NQO1 protein expression (Fold-change = 1.3) was also shown after exposure to 120 puffs of Mb-18W. However, this induction was not observed with the Mb-30W condition. In conclusion, the study of the activation of the Nrf2 pathway by tobacco and vaping products showed that, unlike e-cig, HTP induced an antioxidant response at a level comparable to that observed with conventional cigarettes, even though doses of tobacco cigarettes were much lower (4 puffs) than those of HTP (120 puffs) and achieved the same effect.

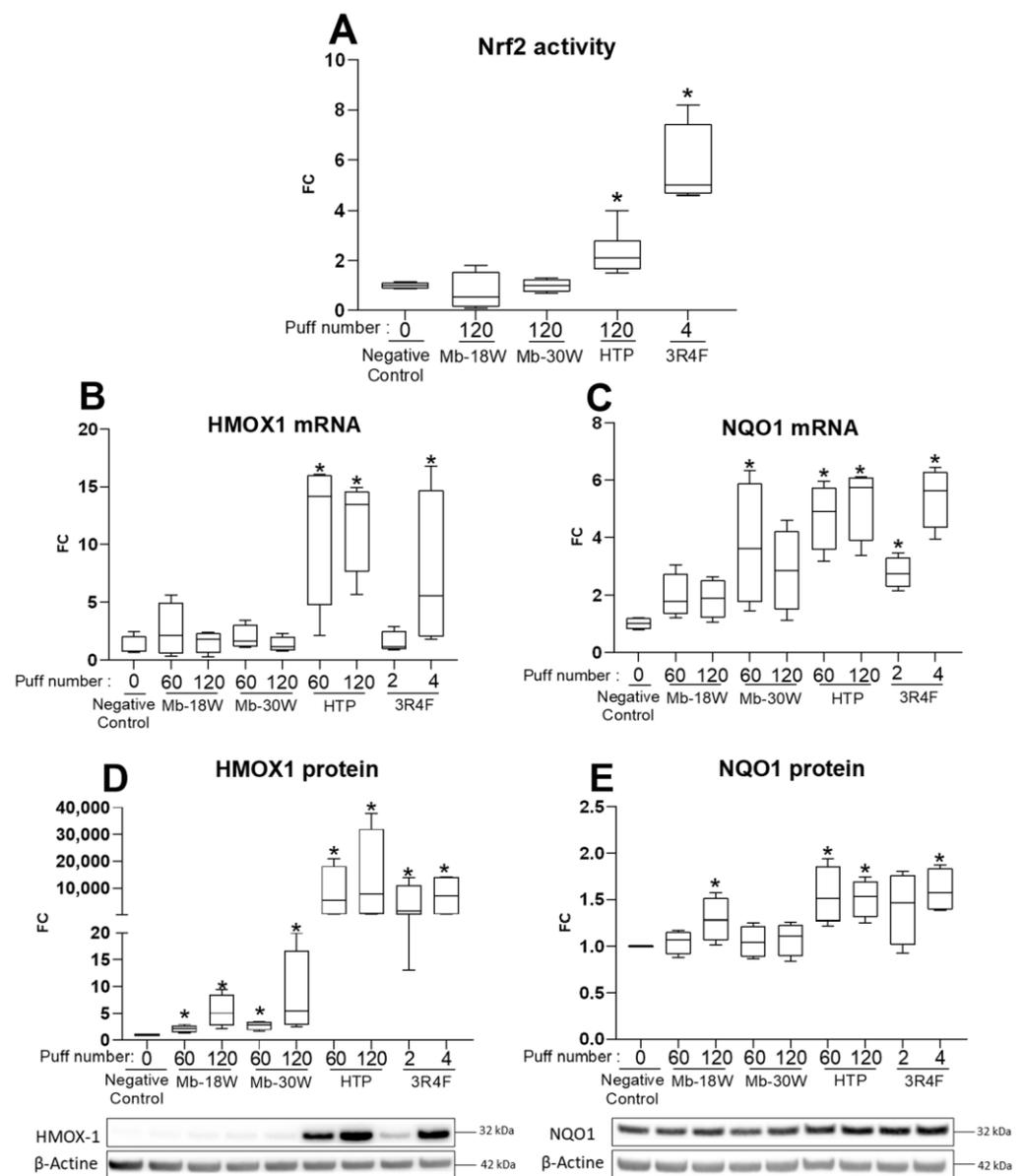


Figure 3. Evaluation of the Nrf2 antioxidant stress response in BEAS-2B cells exposed to HTP, e-cig and cigarette emissions. Cells were exposed to 60 or 120 puffs of HTP and e-cig (Mb-18 W and Mb-30W), or to 2 or 4 puffs of 3R4F cigarette. **(A)** Nuclear activity of Nrf2 was evaluated 4 h after exposure. Results are expressed as fold-change (FC) relative to Nrf2 activity in unexposed cells (negative control) arbitrarily set at value of 1. **(B,C)** Expression of HMOX1 and NQO1 mRNA was evaluated by RTqPCR 24 h after exposure. Results are expressed as fold-change (FC) relative to control cells, arbitrarily set at a value of 1. **(D,E)** Expression of HMOX1 and NQO1 proteins was evaluated 24 h after exposure by Western Blotting using appropriate antibodies and developed with an electrochemiluminescence reagent. Results are reported by representative Western blot images and relative densitometric bar graphs obtained after normalization with β-Actin expression. Results are expressed as fold-change (FC) relative to control cells, arbitrarily set at a value of 1. Data represent the median and interquartile range from four independent culture replicates. * $p < 0.05$ compared with negative control cells.

3.3. Assessment of Genotoxicity and Mutagenicity after Exposure to E-Cig or Tobacco Product Emissions

The generation of oxidative stress has been proposed as the underlying mechanism involved in the genotoxicity of many toxic compounds [52,53]. Primary DNA damage was first assessed after e-cig and tobacco product exposure using the comet assay. BEAS-2B cells were exposed to 60 or 120 puffs of HTP or e-cig (Mb-18W and Mb-30W) or 4 to 10 puffs of CS. DNA strand breaks were evaluated using the alkaline comet assay. In addition, the comet assay modified using the hOGG1 repair endonuclease was used to specifically detect oxidative lesions. Primary DNA damage is expressed as the percentage of DNA in the comet tail and is shown in Figure 4A. In the standard comet assay, 3R4F cigarette exposure induced a statistically significant, dose-dependent increase in DNA breaks (up to 13.6% tail intensity at higher dose, vs. 0.2% for the negative control). A statistically significant increase in DNA damage was also observed after exposure to 120 puffs of HTP. With the hOGG1-modified comet assay, statistically significant increases in tail intensity were observed for both 3R4F cigarette and HTP emissions at all doses tested (notably 27.5% for 10 puffs of CS and 16.3% for 120 puffs of HTP, vs. 1.5% for the negative control). On the contrary, under the two experimental conditions tested (i.e., with or without hOGG1), e-cig exposure did not induce any biologically nor statistically significant increases in DNA strand breaks or oxidative DNA damage, regardless of the dose (i.e., 60 and 120 puffs) or the power of e-cig (i.e., 18 and 30 W).

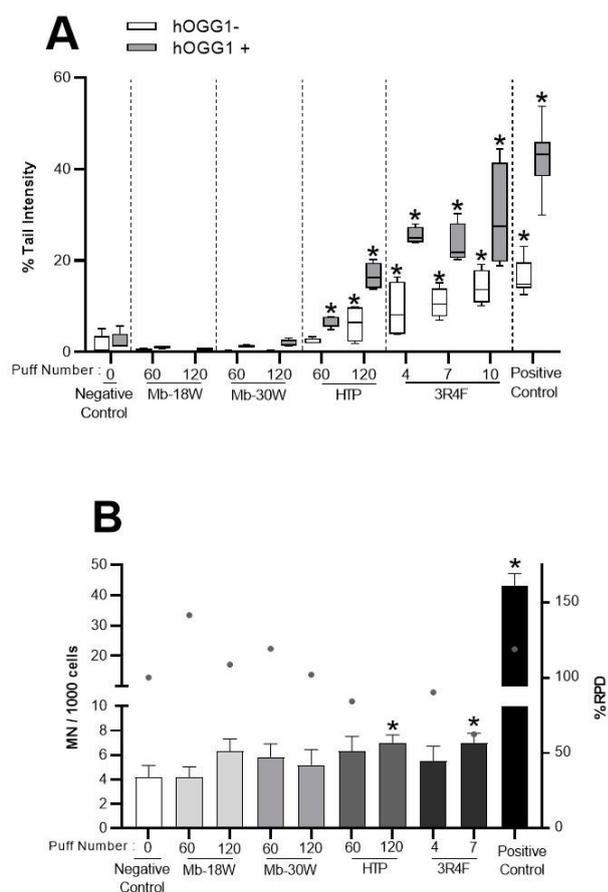


Figure 4. Measure of DNA damage and chromosomal aberrations in BEAS-2B cells exposed to HTP, e-cig and cigarette emissions. Cells were exposed to 60 or 120 puffs of HTP and e-cig (Mb-18W and Mb-30W) or to 4, 7 or 10 puffs of 3R4F cigarette. (A) DNA damage was measured by the comet assay under alkaline conditions in the presence (grey) or absence (white) of hOGG1. Cells were also treated for 3 h with MMS (15 µg/mL) as positive control. Results are expressed as % of DNA in the tail of

the comet. Data represent the median and interquartile range from 4 technical replicates resulting from two independent culture replicates (with 100 nuclei analyzed per replicates). * $p < 0.05$ compared with negative control cells. (B) Chromosomal aberrations were measured by the micronucleus test. Cells were treated for 3 h with Mitomycin C (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as positive control. Results are expressed as the number of micronucleated cells (MN) per 1000 cells. The % relative population doubling (RPD) is used as a measure of cytotoxicity. Data represent the mean \pm SD of three independent culture replicates. * $p < 0.05$ compared with negative control cells.

In addition, the *in vitro* micronucleus test was used to assess the induction of chromosomal breakage and aneuploidy 48 h after exposure of BEAS-2B cells to the different emissions (Figure 4B). Cells exposed to 10 puffs of the 3R4F cigarette were ultimately not analyzed due to excessive cytotoxicity (i.e., <45% viability compared with negative control). Only a slight statistically significant increase in the number of micronuclei was shown in cells exposed to 120 puffs of HTP and 7 puffs of CS (7 and 7 micronuclei vs. 4.2 micronuclei for 1000 cells in negative control, respectively). No significant induction of micronucleus formation was observed in BEAS-2B cells exposed to e-cig (Mb-18W and Mb-30W). Taken together, these data suggested that, under these experimental conditions in BEAS-2B cells, both tobacco products (HTP and conventional cigarettes) induced primary DNA damage and chromosomal aberrations. By contrast, e-cig (independently of the power tested) did not cause genetic damage.

3.4. Study of Impact of E-Cig or Tobacco Product Emissions in Global DNA Methylation and Histone Modulations

In order to compare the epigenetic impact of e-cig, HTP and cigarettes, the global DNA methylation and the post-translational modifications of histone H3 were investigated in BEAS-2B cells exposed to 120 puffs of HTP and e-cig (Mb-18W or Mb-30W) or to 4 puffs of a 3R4F cigarette. These different exposures did not induce statistically significant modulations of global DNA methylation (Figure 5A) in comparison with unexposed cells. Similarly, no modulation of histones H3K9me3, H3K9ac, H3K4me3 and H3K27me3 was demonstrated after acute exposure to the different emissions in the BEAS-2B cell line (Figure 5B).

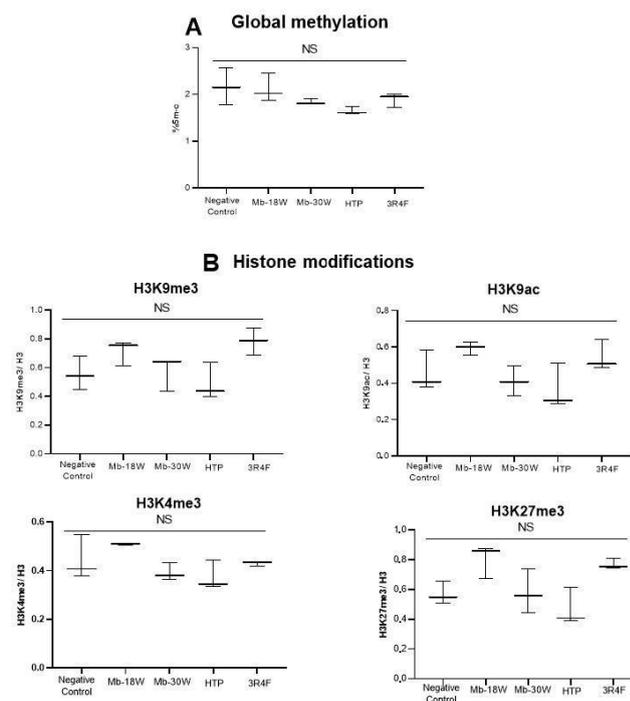


Figure 5. Evaluation of global DNA methylation and histone modulations in BEAS-2B cells exposed to HTP, e-cig and cigarette emissions. Cells were exposed to 120 puffs of HTP and e-cig (Mb-18W and

Mb-30W) (Mb-18W and Mb-30W) or to 4 puffs of 3R4F cigarette. (A) Global DNA methylation was measured 24 h after exposure. Results are expressed as percentages of global methylation. (B) Modifications of histones (H3K9me3, H3K9ac, H3K4me3 and H3K27me3) were measured by ELISA 24 h after exposures. Results are expressed as the ratio of modified histone/total H3. Data represent the median from three independent culture replicates. NS: not significant.

4. Discussion

Both e-cig and HTP provide alternatives for smokers and are increasingly used as smoking cessation aids, while the risk reduction effects of these new products are still the subject of controversial debate in humans [54,55]. In this context, our study was implemented with the objective to compare the effects of e-cig, HTP and cigarette emissions on the induction of oxidative stress and genetic and epigenetic lesions in human bronchial epithelial cells. We first report that HTP were less cytotoxic than conventional cigarettes whereas the e-cig used was not cytotoxic in BEAS-2B cells. The number of puffs required to reach EC₅₀ was about 29-fold higher for the HTP emissions (350 puffs) compared with CS exposure (12 puffs). These data were consistent with those of Chapman et al. who found a 38-fold difference between EC₅₀ of both devices in the same cell line [37]. On the other hand, we did not observe any significant decrease in cell viability after exposure of BEAS-2B cells to e-cig, regardless of the power used (18 or 30 W). Escobar et al. also compared the impact of the wattages (40 and 85 W) of a third-generation e-cig device on cytotoxicity in 16HBE airway epithelial cells exposed to different aerosolized mixtures of propylene glycol and glycerol. A modest increase in LDH release (<10% of the positive control) was seen only with propylene glycol aerosolized using the e-cig at high power (85 W) [56]. By contrast, other authors have demonstrated a clear dose-dependent cytotoxicity after exposure to e-cig aerosols but only under specific or extreme conditions with an airflow vent closed [57] or with e-liquid containing vitamin E acetate [58].

Consistent with results of the cytotoxicity assessment, an antioxidant response was only observed after exposure of BEAS-2B cells to HTP or CS. Indeed, both tobacco products increased the binding activity of Nrf2 to antioxidant response element (ARE) and the expression of its downstream targets HMOX1 and NQO1. These results were in accordance with data from Giebe et al. who showed that stimulation of primary human endothelial cells with aqueous extracts of HTP and cigarettes led to activation of the Nrf2 antioxidant defense system [59]. In this latter study, as in ours, the doses required to induce oxidative stress were much lower for cigarettes than for HTP. In addition, consistently in both studies, e-cig had no significant effect on the Nrf2 pathway. By contrast, other studies have shown that e-cig used in specific conditions induced a Nrf2-dependent oxidative stress. Indeed, an increase in HMOX1 and NQO1 gene expression and carbonylated proteins was observed in the 16HBE cell line exposed to aerosolized glycerol when an e-cig device was used at high power of 85 W while no effect was observed on antioxidant response genes after an exposure at 40 W power [56]. Moreover, Canchola et al. reported that aerosol generated from an e-liquid containing vitamin E acetate resulted in up-regulation of NQO1 and HMOX1 genes in BEAS-2B cells, due to thermal decomposition products of vitamin E acetate [58].

The induction of the antioxidant stress response by tobacco products was also correlated with generation of oxidative DNA damage (measured by the hOGG1-modified comet assay) and DNA strand breaks in BEAS-2B cells exposed to HTP and CS. In addition, assessment of chromosomal damage showed that the micronuclei frequency was statistically significantly increased after exposure to 3R4F cigarettes and HTP, evidencing the genotoxic activity (i.e., breakage and aneuploidy) of these two tobacco products under our experimental conditions. These latest results are consistent with those of the comet assay, demonstrating that the primary DNA damage observed can lead to chromosomal aberrations after cell division. An *in vivo* study has previously shown that exposure to HTP caused oxidative damage in the lungs and also DNA strand breaks in the leucocytes

of exposed rats [38]. Other authors have also observed an increase in micronuclei frequency after HTP exposure [37,39], while Thorne et al. concluded with negative results for a micronucleus test performed with total particulate matter from HTP in the Chinese hamster V79 cell line [34].

For the study of e-cig genotoxicity, we showed that e-cig did not induce primary DNA lesions (no DNA breaks or oxidative DNA damage), or chromosomal aberrations, in BEAS-2B cells up to an exposure of 120 puffs. Contradictory conclusions have often been published about the genotoxic activity of e-cig. The lack of genotoxic potential of e-cig under our experimental conditions is consistent with the study of Tellez et al. who evaluated the genotoxicity of aerosols generated from 10 flavored e-liquids with or without nicotine in 3 different immortalized oral epithelial cell lines. None of aerosols increased DNA damage (assessed by the alkaline comet assay), unlike the CS that caused a dose-dependent increase in DNA strand breaks in the three cell lines [31]. Similar to our work, negative results were also reported in several studies performing the micronucleus test after e-cig exposure [3,32,33]. On the contrary, other *in vitro* studies have shown a positive response to the comet assay [29,30,60,61] and/or to the micronucleus test [30,31] after e-cig exposure. These positive results could be explained by specific conditions used for e-cig exposure. Indeed, an exposure to 20 puffs performed with a short interpuff interval (20 s) induced DNA lesions in immortalized human alveolar A549 cells [60]. In another study using normal epithelial cells and head and neck squamous cell carcinoma cell lines, repeated exposure to e-cig aerosol extracts for 1 week and 2 months resulted in an increase in comet tail length and an accumulation of gamma-H2AX foci, independently of the nicotine present in the e-liquid [29]. Al-Saleh et al. assessed the genotoxicity of 33 e-liquids in human lymphoblastoid TK6 cells using the comet assay. All the e-liquids induced DNA damage in these cells, with a greater genotoxic effect in the presence of metabolic activation [30]. However, these last two studies used immersed cells with e-liquids or e-cig aerosol extracts diluted in culture media. This mode of cell exposure appears less relevant than air-liquid interface-cultured cells exposed to aerosols generated via a smoking machine [62].

The conflicting data published in the literature about the cytotoxicity, oxidative stress generation and genotoxicity of e-cig and HTP can be explained by several factors, such as models of e-cig or HTP, the type of product tested (e.g., whole smoke aerosol, smoke condensate or extract, particulate/gas phase, e-liquid itself, etc.), e-liquid composition, usage patterns (e.g., power of e-cig), cell models (e.g., lung epithelial cells, oral epithelial cells, oropharynx cells, "regulatory" cells, rodent vs. human origin, p53 status, antioxidant capacities, etc.), mode of cell exposure (e.g., submerged cells or ALI condition), various endpoints and durations of exposure (acute or repeated). Another parameter that varied between different studies was the puff regime. Indeed, diverse standardized smoking or vaping regimes have been created on the basis of users' puffing behavior (or topography) which varied greatly between e-cig, HTP and cigarettes. Thus, the ISO 20768:2018 puff regime was recommended for e-cig, whereas HCI and ISO3308:2012 profiles are currently used for tobacco products. In the present study, the use of the HCI regime represented a limitation for the study of e-cig. However, we chose to use a single puff regime for all exposures in order to compare the toxicity of the different devices under the same laboratory conditions. In addition, we assessed the toxicity endpoints on human p53-competent BEAS-2B cells after an acute exposure to e-cig, HTP or 3R4F aerosols. Prolonged exposures to aerosols could reveal secondary or cumulative toxicological effects in lung cells. We have previously demonstrated, using an *in vivo* murine model, that a chronic exposure (6 months) to 3R4F cigarettes and to Mb-30W e-cig induced oxidative DNA damage in the lungs and the liver [63]. By contrast, Mb-18W e-cig did not induce *in vivo* primary DNA lesions. In addition, no chromosomal aberrations or gene mutations were evidenced in this murine model regardless of the type of product. It will be interesting to assess the genotoxicity and mutagenicity of HTP in animals chronically exposed to their emissions, given that HTP have already caused DNA lesions after acute exposure of the BEAS-2B

cells. Repeated induction of DNA damage due to long-term exposure, combined with a dysfunction in DNA repair pathways, could generate accumulated mutations and promote carcinogenesis. Reiterated exposures (in animal or cell models) should also help to identify epigenetic alterations. Indeed, neither histone modulations nor global DNA methylation changes were found in our *in vitro* model after acute exposure, regardless of the type of emissions (including CS). However, global hypomethylation has already been observed in BEAS-2B cells after repeated daily exposures to CS [26]. Similarly, Wang et al. showed that a reiterated exposure to CS enhanced the methylation of histone H3 (H3K27me3) in a time-dependent manner in human bronchial epithelial cells [25]. Thus, repeated exposures appear to be more relevant to demonstrate epigenetic alterations and, therefore, studies in cell and animal models chronically exposed to e-cig and HTP are urgently required.

The potential for cytotoxicity, oxidative stress induction and genotoxicity may be associated with the chemical constituents of emissions and the production of carbonyl compounds, PAHs, volatile organic compounds, heavy metals, etc. In a previous study [12], we compared the chemical composition of the different emissions used in the present study. The differences in the *in vitro* toxicity between the devices are consistent with the concentrations of chemical compounds measured previously. Indeed, we shown that HTP emitted less PAHs and carbonyls than conventional cigarettes. However, amounts of these compounds in HTP aerosols were still higher than in e-cig aerosols. The presence of higher concentrations of aldehydes, PAHs, quinones, ketones and free radical species in the emissions of tobacco products [64] may contribute to enhanced oxidative stress in exposed cells. Among these compounds, formaldehyde, acetaldehyde and benzo-[a]-pyrene are well-known DNA-damaging agents and their presence at high concentrations may explain the generation of oxidative DNA lesions and/or DNA strand breaks in HTP- and CS-exposed BEAS-2B cells. In contrast, the concentrations of carbonyl compounds and PAHs measured in the emissions of e-cig were sufficiently low, due to the absence of combustion during e-cig use, which may explain the lack of cytotoxicity, Nrf2 antioxidant response and genotoxicity in BEAS-2B cells exposed to e-cig.

In conclusion, this study, which compared e-cig, HTP and cigarettes under the same experimental conditions, provides important and innovative results for health risk assessment, as it allowed ranking the devices according to their *in vitro* toxicity. Results reveal that HTP, unlike e-cig, elicit a biological response very similar to that of CS, but only after a more intensive exposure: both tobacco products induce cytotoxicity, Nrf2-dependent oxidative stress and genetic lesions in human epithelial pulmonary cells. Therefore, the health risk of HTP should not be underestimated. Animal studies should follow this work in order to determine the long-term toxicity and the tumorigenic potential of these emerging tobacco and vaping products.

Author Contributions: Conceptualization, G.G., F.N., J.-M.L.-G., A.P. and S.A.; Methodology, G.Z., S.T., A.P. and S.A.; Investigation, G.Z., M.L., T.M., S.T., O.S., A.P. and S.A.; Writing—Original Draft

Preparation, G.Z., A.P. and S.A.; Writing—Review and Editing, M.L., G.G., D.A. and J.-M.L.-G.; Visualization, G.Z.; Supervision, A.P. and S.A.; Funding Acquisition, G.G., F.N., J.-M.L.-G., A.P. and

S.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work received grants from the French National Cancer Institute (INCa) and the French Institute for Public Health Research (IReSP): Contracts N° INCa_13648 and N° INCa-IReSP_15748.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Doris Lagache and Gonzague Dourdin for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest with tobacco, HTP or e-cig industries.

Abbreviations

ALI	air–liquid interface
ARE	antioxidant response element
CS	cigarette smoke
EC₅₀	dose decreasing to 50% cell viability
e-cig	electronic cigarettes
HTP	heated tobacco products
Mb-18W	Modbox e-cig model set at 18 W
Mb-30W	Modbox e-cig model set at 30 W
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons

References

1. Thandra, K.C.; Barsouk, A.; Saginala, K.; Aluru, J.S.; Barsouk, A. Epidemiology of Lung Cancer. *Contemp. Oncol.* **2021**, *25*, 45–52. [[CrossRef](#)]
2. Soleimani, F.; Dobaradaran, S.; De-la-Torre, G.E.; Schmidt, T.C.; Saeedi, R. Content of Toxic Components of Cigarette, Cigarette Smoke vs Cigarette Butts: A Comprehensive Systematic Review. *Sci. Total Environ.* **2022**, *813*, 152667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rudd, K.; Stevenson, M.; Wiczorek, R.; Pani, J.; Trelles-Sticken, E.; Dethloff, O.; Czekala, L.; Simms, L.; Buchanan, F.; O’Connell, G.; et al. Chemical Composition and In Vitro Toxicity Profile of a Pod-Based E-Cigarette Aerosol Compared to Cigarette Smoke. *Appl. In Vitro Toxicol.* **2020**, *6*, 11–41. [[CrossRef](#)]
4. Vivarelli, F.; Granata, S.; Rullo, L.; Mussoni, M.; Candeletti, S.; Romualdi, P.; Fimognari, C.; Cruz-Chamorro, I.; Carrillo-Vico, A.; Paolini, M.; et al. On the Toxicity of E-Cigarettes Consumption: Focus on Pathological Cellular Mechanisms. *Pharmacol. Res.* **2022**, *182*, 106315. [[CrossRef](#)]
5. Esteban-Lopez, M.; Perry, M.D.; Garbinski, L.D.; Manevski, M.; Andre, M.; Ceyhan, Y.; Caobi, A.; Paul, P.; Lau, L.S.; Ramelow, J.; et al. Health Effects and Known Pathology Associated with the Use of E-Cigarettes. *Toxicol. Rep.* **2022**, *9*, 1357–1368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Wang, L.; Wang, Y.; Chen, J.; Liu, P.; Li, M. A Review of Toxicity Mechanism Studies of Electronic Cigarettes on Respiratory System. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5030. [[CrossRef](#)]
7. Smith, M.R.; Clark, B.; Lüdicke, F.; Schaller, J.-P.; Vanscheeuwijck, P.; Hoeng, J.; Peitsch, M.C. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 1: Description of the System and the Scientific Assessment Program. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *81* (Suppl. 2), S17–S26. [[CrossRef](#)]
8. Kim, S.C.; Friedman, T.C. A New Ingenious Enemy: Heat-Not-Burn Products. *Tob. Use Insights* **2022**, *15*, 1179173X221076419. [[CrossRef](#)]
9. Znyk, M.; Jurewicz, J.; Kaleta, D. Exposure to Heated Tobacco Products and Adverse Health Effects, a Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 6651. [[CrossRef](#)]
10. Bravo-Gutiérrez, O.A.; Falfán-Valencia, R.; Ramírez-Venegas, A.; Sansores, R.H.; Ponciano-Rodríguez, G.; Pérez-Rubio, G. Lung Damage Caused by Heated Tobacco Products and Electronic Nicotine Delivery Systems: A Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 4079. [[CrossRef](#)]
11. Schaller, J.-P.; Keller, D.; Poget, L.; Pratte, P.; Kaelin, E.; McHugh, D.; Cudazzo, G.; Smart, D.; Tricker, A.R.; Gautier, L.; et al. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 2: Chemical Composition, Genotoxicity, Cytotoxicity, and Physical Properties of the Aerosol. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *81* (Suppl. 2), S27–S47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Dusautoir, R.; Zarcone, G.; Verrielle, M.; Garçon, G.; Fronval, I.; Beauval, N.; Allorge, D.; Riffault, V.; Locoge, N.; Lo-Guidice, J.-M.; et al. Comparison of the Chemical Composition of Aerosols from Heated Tobacco Products, Electronic Cigarettes and Tobacco Cigarettes and Their Toxic Impacts on the Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *401*, 123417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Li, X.; Luo, Y.; Jiang, X.; Zhang, H.; Zhu, F.; Hu, S.; Hou, H.; Hu, Q.; Pang, Y. Chemical Analysis and Simulated Pyrolysis of Tobacco Heating System 2.2 Compared to Conventional Cigarettes. *Nicotine Tob. Res.* **2019**, *21*, 111–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nohmi, T. Thresholds of Genotoxic and Non-Genotoxic Carcinogens. *Toxicol. Res.* **2018**, *34*, 281–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Tang, M.-S.; Lee, H.-W.; Weng, M.-W.; Wang, H.-T.; Hu, Y.; Chen, L.-C.; Park, S.-H.; Chan, H.-W.; Xu, J.; Wu, X.-R.; et al. DNA Damage, DNA Repair and Carcinogenicity: Tobacco Smoke versus Electronic Cigarette Aerosol. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2022**, *789*, 108409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Shukla, S.; Khan, S.; Tollefsbol, T.O.; Meeran, S.M. Genetics and Epigenetics of Lung Cancer: Mechanisms and Future Perspectives. *Curr. Cancer Ther. Rev.* **2013**, *9*, 97–110. [[CrossRef](#)]
17. Wen, J.; Fu, J.; Zhang, W.; Guo, M. Genetic and Epigenetic Changes in Lung Carcinoma and Their Clinical Implications. *Mod. Pathol.* **2011**, *24*, 932–943. [[CrossRef](#)]
18. Caliri, A.W.; Tommasi, S.; Besaratinia, A. Relationships among Smoking, Oxidative Stress, Inflammation, Macromolecular Damage, and Cancer. *Mutat. Res.* **2021**, *787*, 108365. [[CrossRef](#)]

19. Xie, Z.; Rahman, I.; Goniewicz, M.L.; Li, D. Perspectives on Epigenetics Alterations Associated with Smoking and Vaping. *Function* **2021**, *2*, zqab022. [[CrossRef](#)]
20. Szulakowski, P.; Crowther, A.J.L.; Jiménez, L.A.; Donaldson, K.; Mayer, R.; Leonard, T.B.; MacNee, W.; Drost, E.M. The Effect of Smoking on the Transcriptional Regulation of Lung Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, *174*, 41–50. [[CrossRef](#)]
21. Ito, K.; Lim, S.; Caramori, G.; Chung, K.F.; Barnes, P.J.; Adcock, I.M. Cigarette Smoking Reduces Histone Deacetylase 2 Expression, Enhances Cytokine Expression, and Inhibits Glucocorticoid Actions in Alveolar Macrophages. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1110–1112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Caliri, A.W.; Caceres, A.; Tommasi, S.; Besaratinia, A. Hypomethylation of LINE-1 Repeat Elements and Global Loss of DNA Hydroxymethylation in Vapers and Smokers. *Epigenetics* **2020**, *15*, 816–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Marwick, J.A.; Kirkham, P.A.; Stevenson, C.S.; Danahay, H.; Giddings, J.; Butler, K.; Donaldson, K.; Macnee, W.; Rahman, I. Cigarette Smoke Alters Chromatin Remodeling and Induces Proinflammatory Genes in Rat Lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2004**, *31*, 633–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Choukallah, M.-A.; Sierro, N.; Martin, F.; Baumer, K.; Thomas, J.; Ouadi, S.; Hoeng, J.; Peitsch, M.C.; Ivanov, N.V. Tobacco Heating System 2.2 Has a Limited Impact on DNA Methylation of Candidate Enhancers in Mouse Lung Compared with Cigarette Smoke. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *123*, 501–510. [[CrossRef](#)]
25. Wang, B.; Liu, Y.; Luo, F.; Xu, Y.; Qin, Y.; Lu, X.; Xu, W.; Shi, L.; Liu, Q.; Xiang, Q. Epigenetic Silencing of microRNA-218 via EZH2-Mediated H3K27 Trimethylation Is Involved in Malignant Transformation of HBE Cells Induced by Cigarette Smoke Extract. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90*, 449–461. [[CrossRef](#)]
26. Huang, H.; Ji, Y.; Zhang, J.; Su, Z.; Liu, M.; Tong, J.; Ge, C.; Chen, T.; Li, J. Aberrant DNA Methylation in Radon and/or Cigarette Smoke-Induced Malignant Transformation in BEAS-2B Human Lung Cell Line. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2017**, *80*, 1321–1330. [[CrossRef](#)]
27. Sundar, I.K.; Nevid, M.Z.; Friedman, A.E.; Rahman, I. Cigarette Smoke Induces Distinct Histone Modifications in Lung Cells: Implications for the Pathogenesis of COPD and Lung Cancer. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 982–996. [[CrossRef](#)]
28. Sharma, S.; Kelly, T.K.; Jones, P.A. Epigenetics in Cancer. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 27–36. [[CrossRef](#)]
29. Yu, V.; Rahimy, M.; Korrapati, A.; Xuan, Y.; Zou, A.E.; Krishnan, A.R.; Tsui, T.; Aguilera, J.A.; Advani, S.; Crotty Alexander, L.E.; et al. Electronic Cigarettes Induce DNA Strand Breaks and Cell Death Independently of Nicotine in Cell Lines. *Oral. Oncol.* **2016**, *52*, 58–65. [[CrossRef](#)]
30. Al-Saleh, I.; Elkhatib, R.; Al-Rajoudi, T.; Al-Qudaihi, G.; Manogarannogaran, P.; Eltabache, C.; Alotaibi, A.; Mummer, A.B.; Almugbel, S. Cytotoxic and Genotoxic Effects of E-Liquids and Their Potential Associations with Nicotine, Menthol and Phthalate Esters. *Chemosphere* **2020**, *249*, 126153. [[CrossRef](#)]
31. Tellez, C.S.; Juri, D.E.; Phillips, L.M.; Do, K.; Yingling, C.M.; Thomas, C.L.; Dye, W.W.; Wu, G.; Kishida, S.; Kiyono, T.; et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of E-Cigarette Generated Aerosols Containing Diverse Flavoring Products and Nicotine in Oral Epithelial Cell Lines. *Toxicol. Sci.* **2021**, *179*, 220–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Misra, M.; Leverette, R.D.; Cooper, B.T.; Bennett, M.B.; Brown, S.E. Comparative in Vitro Toxicity Profile of Electronic and Tobacco Cigarettes, Smokeless Tobacco and Nicotine Replacement Therapy Products: E-Liquids, Extracts and Collected Aerosols. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 11325–11347. [[CrossRef](#)]
33. Wieczorek, R.; Phillips, G.; Czekala, L.; Trelles Sticken, E.; O’Connell, G.; Simms, L.; Rudd, K.; Stevenson, M.; Walele, T. A Comparative in Vitro Toxicity Assessment of Electronic Vaping Product E-Liquids and Aerosols with Tobacco Cigarette Smoke. *Toxicol. In Vitro* **2020**, *66*, 104866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Thorne, D.; Leverette, R.; Breheny, D.; Lloyd, M.; McEnaney, S.; Whitwell, J.; Clements, J.; Bombick, B.; Gaça, M. Genotoxicity Evaluation of Tobacco and Nicotine Delivery Products: Part Two. In Vitro Micronucleus Assay. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *132*, 110546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Thorne, D.; Leverette, R.; Breheny, D.; Lloyd, M.; McEnaney, S.; Whitwell, J.; Clements, J.; Bombick, B.; Gaca, M. Genotoxicity Evaluation of Tobacco and Nicotine Delivery Products: Part One. Mouse Lymphoma Assay. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *132*, 110584. [[CrossRef](#)]
36. Thorne, D.; Whitwell, J.; Clements, J.; Walker, P.; Breheny, D.; Gaca, M. The Genotoxicological Assessment of a Tobacco Heating Product Relative to Cigarette Smoke Using the in Vitro Micronucleus Assay. *Toxicol. Rep.* **2020**, *7*, 1010–1019. [[CrossRef](#)]
37. Chapman, F.; Sticken, E.T.; Wieczorek, R.; Pour, S.J.; Dethloff, O.; Budde, J.; Rudd, K.; Mason, E.; Czekala, L.; Yu, F.; et al. Multiple Endpoint in Vitro Toxicity Assessment of a Prototype Heated Tobacco Product Indicates Substantially Reduced Effects Compared to Those of Combustible Cigarette. *Toxicol. In Vitro* **2023**, *86*, 105510. [[CrossRef](#)]
38. Vivarelli, F.; Canistro, D.; Cirillo, S.; Elias, R.J.; Granata, S.; Mussoni, M.; Burattini, S.; Falcieri, E.; Turrini, E.; Fimognari, C.; et al. Unburned Tobacco Cigarette Smoke Alters Rat Ultrastructural Lung Airways and DNA. *Nicotine Tob. Res.* **2021**, *23*, 2127–2134. [[CrossRef](#)]
39. Crooks, I.; Neilson, L.; Scott, K.; Reynolds, L.; Oke, T.; Forster, M.; Meredith, C.; McAdam, K.; Proctor, C. Evaluation of Flavourings Potentially Used in a Heated Tobacco Product: Chemical Analysis, in Vitro Mutagenicity, Genotoxicity, Cytotoxicity and in Vitro Tumour Promoting Activity. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *118*, 940–952. [[CrossRef](#)]

40. Anthérieu, S.; Garat, A.; Beauval, N.; Soyez, M.; Allorge, D.; Garçon, G.; Lo-Guidice, J.-M. Comparison of Cellular and Transcriptomic Effects between Electronic Cigarette Vapor and Cigarette Smoke in Human Bronchial Epithelial Cells. *Toxicol. In Vitro* **2017**, *45*, 417–425. [[CrossRef](#)]
41. World Health Organization & WHO Tobacco Free Initiative. Standard operating procedure for intense smoking of cigarettes. In *WHO TobLabNet Official Method SOP 01*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2012.
42. AFNOR. Norme XP D90-300-3 Cigarettes Électroniques et e-Liquides. In *Partie 3: Exigences et méthodes d'essais Reatives*; Association Française de Normalisation (AFNOR): Paris, France, 2016.
43. Beauval, N.; Antherieu, S.; Soyez, M.; Gengler, N.; Grova, N.; Howsam, M.; Hardy, E.M.; Fischer, M.; Appenzeller, B.M.R.; Goossens, J.-F.; et al. Chemical Evaluation of Electronic Cigarettes: Multicomponent Analysis of Liquid Refills and Their Corresponding Aerosols. *J. Anal. Toxicol.* **2017**, *41*, 670–678. [[CrossRef](#)]
44. Platel, A.; Privat, K.; Talahari, S.; Delobel, A.; Dourdin, G.; Gateau, E.; Simar, S.; Saleh, Y.; Sotty, J.; Antherieu, S.; et al. Study of in Vitro and in Vivo Genotoxic Effects of Air Pollution Fine (PM_{2.5-0.18}) and Quasi-Ultrafine (PM_{0.18}) Particles on Lung Models. *Sci. Total Environ.* **2020**, *711*, 134666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191. [[CrossRef](#)]
46. Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C.; Sasaki, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in Vitro and in Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **2000**, *35*, 206–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Smith, C.C.; O'Donovan, M.R.; Martin, E.A. hOGG1 Recognizes Oxidative Damage Using the Comet Assay with Greater Specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* **2006**, *21*, 185–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Fenech, M.; Chang, W.P.; Kirsch-Volders, M.; Holland, N.; Bonassi, S.; Zeiger, E.; HUman Micronucleus Project. HUMN Project: Detailed Description of the Scoring Criteria for the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Isolated Human Lymphocyte Cultures. *Mutat. Res.* **2003**, *534*, 65–75. [[CrossRef](#)]
49. Fenech, M.; Bolognesi, C.; Kirsch-Volders, M.; Bonassi, S.; Zeiger, E.; Knasmüller, S.; Holland, N. Harmonisation of the Micronucleus Assay in Human Buccal Cells—A Human Micronucleus (HUMN) Project (Www.Humn.Org) Initiative Commencing in 2007. *Mutagenesis* **2007**, *22*, 3–4. [[CrossRef](#)]
50. OECD. *OECD Test Guideline No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*; OECD: Paris, France, 2016. [[CrossRef](#)]
51. Matsushima, T.; Hayashi, M.; Matsuoka, A.; Ishidate, M.; Miura, K.F.; Shimizu, H.; Suzuki, Y.; Morimoto, K.; Ogura, H.; Mure, K.; et al. Validation Study of the in Vitro Micronucleus Test in a Chinese Hamster Lung Cell Line (CHL/IU). *Mutagenesis* **1999**, *14*, 569–580. [[CrossRef](#)]
52. Santibáñez-Andrade, M.; Quezada-Maldonado, E.M.; Rivera-Pineda, A.; Chirino, Y.I.; García-Cuellar, C.M.; Sánchez-Pérez, Y. The Road to Malignant Cell Transformation after Particulate Matter Exposure: From Oxidative Stress to Genotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1782. [[CrossRef](#)]
53. Ďurovcová, I.; Kyzek, S.; Fabová, J.; Makuková, J.; Gálová, E.; Ševc̣ovic̣ová, A. Genotoxic Potential of Bisphenol A: A Review. *Environ. Pollut.* **2022**, *306*, 119346. [[CrossRef](#)]
54. Tattan-Birch, H.; Hartmann-Boyce, J.; Kock, L.; Simonavicius, E.; Brose, L.; Jackson, S.; Shahab, L.; Brown, J. Heated Tobacco Products for Smoking Cessation and Reducing Smoking Prevalence. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2022**, *2022*, CD013790. [[CrossRef](#)]
55. Lam, C.; West, A. Are Electronic Nicotine Delivery Systems an Effective Smoking Cessation Tool? *Can. J. Respir. Ther.* **2015**, *51*, 93–98.
56. Escobar, Y.-N.H.; Nipp, G.; Cui, T.; Petters, S.S.; Surratt, J.D.; Jaspers, I. In Vitro Toxicity and Chemical Characterization of Aerosol Derived from Electronic Cigarette Humectants Using a Newly Developed Exposure System. *Chem. Res. Toxicol.* **2020**, *33*, 1677–1688. [[CrossRef](#)]
57. Bishop, E.; Haswell, L.; Adamson, J.; Costigan, S.; Thorne, D.; Gaca, M. An Approach to Testing Undiluted E-Cigarette Aerosol in Vitro Using 3D Reconstituted Human Airway Epithelium. *Toxicol. In Vitro* **2019**, *54*, 391–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Canchola, A.; Ahmed, C.M.S.; Chen, K.; Chen, J.Y.; Lin, Y.-H. Formation of Redox-Active Duroquinone from Vaping of Vitamin E Acetate Contributes to Oxidative Lung Injury. *Chem. Res. Toxicol.* **2022**, *35*, 254–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Giebe, S.; Hofmann, A.; Brux, M.; Lowe, F.; Breheny, D.; Morawietz, H.; Brunssen, C. Comparative Study of the Effects of Cigarette Smoke versus next Generation Tobacco and Nicotine Product Extracts on Endothelial Function. *Redox Biol.* **2021**, *47*, 102150. [[CrossRef](#)]
60. Khalil, C.; Chahine, J.B.; Haykal, T.; Al Hageh, C.; Rizk, S.; Khnayzer, R.S. E-Cigarette Aerosol Induced Cytotoxicity, DNA Damages and Late Apoptosis in Dynamically Exposed A549 Cells. *Chemosphere* **2021**, *263*, 127874. [[CrossRef](#)]
61. Ganapathy, V.; Manyanga, J.; Brame, L.; McGuire, D.; Sadhasivam, B.; Floyd, E.; Rubenstein, D.A.; Ramachandran, I.; Wagener, T.; Queimado, L. Electronic Cigarette Aerosols Suppress Cellular Antioxidant Defenses and Induce Significant Oxidative DNA Damage. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177780. [[CrossRef](#)]
62. Li, X. In Vitro Toxicity Testing of Cigarette Smoke Based on the Air-Liquid Interface Exposure: A Review. *Toxicol. In Vitro* **2016**, *36*, 105–113. [[CrossRef](#)]

63. Platel, A.; Dusautoir, R.; Kervoaze, G.; Dourdin, G.; Gateau, E.; Talahari, S.; Huot, L.; Simar, S.; Ollivier, A.; Laine, W.; et al. Comparison of the in Vivo Genotoxicity of Electronic and Conventional Cigarettes Aerosols after Subacute, Subchronic and Chronic Exposures. *J. Hazard. Mater.* **2022**, *423*, 127246. [[CrossRef](#)]
64. Emma, R.; Caruso, M.; Campagna, D.; Pulvirenti, R.; Li Volti, G. The Impact of Tobacco Cigarettes, Vaping Products and Tobacco Heating Products on Oxidative Stress. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

ABSTRACT

***In vitro* study of the pulmonary toxicity of heated tobacco product and electronic cigarette emissions**

Exposure to cigarette smoke is responsible for nearly 90% of lung cancers. Electronic cigarettes and more recently heated tobacco products are alternatives to the conventional tobacco cigarette that have rapidly gained popularity, even before there was sufficient scientific evidence on their safety for users. The aim of this work was to compare the toxicity of heated tobacco emissions to that of electronic cigarettes and conventional cigarettes on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B cell line) by: (i) studying their cytotoxicity and searching any genetic and epigenetic lesions, (ii) identifying signaling pathways associated with the toxicity of the different emissions, using genome-wide transcriptomic analyses.

BEAS-2B cells cultured at the air-liquid interface were exposed to the emissions from heated tobacco products (IQOS[®] system, Philip Morris International), electronic cigarettes (Modbox TC[®] model (Nhoss) set at low [Mb-18W] or medium [Mb-30W] power) and the reference cigarette 3R4F. Emissions were generated by the Vitrocell[®] smoking machine. Cytotoxicity, DNA strand breaks and chromosomal aberrations were measured by quantification of intracellular ATP, comet assay and micronucleus test, respectively. Global DNA methylation and histone H3 modifications were measured by ELISA. Finally, genome-wide transcriptomic analysis was performed by microarray.

The results showed that heated tobacco emissions caused less cytotoxicity compared to cigarette smoke, but higher than electronic cigarette aerosols. Only heated tobacco and 3R4F cigarette significantly induced DNA strand breaks, oxidative DNA damage and chromosomal aberrations. Quantification of global DNA methylation as well as histone modifications showed no significant difference compared to negative control in this cell model, regardless of the device tested. Subtoxic doses (>85% cell viability) were chosen for transcriptomic analyses: 60 and 120 puffs for Mb-18W, Mb-30W and IQOS[®]; 2 and 4 puffs for the 3R4F cigarette. A two-dimensional hierarchical clustering showed two main clusters: one branch grouped tobacco products (IQOS[®] and cigarette) and the second branch showed a specific signature for e-cig (18 and 30 W). Finally, functional analysis of deregulated transcripts was assessed using IPA[®] software and enrichment (GSEA). The transcriptomic profiles of cells exposed to IQOS[®] and cigarettes showed similar deregulations: increased Nrf2-mediated oxidative stress response, ERK activation, induction of cell proliferation, increased glycolysis and cholesterol biosynthesis. For the electronic cigarette (Mb-30W only), an increase in interferon signaling, cholesterol biosynthesis and the senescence pathway were observed. To confirm these transcriptomic effects, additional analyses were performed. Activation of the transcription factor Nrf2 and induction of its targets HMOX1 and NQO1 were demonstrated with tobacco products, as was increased phosphorylation of ERK. Activation of senescence with Mb-30W was validated by β -galactosidase labeling.

In conclusion, these results demonstrate that, although the short-term toxicity of heated tobacco and e-cig seems less important than that of cigarettes, the impact of these devices at the cellular and molecular levels is not negligible. To complete this work, *in vivo* studies are needed to determine the long-term toxicity and the carcinogenic potential of these new products.

Keyword: Lung, Toxicology, Genotoxicity, Epigenetic, Transcriptomic, Oxidative stress

RESUME

Etude *in vitro* de la toxicité pulmonaire des émissions de tabac chauffé et de cigarette électronique

L'exposition à la fumée de cigarette est responsable de près de 90 % des cancers du poumon. Les cigarettes électroniques et plus récemment les produits de tabac chauffé sont des alternatives au tabac qui ont rapidement gagné en popularité, avant même qu'il n'y ait suffisamment de preuves scientifiques de leur innocuité pour les utilisateurs. Ces travaux ont eu pour objectif de comparer la toxicité des émissions de tabac chauffé à celle de la cigarette électronique et de la cigarette conventionnelle sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (lignée BEAS-2B) par : (i) l'étude de leur cytotoxicité et la recherche d'éventuelles lésions génétiques et épigénétiques, (ii) l'identification, à l'aide d'analyses transcriptomiques, de voies de signalisation associées à la toxicité des différentes émissions.

Des cellules BEAS-2B cultivées à l'interface air-liquide ont été exposées à des émissions de tabac chauffé (système IQOS®, Philip Morris International), de cigarette électronique (modèle Modbox TC® (Nhoss) réglé à une puissance faible [Mb-18W] ou moyenne [Mb-30W]) et à la cigarette de référence 3R4F. Les émissions ont été générées par la machine à fumer Vitrocell®. La cytotoxicité, les cassures de brins d'ADN et les aberrations chromosomiques ont été respectivement mesurées par la quantification de l'ATP intracellulaire et par les tests des comètes et du micronoyau. La mesure de la méthylation globale de l'ADN et des modifications d'histone H3 ont été mesurées par ELISA. Enfin, une analyse transcriptomique pangénomique a été réalisée par microarray.

Les résultats obtenus ont montré que les émissions de tabac chauffé provoquaient une cytotoxicité moindre par rapport à la fumée de cigarette, mais plus élevée que les aérosols de cigarette électronique. Seuls le tabac chauffé et la cigarette 3R4F ont induits des cassures d'ADN, des lésions oxydatives de l'ADN et des aberrations chromosomiques. La quantification de la méthylation globale de l'ADN ainsi que celle des modifications d'histone n'ont montré aucune différence significative par rapport au témoin négatif dans ce modèle cellulaire, quel que soit le dispositif testé. Des doses subtoxiques (> 85 % de viabilité cellulaire) ont été choisies pour les analyses transcriptomiques : 60 et 120 bouffées pour Mb-18W, Mb-30W et IQOS® ; 2 et 4 bouffées pour la cigarette 3R4F. Une analyse statistique de classification hiérarchique a montré une branche regroupant les produits du tabac (IQOS® et cigarette 3R4F) et une seconde branche avec une signature spécifique pour la cigarette électronique (18 et 30 W). Enfin, l'analyse fonctionnelle des transcrits dérégulés a été évaluée à l'aide du logiciel IPA® et par enrichissement (GSEA). Les profils transcriptomiques des cellules exposées à l'IQOS® et à la cigarette ont montré des dérégulations similaires : augmentation de la réponse au stress oxydatif médiée par Nrf2, activation d'ERK, induction de la prolifération cellulaire, augmentation de la glycolyse et de la biosynthèse du cholestérol. Pour la cigarette électronique (Mb-30W uniquement), une augmentation de la signalisation de l'interféron, de la biosynthèse du cholestérol et de la voie de la sénescence a été observée. Afin de confirmer ces effets transcriptomiques, des analyses complémentaires ont été réalisées. Ainsi l'activation du facteur de transcription Nrf2 et l'induction de ses cibles HMOX1 et NQO1 a été mise en évidence avec les produits du tabac, de même que l'augmentation de la phosphorylation d'ERK. L'activation de la sénescence avec la Mb-30W a été validée par un marquage de la β -galactosidase.

En conclusion, ces résultats démontrent que, bien que la toxicité à court-terme du tabac chauffé et de l'e-cig semble moins importante que celle de la cigarette, l'impact de ces dispositifs au niveau cellulaire et moléculaire n'est pas négligeable. Pour compléter ce travail, des études *in vivo* sont nécessaires afin de déterminer la toxicité à long-terme et le potentiel cancérigène de ces nouveaux produits.

Mots clés : Poumon, Toxicologie, Génotoxicité, Epigénétique, Transcriptomique, Stress oxydant