



ZARCONI Gianni

Master Ingénierie de la santé Parcours Qualité -

Environnement - Santé - Toxicologie

Mémoire de Master 2

# Caractérisation physico-chimique et évaluation de la toxicité des aérosols d'e-cigarette et d'un système de tabac chauffé

Date de soutenance :

Composition de jury :

- Président de jury : Pr Hervé HUBERT
- 2<sup>ème</sup> membre de jury : Dr Ludivine CANIVET
- Responsable de mémoire : Dr Sébastien ANThERIEU

Faculté Ingénierie et Management de la Santé – ILIS  
42, rue Ambroise Paré  
59120 LOOS



## Remerciements

Je remercie toute l'équipe de l'EA 4483 de m'avoir accueilli pendant cette année de stage et notamment le directeur de l'EA4483 Jean-Marc Lo-Guidice.

Un très grand merci à Sébastien Anthérieu pour la confiance et tout le temps qu'il m'a accordé ainsi que pour tout ce qu'il m'a appris sur le métier de chercheur.

Je remercie également Romain Dusautoir pour m'avoir fait confiance pour toutes les manipulations que l'on a réalisé pour sa thèse et mon projet ainsi que ses précieux conseils tout au long du stage.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Guillaume Garçon pour les conseils qu'il m'a donnés tout au long de ce stage.

Je remercie aussi l'IMT de Douai d'avoir permis la réalisation des mesures de composés carbonylés et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et plus particulièrement Marie Verrièle, Nadine Locoge et Isabelle Fronval.

Je remercie également Ilias Halitim, étudiant en deuxième année de DEUST, pour l'aide qu'il a pu m'apporter pendant son stage de 2 mois à mes côtés.

# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>I</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>IV</b>
<b>GLOSSAIRE</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>VI</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. ÉTAT DE L'ART</b> .....	<b>2</b>
1.1. LE TABAGISME .....	2
1.2. LES AIDES AU SEVRAGE TABAGIQUE .....	4
1.3. CIGARETTE ELECTRONIQUE.....	4
1.3.1. <i>Présentation générale</i> .....	4
1.3.2. <i>Composition des aérosols</i> .....	5
1.3.3. <i>Toxicité</i> .....	6
1.4. LE TABAC CHAUFFE.....	9
1.4.1. <i>Présentation générale</i> .....	9
1.4.2. <i>Composition des aérosols</i> .....	10
1.4.3. <i>Toxicité</i> .....	11
<b>2. MATERIEL ET METHODE</b> .....	<b>14</b>
2.1. LES PROFILS DE VAPOTAGE OU FUMAGE.....	14
2.2. CIGARETTE 3R4F .....	14
2.3. LES CIGARETTES ELECTRONIQUES ET E-LIQUIDE .....	15
2.4. L'IQOS.....	15
2.5. MACHINE A FUMER.....	16
2.6. PRELEVEMENT ET ANALYSE DES COMPOSES CARBONYLES .....	17
2.7. PRELEVEMENT ET ANALYSE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUE .....	19
2.8. PRELEVEMENT ET ANALYSE DE LA NICOTINE .....	19
2.9. CULTURE CELLULAIRE.....	19
2.9.1. <i>Repiquage</i> .....	19
2.9.2. <i>Préparation des cellules pour les expositions</i> .....	20
2.9.3. <i>Exposition des cellules aux aérosols</i> .....	20
.....	21
2.10. TESTS IN VITRO.....	22
2.10.1. <i>Test de viabilité cellulaire : test ATP</i> .....	22
2.10.2. <i>Inflammation</i> .....	22

2.10.3. Récupération des échantillons pour étude du stress oxydant (dosages GSH/GSSG)	23
2.11. METHODE STATISTIQUE	23
<b>3. RESULTATS</b>	<b>24</b>
3.1. TEMPERATURE DE L'AEROSOL	24
3.2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES AEROSOLS ET FUMÉES	26
3.2.1. Dosage des composés carbonylés	26
3.2.2. Dosages des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	29
3.2.1. Dosage de la nicotine	31
3.3. TEST DE TOXICITE <i>IN VITRO</i>	33
3.3.1. Test de viabilité cellulaire	33
3.3.2. Mesure de l'inflammation	35
<b>4. DISCUSSION</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>45</b>
<b>ANNEXE 1</b>	<b>52</b>
<b>ANNEXE 2</b>	<b>54</b>
<b>ANNEXE 3</b>	<b>55</b>
<b>ANNEXE 4</b>	<b>56</b>

## Table des tableaux

Tableau 1 : Profils de fumage utilisés .....	14
Tableau 2 : Comparaison des quantités en composés carbonylés des différents dispositifs en fonction de la cigarette 3R4F ou de l'IQOS ou de l'e-cig 30W sous le profil HCl..	27
Tableau 3 : Taux de réduction en HAP totaux entre les différents dispositifs.....	30
Tableau 4 : Concentration inhibitrice 50 (CI50) des e-cig, IQOS et cigarette.....	34
Tableau 5 : Dosage de médiateurs de l'inflammatoires .....	35

## Table des figures

Figure 1 : Modèle Lounge (A) et Modèle Mod Box Nhoss (B) e-liquide tabac blond 16 mg/mL de nicotine (C).....	15
Figure 2 : IQOS, système de tabac chauffé .....	16
Figure 3 : Machine à fumer VC1 de Vitrocell® .....	17
Figure 4 : Module d'exposition aux fumés de cigarette ou aux aérosols (Vitrocell systems, s. d.-b).....	17
Figure 5 : Cartouche cotée à la DNPH.....	17
Figure 6 : Chromatographie liquide haute performance détection UV (HPLC-UV).....	18
Figure 7 : Schéma d'une culture cellulaire sur insert immergé.....	20
Figure 8 : Schéma d'une culture cellulaire sur insert en interface air/ liquide.....	20
Figure 9 : Schéma du montage d'exposition des cellules BEAS-2B.....	21
Figure 10 : Protocole d'exposition des différents dispositifs et tests de toxicité réalisés. ..	21
Figure 11 : Réaction du test de mesure de l'ATP .....	22
Figure 12 : Test de température des aérosols des différents dispositifs utilisés.....	25
Figure 13 : Dosage des composés carbonylés des e-cigs, IQOS et cigarettes 3R4F .....	26
Figure 14 : Dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques des e-cigs, IQOS et cigarettes 3R4F.....	29
Figure 15 : Concentration en nicotine des différents dispositifs (en µg/bouffée).....	31
Figure 16 : Quantités totaux en composés carbonylés et HAPs par bouffée et par µg de nicotine.....	32
Figure 17 : Test de dilution des aérosols.....	33
Figure 18 : Courbe de viabilité cellulaire suite à l'exposition des cellules BEAS-2B à l'e-cigarettes, IQOS et cigarettes .....	34

# Glossaire

**BEAS 2B** : Lignée cellulaire immortalisée, dérivée d'épithélium bronchique d'un individu sain ; les cellules ont été infectées avec un adénovirus de type SV40 leur permettant d'acquérir des capacités de prolifération infinies *in vitro*.

**Cellules H292** : Cellules épithéliales issues d'un carcinome muco-épidermoïde humain permettant une prolifération infinie des cellules quand elles sont cultivées *in vitro*.

**Exposition corps entier** : Technique d'exposition *in vivo* sur l'ensemble du corps à un aérosol ou à de la fumée.

**Exposition nose-only** : technique d'exposition *in vivo* permettant à la souris d'être exposée à un aérosol ou à de la fumée uniquement par le nez.

**Glutathion** : Molécule qui intervient dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) afin de maintenir l'équilibre entre les oxydants et antioxydants. Pour agir, le glutathion réduit s'oxyde et produit du glutathion oxydé.

**Hit** : sensation dans la gorge du fumeur lors de l'aspiration que le vapoteur cherche à reproduire avec les e-cigs.

## Liste des abréviations

**AFNOR** : Association française de normalisation

**ATP** : Adénosine triphosphate

**E-cig** : cigarette électronique

**EDTA** : Éthylènediaminetétraacétique

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**FDA** : Food and Drug Administration

**DNP** : 2,4-dinitrophenylhydrazine

**GM-CSF** : Granulocytes et de macrophages

**GRO- $\alpha$**  : Oncogène Croissance Régulé- $\alpha$

**GSH** : Glutathion oxydé

**GSSG** : Glutathion réduit

**HAP** : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

**HCSP** : Haut Comité de la santé publique

**HCI** : Health Canada Intensive

**HPLC** : Chromatographie liquide haute performance

**IAL** : Interface Air/ Liquide

**IL-6** : Interleukine 6

**IL-8** : Interleukine 8

**IFN $\gamma$**  : Interféron gamma

**IMPECS** : IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine

**INCa** : Institut National du Cancer

**INSERM** : Institut national de la santé et de la recherche médicale

**ISO** : Organisation Internationale de Normalisation

**IQOS** : I quit ordinary smoking

**LPS** : Lipopolysaccharide

**MCP-1** : protéine chimioattractrice de monocytes 1

**MIP-1 $\alpha$**  : protéine inflammatoire macrophage 1 $\alpha$

**PE** : Phycoerythrin

**PBS** : Phosphate Buffered Saline

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**RANTES** : régulation de l'activation des cellules normales exprimées et sécrétées

## Introduction

La consommation de tabac est un problème majeur de santé publique causant 7 millions de morts par an dans le monde (OMS, 2018). Elle est en particulier responsable 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 sevrage tabagique est aujourd'hui le seul moyen efficace de ralentir la progression des maladies liées au tabac.

Depuis quelques années, de nouvelles alternatives au tabac classique sont apparues sur le marché : la cigarette électronique (e-cig) en est l'une d'elles. Ne produisant pas de fumée mais un aérosol, elle est généralement perçue comme étant moins nocive que la cigarette conventionnelle (Azzopardi et al., 2016; Goniewicz et al., 2014; Taylor et al., 2016). Ce dispositif pourrait donc constituer un outil de réduction des risques tabagiques intéressant pour les fumeurs (HCSP, 2016).

Suite au succès de l'e-cig et les difficultés de certains consommateurs à adhérer à un produit sans tabac, dû notamment au manque du « hit\* » (sensation dans la gorge du fumeur lors de l'aspiration que le vapoteur cherche à reproduire avec les e-cigs) et de goût authentique du tabac (Li et al., 2018), les industriels du tabac se sont lancés dans la création d'un produit contenant du tabac et vendu comme moins nocif : le tabac chauffé. Ce dispositif permet un chauffage du tabac plutôt qu'une combustion dans le cas de la cigarette conventionnelle, il permettrait ainsi une réduction de 90% des composés nocifs et potentiellement dangereux de la cigarette classique (Smith et al., 2016). Il pourrait donc apparaître comme un outil intéressant d'aide au sevrage tabagique. En revanche, le manque d'études indépendantes sur sa toxicité oblige à rester prudent quant à son utilisation et encourage des laboratoires indépendants à effectuer des tests sur ces dispositifs. Cela permettra aux autorités nationales et internationales d'obtenir des données de recherches scientifiques indépendantes sur la toxicité potentielle de ces systèmes de tabac chauffé afin de créer les futures réglementations de ces produits.

C'est dans ce cadre que mon mémoire a pour objectif principal : « La caractérisation physico-chimique des aérosols et la toxicité *in vitro* d'un système de tabac chauffé ». Au sein de ce mémoire, une étude approfondie de l'état de l'art est réalisée. Ensuite, le « Matériel et Méthodes » expose les techniques utilisées lors de ce stage, suivie d'un paragraphe « Résultats » qui présente les principales données générées et d'une « Discussion » où une analyse critique des résultats est présentée.

# 1. État de l'art

## 1.1. Le tabagisme

Le tabagisme est la principale cause de décès évitable dans le monde. En effet, il est responsable de la mort de 7 millions de personnes chaque année dans le monde (six millions par tabagisme actif, le reste par tabagisme passif) (OMS, 2018). De plus, la moitié des consommateurs actuels mourront d'une maladie liée au tabac. Le tabagisme est en particulier responsable de 90% des cancers du poumon et représente le facteur de risque le plus important pour la bronchopneumopathie chronique obstructive et les maladies cardiovasculaires (Hill, 2012). Le tabagisme passif représente 890 000 décès prématurés par an, parmi ces décès, 28% était des enfants en 2004 (OMS, 2018).

En France, le taux de fumeurs quotidiens représentait 27% de la population des 15-75 ans en 2017 (Lermenier-Jeannet, 2018). En 2015, 75 000 décès étaient imputables au tabagisme, ce qui correspond à environ 13% des décès enregistrés en France métropolitaine la même année (Bonaldi et al., 2016).

La fumée de cigarette contient plus de 6 000 composés (Buratto et al., 2018) dont 93 sont classés comme nocifs et potentiellement dangereux par la Food and Drug Administration (Acétaldéhyde, Benzo[a]pyrène, Formaldéhyde, Acroléine, Plomb...) (Food and Drug Administration, 2012). Parmi ces composés, on retrouve les composés carbonylés. Ce sont des molécules contenant le groupe carbonyle (-CO-). Ils correspondent aux classes fonctionnelles des aldéhydes (-CHO) et des cétones (-CO-R). Ces composés sont étudiés en raison de leur forte réactivité et parce qu'on les retrouve à de fortes concentrations dans la cigarette (1 mg/cigarette) (Counts et al., 2005). Ils sont aussi fortement retrouvés dans l'air intérieur principalement dû à la cigarette (Fujioka and Shibamoto, 2006). Étant très réactifs, certains de ces composés comme l'acétaldéhyde, l'acétone, l'acroléine, le formaldéhyde, le crotonaldéhyde et le propionaldéhyde peuvent avoir une toxicité respiratoire, cardiovasculaire ainsi qu'être cancérigènes, reprotoxiques et toxiques pour le développement (Food and Drug Administration, 2012). On retrouve aussi des Hydrocarbures Aromatiques polycycliques (HAP). Ils peuvent être trouvés à l'état naturel ou être générés lors de la combustion de la cigarette ou d'autres matériaux organiques. L'exposition à plusieurs de ces HAP, généralement sous forme de mélange, est associée à des effets cancérigènes (US EPA, 2008).

La nicotine a été grandement étudiée parce qu'elle est le principal alcaloïde du tabac, représentant 90 à 95 % du contenu total en alcaloïdes. Sous forme de shoot dans la cigarette conventionnelle, la nicotine est connue pour un important pouvoir addictogène, participant à la dépendance au tabac. En effet, la nicotémie augmente rapidement lors de la consommation d'une cigarette et culmine lorsque le fumeur éteint sa cigarette. La nicotine atteint ainsi très rapidement divers organes, et en particulier le cerveau. Le syndrome de manque lié à la nicotine peut se manifester par de l'anxiété, une agitation, une irritabilité, des perturbations du sommeil, une humeur dépressive et des troubles de la concentration (Inserm, n.d.).

Parmi les effets cellulaires du tabac, le stress oxydant ainsi que l'inflammation sont reconnus en tant que précurseurs de pathologies chroniques.

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre les systèmes producteurs d'oxydants et les capacités anti-oxydantes d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire, en faveur des entités oxydantes (Sies, 1991). Sachant qu'une seule bouffée de fumée de cigarette contient  $10^{15}$  molécules oxydantes (Cano et al., 2010), l'inhalation de fumée expose le tissu pulmonaire à des niveaux élevés de radicaux libres. En présence de certains métaux contenus dans la cigarette comme le fer, qui s'accumulent chez les fumeurs, le peroxyde d'hydrogène peut être converti en radicaux hydroxyles hautement réactifs, ce qui accroît encore le stress oxydatif chez les fumeurs (Baskara-Yhuellou, 2013). La présence de taux élevés d'ERO peut amener, en présence d'ADN, à la formation de nouveaux produits tels qu'une oxydation d'une paire de base de l'ADN : la 8-hydroxy-déoxyguanosine (8-OHdG). La formation de cette dernière est une première étape vers des processus de cancérogénèse. De plus, l'inflammation pulmonaire prolongée induite par l'exposition à la fumée de cigarette favorise le stress oxydatif, ce qui conduit diverses pathologies du système respiratoire.

La cigarette est un facteur de risque reconnu pour de nombreuses maladies systémiques chroniques comportant des composants inflammatoires tels que l'athérosclérose, la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, et le diabète sucré non insulino-dépendant. Les propriétés pro-inflammatoires de la fumée de cigarette sont bien documentées. La fumée de cigarette favorise l'inflammation en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), et en augmentant l'accumulation de cellules immunitaires dans les voies respiratoires (Strzelak et al., 2018).

Actuellement, le sevrage tabagique est le seul moyen pour diminuer les risques liés au tabac et donc le nombre de morts et de cancers qui lui sont attribuables. On estime que l'arrêt du tabac à l'âge de 60, 50, 40 ou 30 ans permettrait respectivement d'augmenter d'environ 3, 6, 9 ou 10 ans l'espérance de vie (Doll et al., 2004).

## 1.2. Les aides au sevrage tabagique

Depuis de nombreuses décennies, la réduction des méfaits du tabagisme est axée sur la prévention et la promotion du sevrage tabagique afin d'aider les fumeurs à arrêter leur consommation. En effet, les taux de sevrage tabagique sont faibles en l'absence d'aide pharmacologique et non pharmacologique (3 à 5%) (Hill, 2012). La majorité des personnes ayant essayé d'arrêter de fumer persiste dans une consommation de tabac sur plusieurs années selon une alternance de périodes de rechute et d'abstinence (Lagrue et al., 2003; le Ministre de la Santé et des Solidarités, 2006). Les traitements nicotiques de substitution (TNS) (gommes à mâcher, timbres transdermiques, ...) sont les traitements pharmacologiques ayant donné les résultats les plus probants. Malgré une efficacité de ces dispositifs reconnus (le Ministre de la Santé et des Solidarités, 2006), ces traitements peuvent être insuffisants. C'est pourquoi les fumeurs se tournent vers des alternatives plus proches de la cigarette, notamment l'e-cig et plus récemment le tabac chauffé.

## 1.3. Cigarette électronique

### 1.3.1. Présentation générale

Au cours des dernières années, une nouvelle alternative à la cigarette conventionnelle est apparue : la cigarette électronique. Ce produit fonctionne à l'électricité sans combustion, destiné à simuler l'acte de fumer du tabac. Les consommateurs d'e-cig ou vapoteurs inspirent un aérosol constitué de fines particules, appelé communément « vapeur », issu du chauffage du « e-liquide ». Ce liquide est constitué principalement de propylène glycol, glycérol et d'arômes additionnés ou non de différentes concentrations de nicotine (Delrieu et al., 2013). De nos jours, les prévalences du vapotage quotidien et occasionnel sont de 3,3% et de 2,5% en France. Ces prévalences ont diminué entre 2014 et 2016 (5,9% à 3,3% et 2,9% à 2,5%). Parmi les vapoteurs quotidiens, la part des ex-fumeurs est en

augmentation (plus de 40% des vapoteurs en 2016) alors que la part de fumeurs (occasionnels ou quotidiens) s'élève à 58,8% (Pasquereau et al., 2017). Cependant, dans la population totale, la proportion des personnes consommant les deux produits est en baisse, alors que la proportion des anciens fumeurs devenus vapoteurs est stable. De plus, des études récentes ont étudié si la cigarette électronique pouvait aider à arrêter la consommation de tabac. Johnson *et al* ont montré que les cigarettes électroniques peuvent servir de substitut aux cigarettes de tabac et peuvent être un substitut plus efficace que la gomme à la nicotine pour réduire la consommation de tabac (Johnson et al., 2017). Ainsi, on remarque que l'e-cig permet d'aider une partie des fumeurs à arrêter la consommation de tabac même si elle semble être abandonnée par ceux n'arrivant pas à arrêter de fumer (Pasquereau et al., 2017). Les travaux du Haut Conseil de la santé publique (HCSP) arrivaient à la même conclusion : l'utilisation de l'e-cig peut être considérée comme une alternative à la cigarette classique et comme un outil d'aide au sevrage tabagique pour les populations fumeuses (HCSP, 2016). Malgré tout, l'innocuité de ces dispositifs n'étant pas encore prouvée, il est important de rester vigilant sur la promotion de ces produits tout comme le souligne la Société espagnole de pneumologie et de chirurgie thoracique (SEPAR) qui a publié une déclaration officielle sur les e-cigarettes et l'IQOS. En effet, d'après une étude des preuves scientifiques disponibles, cette société conclue que « la sécurité des vapeurs ou des vapeurs inhalées par les utilisateurs de ces dispositifs ne peut être garantie. Les résultats contradictoires de divers essais cliniques et méta-analyses signifient également que ces dispositifs ne peuvent être recommandés pour leur efficacité en termes de sevrage, en particulier lorsque des traitements sûrs et efficaces sont disponibles pour aider à arrêter de fumer (varénicline, traitement de substitution de la nicotine et bupropion) » (Signes-Costa et al., 2019). C'est pourquoi il est nécessaire que de nombreuses études scientifiques soient réalisées pour répondre à la question de la toxicité de ces produits. Des problèmes peuvent aussi être rencontrés auprès des non-fumeurs, en effet, l'e-cig pourrait être une porte d'entrée au tabagisme.

### 1.3.2. Composition des aérosols

Alors que plusieurs études s'accordent sur le fait que la nocivité globale des e-vapeurs 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. On retrouve des métaux issus de l'e-cig, des pesticides, des HAPs, mais tous à l'état de trace et en quantité bien inférieure à ceux retrouvés dans la fumée de cig (Beauval et al., 2017). 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 a étudié le transfert des métaux dans les aérosols. Les résultats 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 induit une contamination du e-liquide (Olmedo et al., 2018). Des traces de pesticides ont été quantifiés dans certains e-liquides aromatisés, avec ou sans nicotine, ce qui suggère que les arômes constituent aussi bien une source probable de pesticides que la nicotine (Beauval et al., 2017). Des composés carbonylés sont aussi retrouvés (Beauval et al., 2017; Bekki et al., 2014; Gillman et al., 2016; Goniewicz et al., 2014). Certains d'entre eux, comme le formaldéhyde, l'acétaldéhyde sont classés comme dangereux et potentiellement dangereux par la FDA (Food and Drug Administration, 2012) ou classés par le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) respectivement groupe 1 et groupe 2B (IARC, 2018). Ces composés toxiques sont principalement dus à la dégradation du propylène glycol et glycérol (Bekki et al., 2014). Un certain nombre de recherches ont démontré la présence de composés carbonylés en quantité importante se rapprochant des concentrations présentes dans les fumées de cigarette (Goniewicz et al., 2014; Kosmider et al., 2014) mais elles ont ensuite été critiquées (Farsalinos et al., 2015) car elles étaient réalisées en conditions extrêmes non-réalisées avec des fréquences de fumage trop élevées (une bouffée tous les 10 secondes) pouvant engendrer des températures d'aérosols trop élevées, une génération de composés plus importante et donc une plus forte toxicité (Farsalinos et al., 2015). Tout comme les composés carbonylés, Beauval et al. ont retrouvé des HAPs dans les aérosols d'e-cig. Des concentrations plus faibles ont été mesurées dans les e-vapeurs par rapport à celles de fumée de cigarette (Beauval et al., 2017). Une autre étude a aussi observé la présence de benzo(a)pyrène dans les aérosols d'e-cig (Wagner et al., 2018).

### 1.3.3. Toxicité

Un certain nombre d'études toxicologiques ont été menées depuis quelques années, en majorité des études *in vitro* et plus récemment des études *in vivo*. Les études toxicologiques *in vitro* peuvent être réalisées avec plusieurs types de culture cellulaire : 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 type de culture cellulaire est plus pertinent et permet ainsi d'exposer les cellules directement aux aérosols ou aux fumées générées à partir d'une machine à fumer. Concernant les premières études d'e-cig publiées dans la littérature, les expositions ont été réalisées avec des cultures cellulaires immergées. C'est seulement par la suite que certains chercheurs ont utilisés des cultures cellulaires en IAL. Les tests réalisés sur cultures cellulaires immergées sont dans la majorité des cas des expositions avec du e-liquide mélangé au milieu de culture (Husari et al., 2016; Misra et al., 2014; Schweitzer et al., 2015; Wu et al., 2014) , alors que les tests réalisés sur cultures cellulaires en IAL correspondent à des expositions aux aérosols d'e-cig (Anthérieu et al., 2017; Li, 2016) . Les études réalisées sur les cultures cellulaires immergées ont 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 avec de fortes doses non représentatives. D'autres ne montrent aucun effet cytotoxique (Misra et al., 2014; Wu et al., 2014) mais mettent en évidence une augmentation de la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 (Wu et al., 2014) qui contribue à la défense de l'hôte par la stimulation des réponses de phase aiguës, de l'hématopoïèse et des réactions immunitaires (Tanaka et al., 2014). Une autre étude constate que les composés aromatisants des e-liquides (acétoïne, diacétyle, ...) qu'ils ont testé entraînaient la libération de la cytokine chimioattractante IL-8 suite à des expositions de plusieurs types cellulaires (Cellules bronchiques humaines immortalisées Beas2B\*, cellules épithéliales du carcinome muco-épidermoïde humain H292\*, fibroblastes pulmonaires humains HFL1) à des concentrations variables pendant une longue durée (Gerloff et al., 2017). Malgré tout, dans tous les cas, les études comparatives cigarette/e-cig effectuées en phase immergée ont 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 la vaporisation du e-liquide et ne peuvent pas être considérées comme pertinentes quant à l'utilisation d'e-cig puisque les échantillons n'ont pas été testés sous la forme consommée par les vapoteurs. De plus pour que les cellules soient exposées à cet aérosol, il est nécessaire de changer de mode de culture. C'est pourquoi l'exposition de cellules cultivées en interface air-liquide par la génération d'aérosol d'e-cig via une machine à fumer semble beaucoup plus représentative et pertinente.

Des résultats contradictoires sont aussi retrouvés dans les études d'exposition de cellules en IAL aux aérosols d'e-cig . Certains obtiennent une diminution de la viabilité cellulaire suite à l'exposition à des aérosols d'e-cig (Leigh et al., 2016; Scheffler et al., 2015b).

D'autres n'observent aucun effet sur la viabilité cellulaire (Anthérieu et al., 2017; Garcia-Arcos et al., 2016) mais observe tout de même certains mécanismes de toxicité, avec par exemple une réduction de la fréquence des battements ciliaires et de la conductance ionique (Garcia-Arcos et al., 2016) ou une augmentation du marqueur d'inflammation IL-6 (Anthérieu et al., 2017) . Ces différences de toxicité peuvent s'expliquer notamment par la différence de lignée utilisée entre les études. En revanche entre Garcia-Arcos et al. et Scheffler et al. la différence s'opère au niveau du protocole expérimental : l'un expose à 200 bouffées de 55ml sans arrêt entre les bouffée (Scheffler et al., 2015b) alors que l'autre expose à 36 bouffées de 70 mL (Garcia-Arcos et al., 2016). Le choix du nombre de bouffée, 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 afin de standardiser les pratiques. Leigh et al. ont testé plusieurs saveurs d'e-liquides disponibles dans le commerce, ils ont remarqué qu'avec les arômes menthols, cafés ou fraises 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 après l'exposition à la fumée de cigarette). Cette étude a également étudié une gamme de voltage et de concentrations de nicotine, rapportant une toxicité accrue avec des voltages appliqués plus élevés, et une libération accrue d'IL-6 (sans aucun effet sur la viabilité) avec le plus haut niveau de nicotine (24 mg / ml) (Leigh et al., 2016). Concernant le stress oxydant, l'e-cig ne provoque aucun changement de ratio glutathion\* oxydé/glutathion réduit (GSSG/GSH) (Anthérieu et al., 2017; Scheffler et al., 2015a) et donc aucun stress oxydant.

Les expositions *in vivo* peuvent être réalisées de plusieurs façons. L'exposition « corps entier\* », qui implique que le corps entier de l'animal soit au contact de l'aérosol ou de la fumée puisque l'animal est placé dans une enceinte où les aérosols/fumées seront envoyées. Ce type d'exposition est relativement simple à réaliser et est utilisé par la plupart des chercheurs. Cependant, ces expositions ne permettent pas seulement l'étude de la toxicité par inhalation, puisque les expositions cutanées et par ingestion (lors du toilettage des animaux) sont également présentes. Les expositions uniquement par le nez (« nose-only\* ») sont donc plus pertinentes pour étudier seulement une toxicité par inhalation, même si elles nécessitent une certaine forme de contrainte de l'animal pendant l'exposition (Chun et al., 2017). Plusieurs études ont été réalisées grâce à des modèles *in vivo*, la plupart du temps avec des expositions « corps entier » Les e-cigs induisent une inflammation, augmentent le développement de l'inflammation allergiques des voies aériennes dans les modèles d'asthmatique, 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). Malgré tout, d'après la plupart des paramètres étudiés en toxicologie *in vivo*, les e-cigs semblent moins nocives que les cigarettes de tabac. Les effets néfastes à long terme sur la santé de l'utilisation de l'e-cig chez l'homme ne peuvent être prédits à partir des données actuellement disponibles (Hiemstra and Bals, 2016). Il manque encore de données pertinentes, en particulier sur des expositions chroniques jusqu'à plusieurs mois. Les études actuelles se limitent souvent à des expositions de quelques semaines.

Les études décrivant les effets indésirables sur l'homme sont peu nombreuses. Des cas de pneumonie lipoïde attribuées à l'inhalation chronique de vapeurs de e-cig ont été rapportés (McCauley et al., 2012). En revanche, (Flouris et al., 2013) ont réalisé la première évaluation complète et standardisée de l'impact aigu du vapotage actif et passif d'e-cig sur la cotinine sérique et la fonction pulmonaire, par rapport au tabagisme actif et passif. Quinze fumeurs et 15 non-fumeurs ont participé à une étude contrôlée à mesures répétées. La cigarette électronique et les cigarettes de tabac ont généré des effets similaires sur les taux sériques de cotinine après tabagisme actif et passif, l'e-cig est donc équivalente à la cigarette conventionnelle pour fournir de la nicotine aux fumeurs. En revanche, ni une brève séance de vapotage e-cig actif, ni un vapotage passif d'e-cig n'ont modifié de manière significative la fonction pulmonaire.

## 1.4. Le tabac chauffé

### 1.4.1. Présentation générale

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 80 (Stapleton et al., 1998; Sutherland et al., 1993). Parmi ces derniers, il y a Reynolds American (RAI) avec Eclipse, REVO et Core, Philip Morris International (PMI) avec l'HeatStick et l'IQOS ("I Quit Ordinary Smoking"), British American Tobacco (BAT) avec Glo et Glo iFuse, et Japan Tobacco (JTI) avec la Ploom.

Actuellement, le plus répandu est le dispositif de Phillip Morris international nommé IQOS. Il a été commercialisé en 2014 en Italie et au Japon (Liu et al., 2018; Tabuchi et al., 2016). Il est actuellement disponible dans plus de 30 pays, principalement en Europe (Philip Morris International, n.d.). Selon PMI, il y aurait actuellement 5,9 millions de consommateurs

qui utiliseraient l'IQOS (Philip Morris International, n.d.). C'est un système électronique qui chauffe des bâtonnets de tabac (appelé heets) via une lame chauffante à une température de 350°C maximum afin de créer un aérosol imprégné des arômes du tabac. Les heets ne contiennent pas de tabac haché comme la cigarette, il est 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). Selon son fabricant, ce dispositif ne permettrait aucune combustion du tabac et générerait donc un aérosol contenant en moyenne 90 à 95% de constituants nocifs et potentiellement dangereux en moins par rapport à la fumée d'une cigarette de référence 3R4F utilisée dans la recherche sur le tabac (Smith et al., 2016). Plusieurs études ont évalué ce dispositif ou les dispositifs des autres fabricants, cependant, peu sont réalisées par des laboratoires indépendants (Bekki et al., 2017; Farsalinos et al., 2018; Kaur et al., 2018; Li et al., 2018). En effet la majorité des études ont été réalisées par les fabricants des produits eux-mêmes (Buratto et al., 2018; Eaton et al., 2018; Forster et al., 2018; Haziza et al., 2016; Jaunky et al., 2018; Kogel et al., 2016; Oviedo et al., 2016; Proctor, 2018; Schaller et al., 2016a; Schaller et al., 2016b; Sewer et al., 2016; Smith et al., 2016; Thorne et al., 2018; Wong et al., 2016). Il est donc important que de nouvelles études indépendantes soient menées afin de vérifier (ou non) les résultats publiés et de les compléter en étudiant précisément les mécanismes de toxicité qui pourraient être mis en jeu.

### 1.4.2. Composition des aérosols

Les études physico-chimiques sur l'aérosol du tabac chauffé sont encore peu nombreuses. Celles menées par le fabricant de l'IQOS montrent des niveaux des principaux composés nocifs (monoxyde de carbone, composés organiques volatiles, composés carbonylés, amine aromatique...)(Schaller et al., 2016a) réduits de 90% par rapport à la cigarette de référence 3R4F (Schaller et al., 2016). Li et al ont montré des résultats proches : en effet, à l'exception de certains composés carbonylés (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). En revanche, Phillip Morris a contesté une étude publiée par Auer et al (Auer et al., 2017). Cette étude a montré une réduction des composés toxiques nettement inférieure à celle montrée dans les articles financés par PMI. Ils contestent cette étude car le protocole utilisé n'utilise pas des cigarettes de référence et un profil de fumage différent du leur et ne correspondant à aucune norme (Maeder and Peitsch, 2017). Concernant les 6 composés carbonylés classés par la FDA, 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 (Formaldéhyde, Acétaldéhyde, Acétone, Acroléine, Crotonaldéhyde, Propanal) nettement inférieurs à ceux d'une cigarette du commerce mais supérieur à ceux d'une cigarette électronique (Farsalinos et al., 2018). Ruprecht *et al.* ont aussi observé des niveaux sensiblement différents en composés carbonylés par rapport à la cigarette 3R4F dans les fumées 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 ainsi que des émissions de métaux réduites dans l'aérosol d'IQOS par rapport aux cigarettes électroniques et aux cigarettes conventionnelles et étaient pour la plupart similaires aux bruit de fond (Ruprecht et al., 2017).

### 1.4.3. Toxicité

L'abandon du tabac demeure l'approche la plus efficace pour réduire au minimum le risque de maladies liées au tabagisme. Cependant, selon Zanetti et al, la réduction des constituants nocifs en chauffant plutôt qu'en brûlant du tabac, sans modifier la quantité de nicotine, est un nouveau paradigme prometteur dans la réduction des méfaits. En effet, ils ont observé que l'impact de la cigarette 3R4F était supérieur à celui de l'aérosol d'IQOS avec une cytotoxicité, des altérations morphologiques du tissu et des sécrétions de médiateurs inflammatoires toxiques plus importante (Zanetti et al., 2017). Il a aussi été montré par analyse transcriptomique que les cultures cellulaires exposées avaient des perturbations significatives dans divers réseaux géniques tels que l'apoptose, la nécroptose, la sénescence, le métabolisme des xénobiotiques et le stress oxydatif. Les réponses au stress suite à l'exposition à l'aérosol d'IQOS ont été nettement plus faibles et les cultures exposées ont été récupérées en meilleur état que celles exposées à la cigarette 3R4F. Une autre étude, cette fois-ci menée sur un modèle de cellules épithéliales nasales organotypiques tridimensionnelles (3-D), a aussi montré que l'impact de la fumée 3R4F était considérablement plus élevé que celui de l'aérosol d'IQOS en termes de cytotoxicité, d'altération de la morphologie tissulaire, de sécrétion de médiateurs proinflammatoires. Ils montrent aussi une altération de la fonction ciliaire et l'augmentation de la perturbation du transcriptome et des profils d'expression des micro ARN (Iskandar et al., 2017). Une réduction d'environ 90% avait été observé par Schaller et al entre la cigarette 3R4F et l'IQOS en comparant la cytotoxicité et la mutagénicité dans un test de lymphome de souris, ainsi qu'une absence de mutagénicité dans le test d'Ames pour l'aérosol d'IQOS (Schaller et al., 2016a). Malgré le consensus entre ces études, aucune d'entre elles n'est indépendante, il est donc nécessaire que des études indépendantes soient publiées pour vérifier ou non ces résultats. Une étude récente a comparé la cytotoxicité (par plusieurs

tests différents : MTT et LDH) sur plusieurs types cellulaires (cellules épithéliales bronchiques humaines (Beas-2B) et des cellules primaires musculaires humaines des voies aériennes (ASM)) de l'IQOS à une cigarette électronique et à la cigarette conventionnelle. Ils concluent que de manière très similaire à la fumée de cigarette et aux e-cigs, l'IQOS pourrait augmenter le stress oxydatif et l'inflammation, les infections, le remodelage des voies respiratoires et initier des modifications des voies respiratoires des utilisateurs de ces dispositifs (Sohal et al., 2019).

Des études ont aussi commencé à comparer l'IQOS avec la cigarette 3R4F sur un modèle *in vivo*. Une étude par inhalation nasale (« nose-only ») de 90 jours sur des rats Sprague-Dawley a été réalisée en combinant des approches toxicologiques classiques et systémiques. Ils ont observé que la réduction du volume respiratoire, le degré d'inflammation pulmonaire, et les altérations histopathologiques des organes du tractus respiratoire étaient significativement moins prononcés dans les groupes exposés à l'IQOS par rapport aux groupes exposés à la cigarette 3R4F. De plus, des données de transcriptomique obtenues à partir de l'épithélium nasal et du parenchyme pulmonaire ont montré une expression moins prononcée dans les groupes exposés à l'IQOS. Les processus inflammatoires étaient beaucoup plus affectés par la cigarette 3R4F que par l'IQOS (Wong et al., 2016). Une seconde étude confirme les résultats des test d'inflammation mais en comparant l'IQOS avec des heets à la menthe à la cigarette 3R4F (Kogel et al., 2016). Une étude récente a utilisé le modèle de souris ApoE - / - pour étudier l'impact de la fumée de cigarette de référence 3R4F ainsi que de l'aérosol de deux dispositifs de tabac chauffé (TEEPS et l'IQOS) sur le système cardiorespiratoire pendant une période de 6 mois. Une approche de toxicologie des systèmes combinant la physiologie, l'histologie et des mesures moléculaires a été utilisée pour évaluer l'impact des aérosols des 2 dispositifs par rapport à la cigarette conventionnelle. Les aérosols TEEPS et d'IQOS, 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 des aérosols des deux dispositifs par rapport à la cigarette (Phillips et al., 2019).

Le problème de ces études est le même que pour les études *in vitro*, l'ensemble des recherches *in vivo* effectuées ont été réalisées par l'industrie du tabac chauffé elle-même.

Ainsi, les articles cités ont montré que l'aérosol d'IQOS contenait des quantités en composés moins importantes et provoquait des effets toxicologiques réduits en étude *in*

*vitro* et *in vivo* par rapport à la cigarette 3R4F. En outre, quasiment aucune étude ne compare la cigarette 3R4F, l'IQOS et les e-cigs, c'est pour cela que l'étude menée dans la suite du rapport est originale et intéressante.

## 2. Matériel et méthode

### 2.1. Les profils de vapotage ou fumage

Afin de standardiser les expérimentations sur cigarette, des profils de fumage 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) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ces profils varient en termes de durée d'inspiration ainsi qu'en volume et fréquence de bouffée. Dans cette étude, 2 profils ont été choisis (Tableau 1). D'une part, le profil de la norme ISO3308 (Bouffée de 35 mL en 2 seconde toute les minutes), d'autre part, le profil Health Canada Intense (ou HCI : Bouffée de 55mL en 2 seconde toute les 30 secondes). Le profil HCI ajoute en plus le fait que le filtre des cigarettes 3R4F doit être bouché sur sa circonférence (Health Canada, 2000).

Tableau 1 : Profils de fumage utilisés

Profil	Volume bouffée	Intervalle entre les bouffées	Temps aspiration	Autre
ISO	35 mL	1 min	2sec	—
HCI	55 mL	30 sec	2sec	Filtre bouché sur la circonférence (uniquement pour la cigarette 3R4F)

### 2.2. Cigarette 3R4F

La cigarette 3R4F produite par l'Université du Kentucky 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 utilisé depuis 2006. La physico-chimie des fumées a été caractérisé à de nombreuses reprises dans la littérature (Eldridge et al., 2015).

### 2.3. Les cigarettes électroniques et e-liquide

Deux types d'e-cig (Figure 2) et 1 liquide de la marque NHOSS® (Innova SAS, Bondues, France) ont été utilisés dans cette étude. D'une part, une e-cig de deuxième génération avec une puissance de 4,6 W de la marque NHOSS® contenant une résistance de 2,8  $\Omega$  et une alimentation de 3,6 V, classiquement appelée « Lounge » et une e-cig de troisième génération de la marque NHOSS® communément appelée « Mod Box ». La puissance de cette dernière pouvant être modulée, elle sera utilisée à faible et forte puissance, respectivement 18W et 30W. D'autre part, le e-liquide utilisé est saveur tabac blond à 16 mg.mL<sup>-1</sup> de nicotine, il fait partie des best-sellers de la marque (Figure 1).



Figure 1 : Modèle Lounge (A) et Modèle Mod Box Nhoss (B) e-liquide tabac blond 16 mg/mL de nicotine (C)

### 2.4. L'IQOS

L'IQOS ou « *I quit ordinary smoking* » regroupe trois composants () : un support (A), un chargeur de poche (B) et les heets ou sticks de tabac chauffé (C). Le chargeur de poche permet de charger le support. Le support est un système électronique alimenté par batterie qui chauffe le tabac. Ce procédé est réalisé via une lame chauffante, qui agit à la fois comme source de chaleur et capteur de température. Une fois allumée, la lame chauffante chauffe le tabac à une température maximale de 350°C (la majorité du tabac est chauffée à une température inférieure à 250 ° C). Les heets (C) 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).

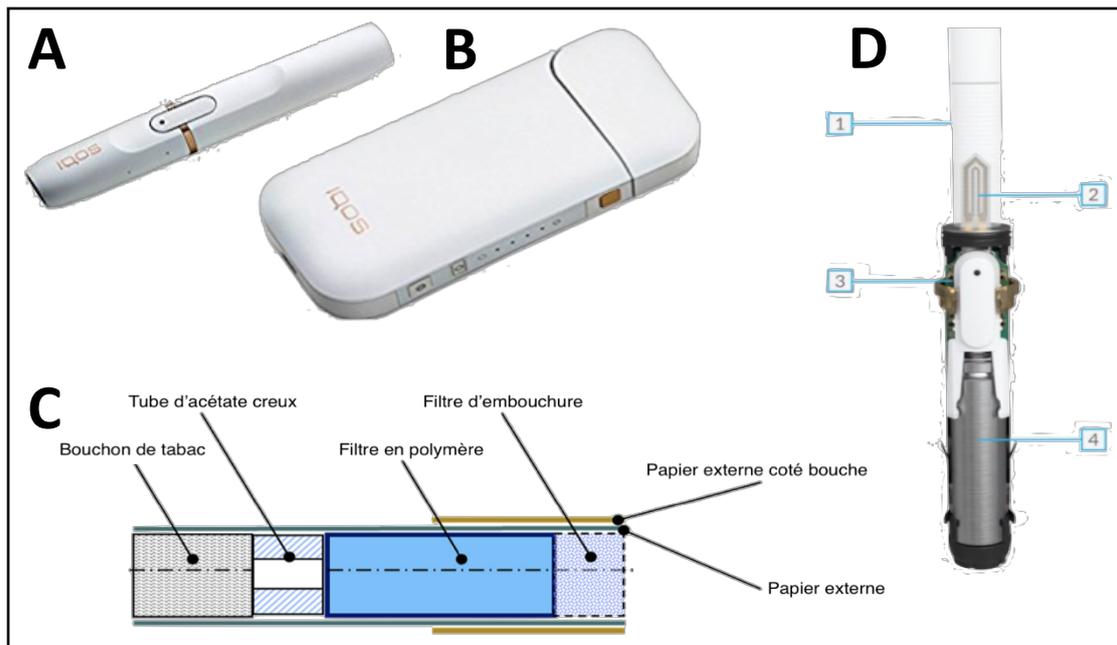


Figure 2 : IQOS, système de tabac chauffé

(A) Support (B) Chargeur de poche (C) 1- l'unité de tabac chauffé 2- Lame chauffante 3- bouton d'alimentation 4- La batterie (D'après Philip Morris International Management SA, s. d.) (D) Schéma d'un stick de tabac chauffé (Adapté de Smith et al., 2016)

## 2.5. Machine à fumer

Les fumées et les aérosols ont été prélevés par la machine à fumer VC1 de Vitrocell®. 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 programmes de fumage. En effet, le volume, la durée et la fréquence des bouffées ainsi que la durée d'expiration peuvent être modifiés afin de correspondre aux profils de fumage ISO et HCI utilisés dans l'étude. 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 modèle de cigarette sont utilisés pour éviter toutes contaminations entre eux.

Cette machine s'accompagne d'un module permettant l'exposition de cultures cellulaires à la fumée de cigarettes ou aux aérosols d'e-cig ou de tabac chauffé (Figure 3).

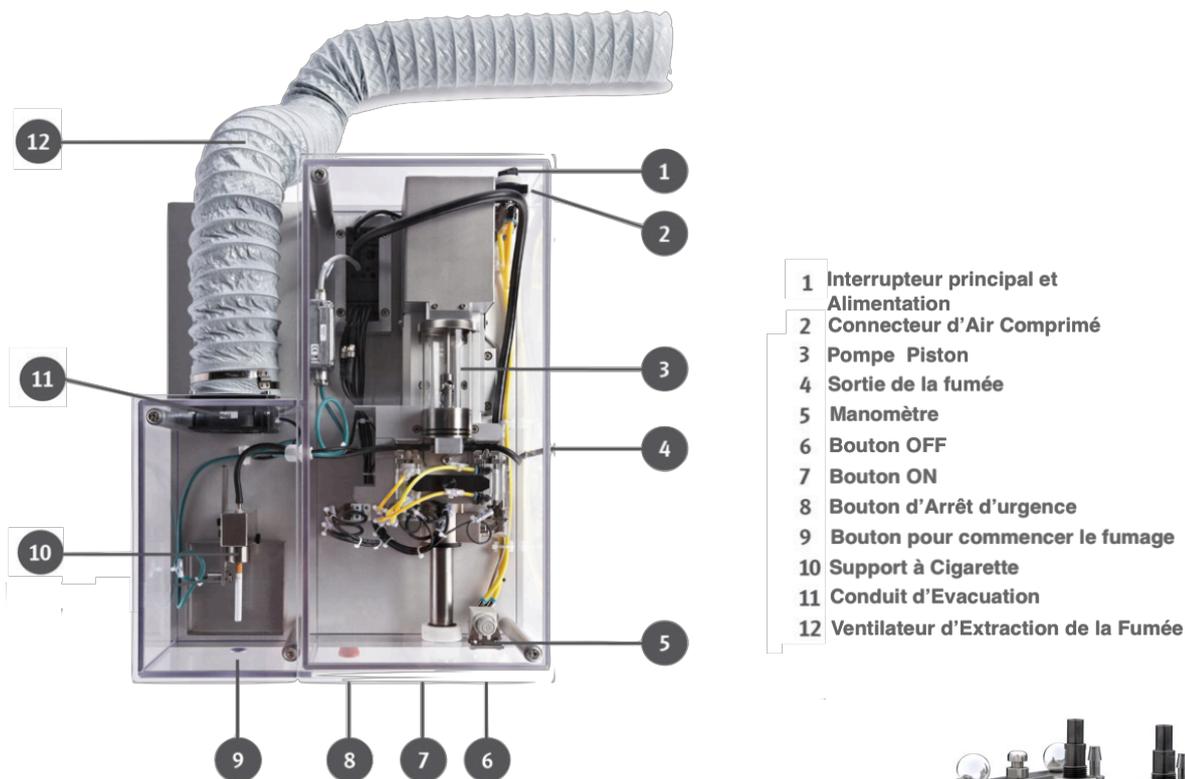


Figure 3 : Machine à fumer VC1 de Vitrocell®

Ce module (Figure 4) est en permanence traversé par un flux d'eau à 37°C pour que les cellules, pendant l'exposition, ne subissent aucun stress lié à la température. Une pompe crée une aspiration identique et constante de 5 mL.min<sup>-1</sup> dans chaque puits lors des expositions.



Figure 4 : Module d'exposition aux fumées de cigarette ou aux aérosols (Vitrocell systems, s. d.-b)

## 2.6. Prélèvement et analyse des composés carbonylés

Les composés carbonylés sont capturés par des cartouches de silice cotées avec du 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Sep-Pak XPoSure Plus Short/ Long Cartridge 350 mg/ 800 mg, Waters, Guyancourt, France) (Figure 5). Des petites cartouches sont utilisées pour les e-cig et des grandes pour la 3R4F et l'IQOS. Les cartouches sont branchées par 2 en série, une cartouche de prélèvement et une de garde, afin de vérifier que les composés ne sont pas passés outre la première cartouche. Les prélèvements sont réalisés en quadruplicats sur des cartouches provenant du même lot. Un nouveau blanc, issu de la moyenne de 6 cartouches non-exposées, est réalisé à chaque changement de lot.



Figure 5 : Cartouche cotée à la DNPH

## Matériel et méthode

Afin d'extraire les composés retenus dans la cartouche, celle-ci est éluée à l'aide d'une seringue avec 3 ou 6 mL d'acétonitrile en fonction de la taille (petite et grande). La désorption doit être faite à débit faible et constant. La totalité de l'acétonitrile utilisé ne peut être récupérée, c'est pourquoi il est nécessaire de peser les flacons de collecte avant et après l'éluion afin de connaître la quantité exacte d'éluât récupéré. Ensuite, 1 ml de chaque échantillon est filtré et aliquoté dans des flacons afin d'être analysé par une Chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec un détecteur UV (UHPLC UltiMate 3000, Thermo Scientific) (Figure 6). Chaque chromatogramme est ensuite vérifié et réintégré de la même manière afin d'être le plus reproductible possible entre chaque analyse.

Pour le calcul des quantités, toutes les aires sous la courbe sont transformées en concentration via des facteurs de conversion obtenus par l'analyse d'une solution de standard contenant les carbonyles testés à concentration connue.



Figure 6 : Chromatographie liquide haute performance détection UV (HPLC-UV)

## 2.7. Prélèvement et analyse des Hydrocarbures Aromatiques Polycyclique

Le prélèvement des hydrocarbures aromatiques polycycliques a été recueillis à l'aide de 2 barboteurs placés en série, contenant pour le premier 50 mL et le second 25 mL de méthanol réfrigérés à -40 ° C dans un bain d'éthanol-glace carbonique. Les prélèvements sont évaporés puis les HAPs sont extraits du méthanol par extraction accélérée par solvant (ASE). Le solvant utilisé est de l'acétonitrile. Les prélèvements d'e-cig et d'IQOS sont ensuite évaporés afin de concentrer les HAP dans 1 mL d'acétonitrile alors que les extractions de cigarette conventionnelle ne le sont pas car la quantité en HAP est importante. Les échantillons sont dosés par chromatographie liquide haute performance avec un détecteur UV.

## 2.8. Prélèvement et analyse de la nicotine

Le prélèvement de la nicotine a été recueilli en même temps que les HAP par la même technique, c'est à l'aide de 2 barboteurs placés en série, contenant pour le premier 50 mL et le second 25 mL de méthanol réfrigérés à -40 ° C dans un bain d'éthanol-glace carbonique. Les prélèvements de nicotine ont ensuite été envoyés au Centre de Biologie Pathologie du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille (CHRU).

## 2.9. 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 ("BEAS-2B," n.d.). Le milieu utilisé afin qu'elles puissent proliférer est du LHC-9 (Life Technologie, Californie, USA) auquel des antibiotiques à large spectre à 1% sont ajoutés (pénicilline/ streptomycine). Elles sont repiquées toutes les semaines, d'une part, dans une flasque T-75 (Corning, New-York, USA) afin de conserver des cellules en culture pour les futures expériences, d'autre part, dans des plaques 6 puits contenant des inserts comportant des pores de 0,4µm (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pour réaliser les expositions. Les protocoles sont disponibles en Annexe 1.

### 2.9.1. Repiquage

Repiquer des cellules consiste à décoller les cellules de la flasque de culture où elles ont proliféré et de les réensemencer, en quantité moindre, dans une nouvelle flasque de

## Matériel et méthode

culture. Pour cela, un lavage du tapis cellulaire au PBS est réalisé. Puis, la flaque est incubée avec de la trypsine pendant 2 minutes. Après trypsination, les cellules sont comptées au bleu de trypan à l'aide d'une lame de comptage (Cellule de Malassez) afin de pouvoir les réensemencer dans une flasque T-75 avec 1 million de cellules et dans des plaques 6 puits à 75 000 cellules par puits.

### 2.9.2. Préparation des cellules pour les expositions

Pour exposer les cellules, elles sont cultivées en IAL afin que les aérosols soient directement en contact avec les cellules. Les inserts comportent des pores de 0,4 $\mu$ m permettant les échanges entre les cellules et le sous-nageant. Cela permettra aussi de les transférer dans le module d'exposition. Ces inserts se trouvent dans des plaques 6 puits. Tout d'abord, elles sont « coatées » pour que les cellules puissent adhérer. Coater les plaques consiste à incuber les inserts à 37°C avec une solution de collagène à 0,03 mg/mL afin d'obtenir une surface sur laquelle les cellules pourront se fixer. Après cette étape, la partie supérieure de chaque insert est ensemencé avec 75 000 cellules. Ensuite, les plaques sont incubées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> (le milieu sous et sur l'insert sont changés régulièrement). À la confluence, les cellules sont passées en interface air/liquide (Figure 8) afin d'être exposées aux aérosols de cigarettes électroniques ou d'IQOS ou aux fumées de cigarettes.

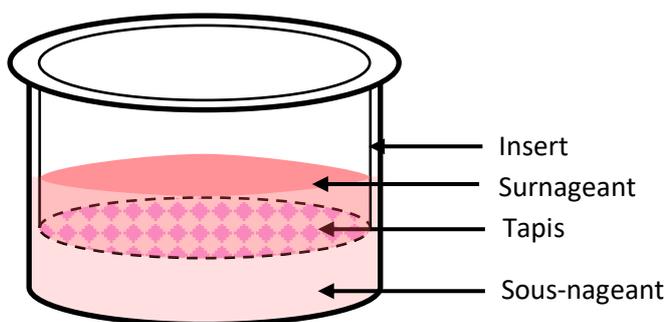


Figure 7 : Schéma d'une culture cellulaire sur insert immergé

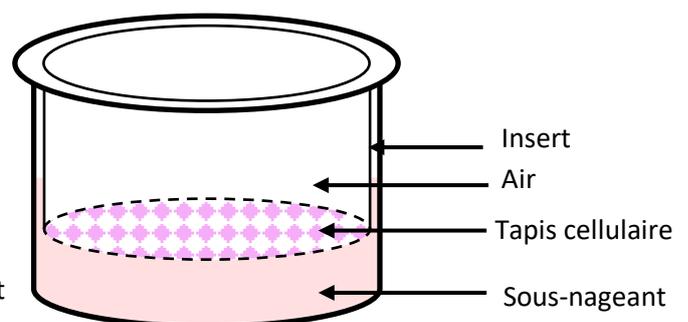


Figure 8 : Schéma d'une culture cellulaire sur insert en interface air/liquide

### 2.9.3. Exposition des cellules aux aérosols

Pour réaliser les expositions, les inserts sont placés dans le module d'exposition, qui est relié à la machine à fumer par des tuyaux et un cylindre de dilution (Figure 9).

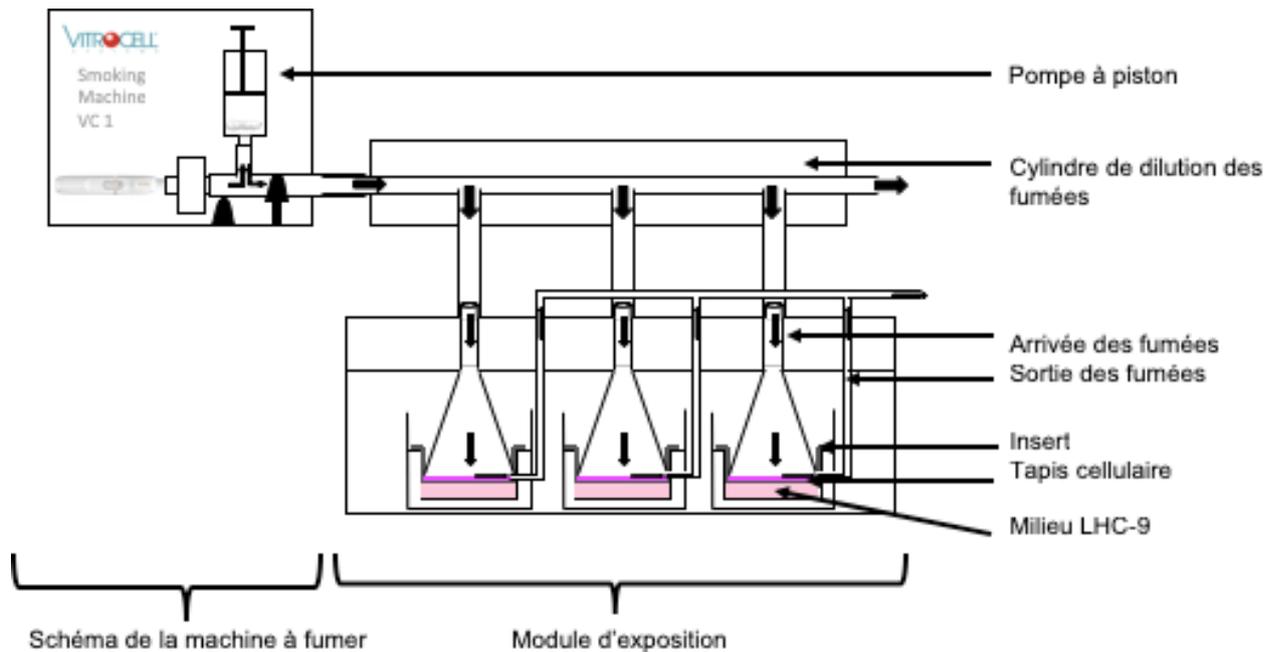


Figure 9 : Schéma du montage d'exposition des cellules BEAS-2B

Suite aux expositions, le sous-nageant des cellules est remplacé par du milieu propre puis les cellules sont incubées 24h. Après l'incubation, le tapis cellulaire est utilisé pour la mesure de l'ATP alors que le sous-nageant est aliquoté et conservé à -20°C pour un dosage de marqueurs d'inflammation. D'autres expositions sont réalisées pour mesurer le stress oxydant par dosage du glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) (Figure 10).

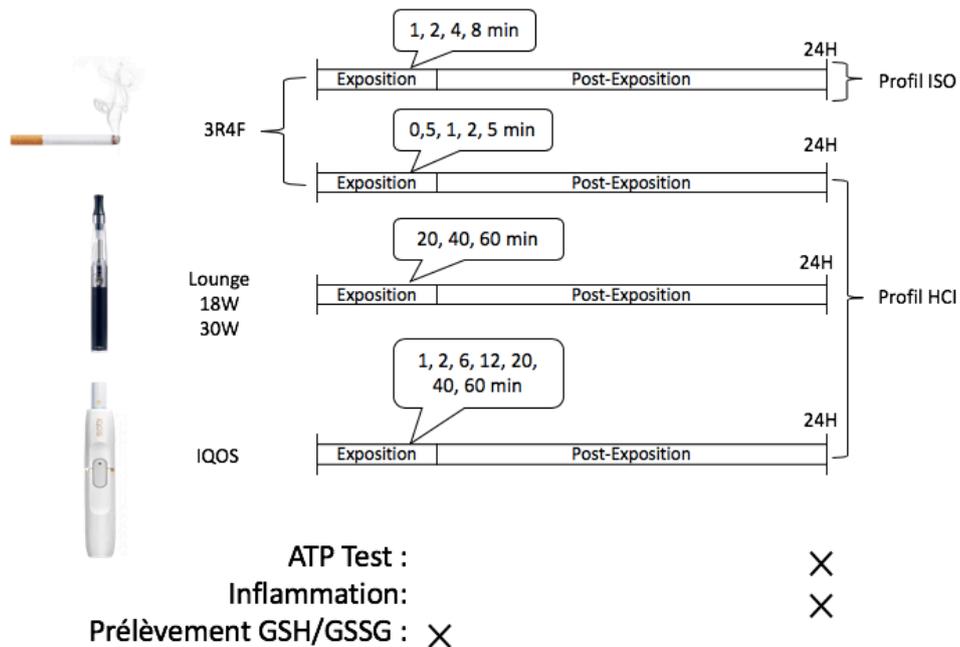


Figure 10 : Protocole d'exposition des différents dispositifs et tests de toxicité réalisés.

Les différents temps d'exposition de chaque dispositif ont été choisis sur la base de données déjà publiées dans la littérature

## 2.10. Tests in vitro

### 2.10.1. Test de viabilité cellulaire : 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 recombinaison en oxyluciferine par la luciférase recombinante. Cette recombinaison va émettre un signal de luminescence dont l'intensité dépendra de 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.). La Figure 11 ci-dessous présente la réaction réalisée par le kit utilisé. Les valeurs de luminescence obtenues sont comparées à celle des contrôles négatifs (cellules non-exposées) afin d'obtenir un pourcentage de viabilité par rapport aux contrôles négatifs.

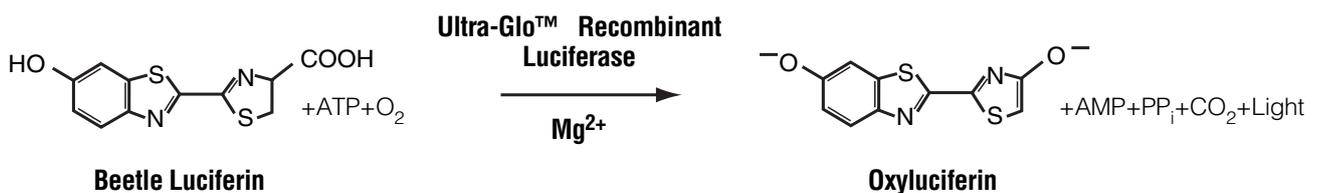


Figure 11 : Réaction du test de mesure de l'ATP

### 2.10.2. Inflammation

Afin d'étudier l'inflammation générée par les fumées et aérosols des différents dispositifs, un dosage de 8 médiateurs de l'inflammation a été dosé sur certains sous-nageants récupérés lors des tests de cytotoxicité. Ces sous-nageants ont été récupérés 24h après la fin des expositions. Les médiateurs dosés sont le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), interféron gamma (IFN $\gamma$ ), oncogène croissance régulé- $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ), Interleukine 6 (IL-6), Interleukine 8 (IL-8), protéine chimioattractante de monocytes 1 (MCP-1), protéine inflammatoire macrophage 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), régulation de l'activation des cellules T normales exprimées et sécrétées (RANTES). Un contrôle positif est réalisé avec 50 $\mu$ g/ml de lipopolysaccharide (LPS) afin d'évaluer la capacité des cellules BEAS-2B à sécréter différents médiateurs.

Pour cela, le kit « MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel » (Millipore Corp., Billerica, MA) a été utilisé. Il est basé sur la technologie Luminex® xMAP®

(Luminex Corp., Austin, TX) capable de réaliser divers tests biologiques grâce à des billes magnétiques fluorescentes connues sous le nom de microsphères MagPlex™ -C. Elles ont deux colorants fluorescents différents permettant, grâce à des concentrations précises, de créer 100 ensembles de perles distinctement colorés, dont chacun est recouvert d'un anticorps de capture spécifique. Après la capture des analytes par les billes, un anticorps de détection est introduit pour permettre à la Streptavidine-Phycoerythrin (PE) de se fixer sur chaque bille ayant fixé un analyte cherché. Le mélange est donc ensuite incubé avec de la Streptavidine PE. Les microsphères sont ensuite passées rapidement à travers un laser qui excite les colorants internes de chaque microsphère. Un second laser excite le colorant fluorescent, la Streptavidine PE. Enfin, chaque microsphère est identifiée individuellement et quantifiée par des capteurs haut-débits.

### 2.10.3. Récupération des échantillons pour étude du stress oxydant (dosages GSH/GSSG)

Le stress oxydant peut être suivi par le dosage et la comparaison du glutathion réduit (GSH) au glutathion oxydé (GSSG). Des cellules BEAS-2B ont été exposées aux fumées et aérosols des différents dispositifs, et directement après les expositions, les cellules sont incubées avec de l'acide métaphosphorique froid à 10%. Après une incubation (4 ° C, 10 min) et une centrifugation (22 000 × g, 15 min, 4 ° C), les surnageants sont transférés dans deux tubes avec 50 µL pour la détermination du GSH et 200 µL pour la détermination du GSSG puis stocké à -80°C. (Kand'ár et al., 2007).

## 2.11. Méthode statistique

Pour la comparaison des dosages de carbonylés des différents dispositifs, la normalité n'étant pas vérifiée, le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique) avec  $p < 0,05$  a été utilisé. Les dosages ont été réalisés en quadrilquats. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism® 7.

Les courbes de cytotoxicité ont été générées dans le logiciel GraphPad Prism® 7 à partir des données moyennes de trois expériences indépendantes. La cytotoxicité a été normalisée à la réponse du contrôle non exposé. Des valeurs de CI 50 (la valeur pour laquelle 50% de cytotoxicité a été observée) ont été générées en utilisant une analyse de régression non linéaire [inhibiteur] vs réponse normalisée (pente variable) pour chaque dispositif utilisé. Les comparaisons des moyennes ont aussi été fait par un test de Mann-Whitney avec  $p < 0,05$ .

## 3. Résultats

### 3.1. Température de l'aérosol

Il est primordial de suivre la température des aérosols générés pendant les expériences afin de réaliser des mesures dans des conditions réalistes de vapotage. Un certain nombre de recherches qui démontraient la présence de composés carbonylés en quantité importante ont été critiquées (Farsalinos et al., 2015) car elles étaient réalisées en conditions extrêmes (durées de, fréquences ou volumes trop élevés...) qui engendraient des températures d'aérosols trop importantes. En conséquence, des recommandations ont été émises par l'Association française de normalisation (AFNOR) sur la température de l'aérosol des e-cig. En effet, il est considéré qu'une température supérieure à 60°C deviendrait désagréable pour le vapoteur ce qui le conduirait à arrêter de vapoter dans ces conditions extrêmes. Donc, afin que les profils utilisés soient pertinents, il est nécessaire que la température ne soit pas supérieure à 60 °C. C'est pourquoi nous avons d'abord réalisés des tests préliminaires en mesurant la température des aérosols générés à l'aide d'une sonde de température branchée à la sortie de chaque dispositif en utilisant le profil le plus intense (norme HCl) de vapotage/fumage (bouffées de 2 sec de 55 mL toutes les 30 sec). Différents temps d'exposition ont été testés : 6 min pour l'IQOS correspondant au temps de l'aérosolisation complète d'un heet, 8 min pour la cigarette 3R4F correspondant au temps de fumage d'une cigarette complète, et enfin 60 min pour les e-cigs correspondant au temps maximum d'utilisation pour les expériences *in vitro* (Figure 12).

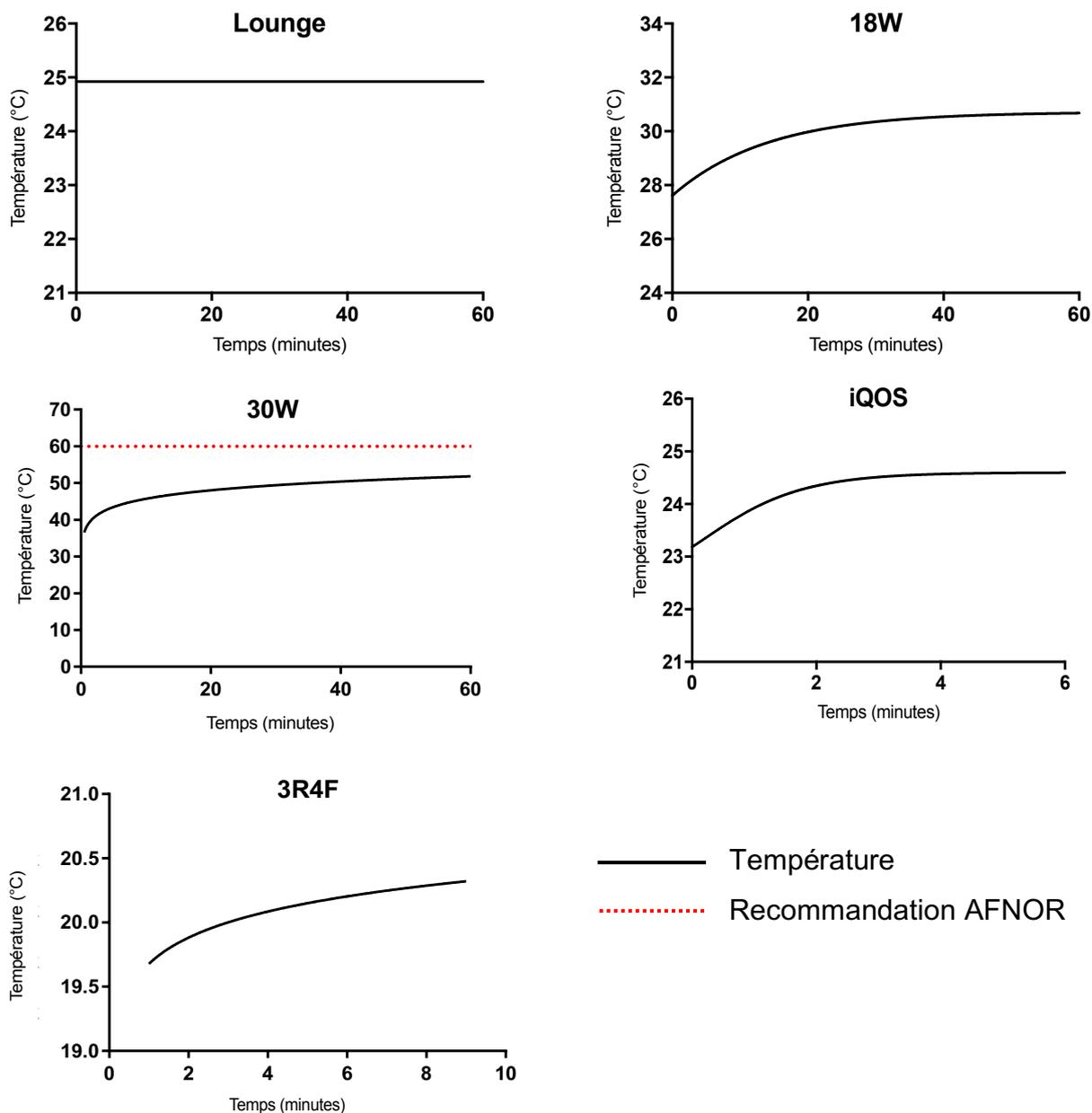


Figure 12 : Test de température des aérosols des différents dispositifs utilisés

On remarque une augmentation de la température des aérosols pendant un certain temps jusqu'à atteindre un plateau pour 3 des dispositifs (Mb 18 et 30W et l'iQOS), à partir de 3min à 24,5°C pour l'iQOS, à partir de 4 minutes à 20°C pour la cigarette 3R4F et à partir 10 minutes à 50°C pour l'e-cig 30W. L'aérosol produit par la lounge a quant à lui une température constante de 25°C. Enfin, la température de la fumée de cigarette conventionnelle augmente au fur et à mesure qu'elle se consume. Aucun ne dépasse la limite de 60°C. De plus, on remarque que la température des aérosols de l'iQOS est relativement similaire à celle de la fumée de cigarette 3R4F, ne dépassant pas les 25°C, alors que la température de l'aérosol de l'e-cig est comprise entre 40 et 50°C. En conclusion

de ces résultats préliminaires, les protocoles utilisés dans cette étude sont donc considérés comme proches de conditions réalistes de vapotage/fumage et donc tout à fait pertinents pour les études physico-chimiques et *in vitro*.

### 3.2. Caractérisation physico-chimique des aérosols et fumées

#### 3.2.1. Dosage des composés carbonylés

Suite aux résultats préliminaires, les prélèvements des carbonylés ont été réalisés sur des cartouches coâtés à la DNPH et les dosages par HPLC ont été réalisés en quadruplicats avec les aérosols/fumées de tous les dispositifs (Annexe 2). Ces prélèvements sont réalisés afin d'identifier et comparer les quantités en composés carbonylés présents. Les quantités par cartouche obtenues sont rapportées en masse par bouffée. La cigarette 3R4F a été testée sur 2 profils afin d'observer l'influence de ce dernier sur les dosages. Les composés les plus toxiques (classé par la FDA) sont représentés ci-dessous (Figure 13).

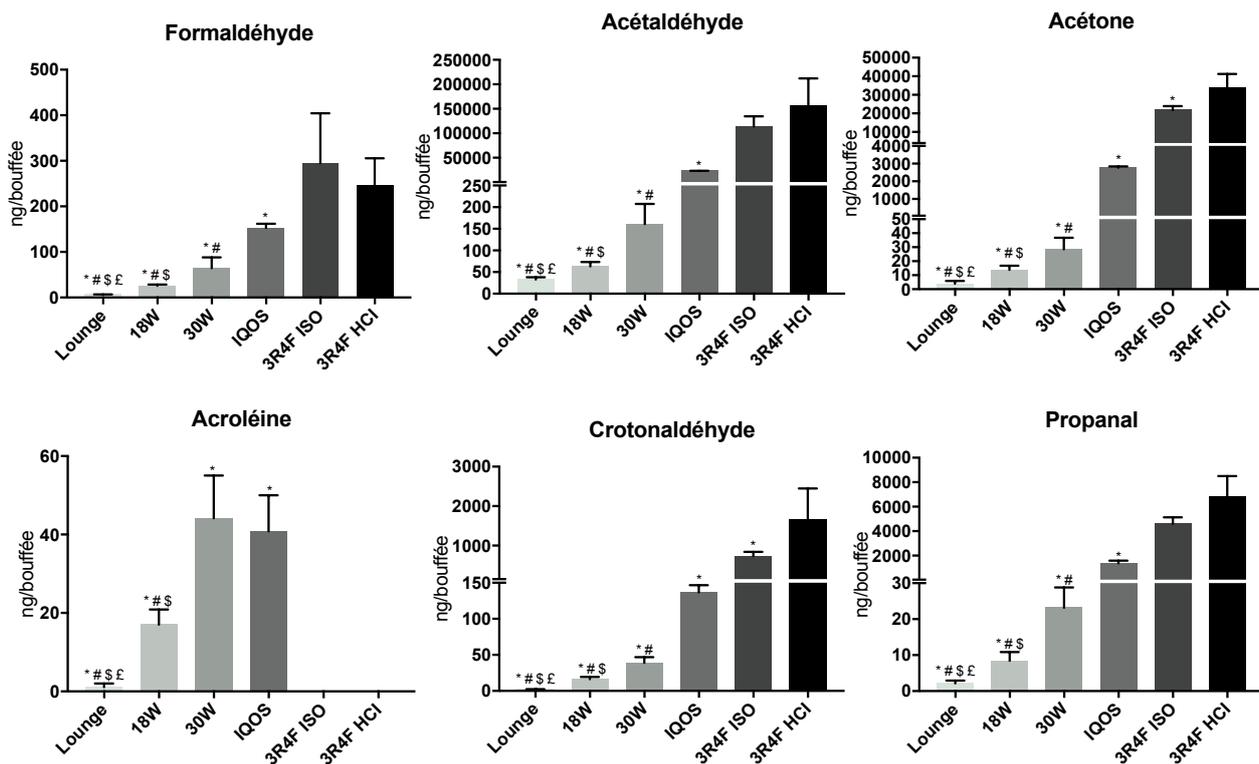


Figure 13 : Dosage des composés carbonylés des e-cigs, IQOS et cigarettes 3R4F

Prélèvement sur cartouches coâtées à la DNPH et élué à acétonitrile. Dosage réalisé par HPLC-UV. Les résultats sont exprimés en ng/bouffée. (\*) différence significative par rapport à la cigarette 3R4F fumée avec le profil HCl ( $p < 0,05$ , Mann Whintney) ; (#) différence significative par rapport à l'IQOS ( $p < 0,05$ , Mann Whintney) ; (\$) différence significative par rapport à l'e-cig 30W ( $p < 0,05$ , Mann Whintney), (£) différence significative par rapport à l'e-cig 18W ( $p < 0,05$ , Mann Whintney).

Les profils pour chaque composé carbonylé sont globalement similaires sauf pour l'acroléine qui est détectée faiblement (20 à 40 ng par bouffée) pour les vapeurs d'e-cig et non détectée pour les fumées de cigarette 3R4F. Pour les autres composés, les e-cigs sont celles avec la quantité par bouffée la plus faible alors que les 2 profils de bouffée de la cigarette 3R4F sont celles avec le plus de composés. L'IQOS a quant à lui des quantités intermédiaires aux deux autres dispositifs. La comparaison des quantités en composés des profils de fumage ISO et HCl de la cigarette 3R4F ne montre aucune différence significative mis à part pour le crotonaldéhyde qui est retrouvé en concentration plus importante pour le profil le plus intense (HCl). De plus, la cigarette 3R4F fumée avec ce profil HCl a des quantités de composés carbonylés significativement plus importantes que tous les autres dispositifs. L'IQOS a lui aussi des quantités toujours significativement supérieures aux e-cigs. L'e-cig 30W a pour sa part des quantités en composés significativement supérieures aux autres e-cigs. Pour les e-cig 18W et lounge, on retrouve aussi des différences significatives. En termes de quantité, les fumées de cigarette 3R4F sont 4 (pour le formaldéhyde) à 1 000 fois (pour l'acétone) plus concentrées en composés carbonylés que dans les aérosols d'e-cigs. Ainsi, pour conclure, 5 des 6 composés classés par la FDA sont présents dans les dosages des fumées de cigarette 3R4F alors que tous sont présents dans les aérosols d'IQOS et d'e-cigs. En revanche, la cigarette 3R4F a des quantités en composés carbonylés plus importante que l'IQOS, lui-même plus importante que dans les e-cigs. Entre les e-cig, on peut observer des concentrations en composés qui augmentent avec la puissance de l'e-cig.

Afin de se rendre compte de la diminution en composés toxiques entre les différents dispositifs, le taux de réduction de leurs quantités en composés carbonylés a été calculé et présenter dans le tableau 1.

*Tableau 2 : Comparaison des quantités en composés carbonylés des différents dispositifs en fonction de la cigarette 3R4F ou de l'IQOS ou de l'e-cig 30W sous le profil HCl.*

Composés Carbonylés	Formaldéhyde	Acétaldéhyde	Propanone	Acroléine	Propanal	Crotonaldéhyde	Total
Taux de réduction de la lounge par rapport à la 3R4F (%)	97,5	99,9	99,9	N.D	99,9	99,8	<b>99,9</b>
Taux de réduction de l'e-cig 18W par rapport à la 3R4F (%)	89,4	99,9	99,9	N.D	99,8	99	<b>99,9</b>

## Résultats

Composés Carbonylés	Formaldéhyde	Acétaldéhyde	Propanone	Acroléine	Propanal	Crotonaldéhyde	Total
<b>Taux de réduction de l'e-cig 30W par rapport à la 3R4F (%)</b>	73,8	99,9	99,9	N.D	99,7	97,7	<b>99,7</b>
<b>Taux de réduction de l'IQOS par rapport à la 3R4F (%)</b>	37,9	85,3	91,8	N.D	79,8	91,8	<b>85,6</b>
<b>Taux de réduction de la lounge par rapport à l'IQOS (%)</b>	96,1	99,9	99,9	97,5	99,9	98,5	<b>99,7</b>
<b>Taux de réduction de l'e-cig 18W par rapport à l'IQOS (%)</b>	83	99,7	99,5	58,5	99,4	88,3	<b>99,3</b>
<b>Taux de réduction de l'e-cig 30W par rapport à l'IQOS (%)</b>	57,7	99,3	99	-8,1	98,3	71,6	<b>98,5</b>
<b>Taux de réduction de la lounge par rapport à l'e-cig 30W (%)</b>	90,8	79,5	86,2	97,7	91,3	94,9	<b>82,6</b>
<b>Taux de réduction de l'e-cig 18W par rapport à l'e-cig 30W (%)</b>	60	60,9	51,6	61,5	63,6	58,5	<b>52,4</b>

La comparaison entre l'IQOS et la cigarette 3R4F montre une réduction en composés carbonylés de plus de 80% pour l'acétaldéhyde, le propanone, le propanal et le crotonaldéhyde. En revanche, pour le formaldéhyde et l'acroléine les résultats sont différents. Le formaldéhyde n'est réduit que de 38% et l'acroléine, n'étant pas détecté dans la cigarette 3R4F, la comparaison ne peut être faite. Pour la comparaison entre l'e-cig 30W et la cigarette 3R4F, la réduction est plus importante qu'avec l'IQOS. En effet, la réduction est de 97,7% à 99,9% pour l'acétaldéhyde, le propanone, le propanal et le crotonaldéhyde. La réduction en formaldéhyde est aussi moins importante (73,8%) et celle en acroléine ne peut pas être déterminée. D'autre part, on remarque qu'il y a une réduction de 98 à 99,3% des quantités d'acétaldéhyde, de propanone et de propanal dans les vapeurs de l'e-cig 30W par rapport aux aérosols de l'IQOS. Pour le formaldéhyde et le crotonaldéhyde cette réduction est un peu plus faible (57,7 et 71%). En revanche pour l'acroléine la quantité est supérieure dans les aérosols d'e-cig. Enfin, il y a une réduction de 51,6 à 63% en composés carbonylés en diminuant la puissance de l'e-cig de 30W à 18W. Ainsi, on remarque que les e-cigs produisent moins de composés carbonylés que l'IQOS, qui en produit moins que la cigarette 3R4F.

### 3.2.2. Dosages des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Les prélèvements sur barboteur et les dosages par HPLC des hydrocarbures aromatiques polycycliques ont été réalisés en quadruplicats avec les aérosols/fumées de tous les dispositifs. Ces prélèvements sont réalisés afin d'identifier et comparer les quantités en HAP présents. Les quantités obtenues par barboteur sont rapportées en masse par bouffée (Annexe 4). Les composés les plus toxiques (classé 1 et 2A au CIRC) sont représentés ci-dessous (Figure 14).

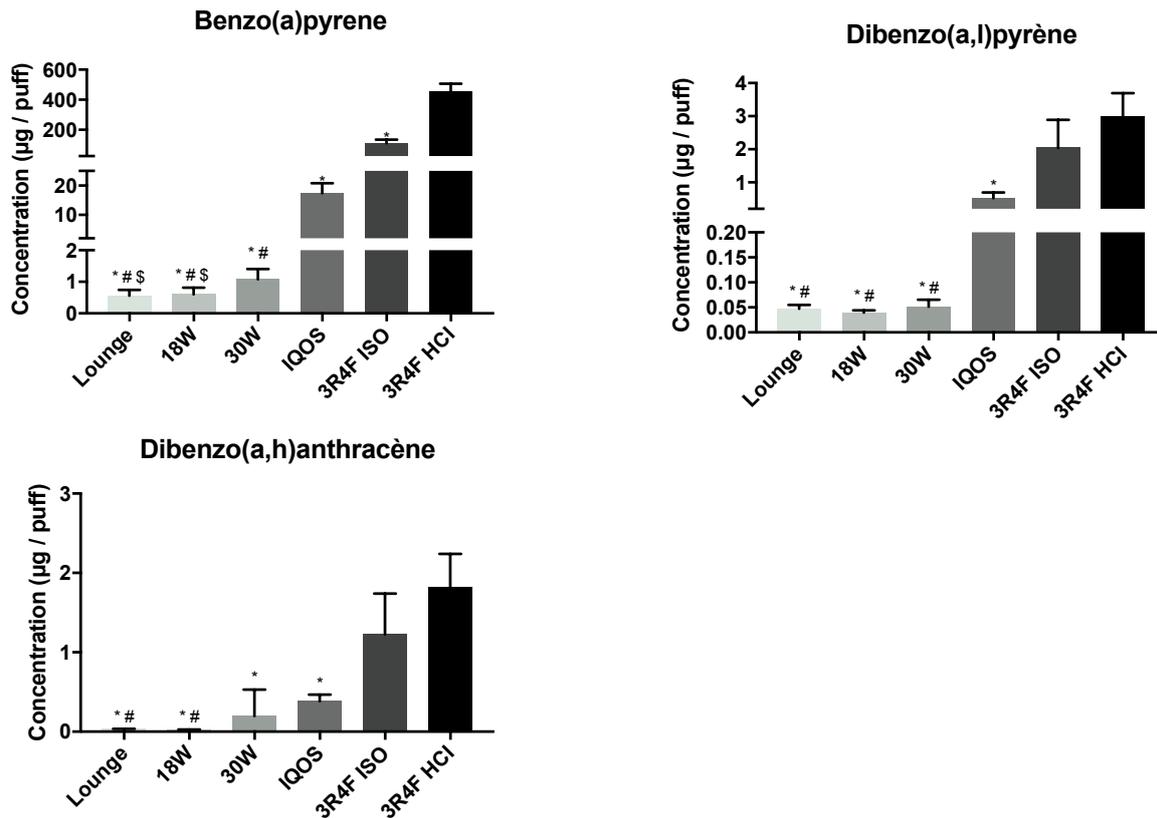


Figure 14 : Dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques des e-cigs, IQOS et cigarettes 3R4F Prélèvement dans barboteur par bullage dans du méthanol. Dosage réalisé par HPLC-UV. Les résultats sont exprimés en µg/bouffée. (\*) différence significative par rapport à la cigarette 3R4F fumée avec le profil HCl ( $p < 0,05$ , Mann Whihtney) ; (#) différence significative par rapport à l'IQOS ( $p < 0,05$ , Mann Whihtney) ; (\$) différence significative par rapport à l'e-cig 30W ( $p < 0,05$ , Mann Whihtney)

Les profils pour chaque HAP sont similaires. Les e-cigs sont celles avec la quantité par bouffée la plus faible et la cigarette 3R4F avec un profil de bouffée HCl est celui avec la plus de composés par bouffée. L'IQOS à quant à lui des quantités intermédiaires aux autres dispositifs. La comparaison des quantités en composés des profils de bouffée ISO et HCl de la cigarette 3R4F ne montre aucune différence significative mis à part pour le dibenzo(a,h)anthracène qui est retrouvé en concentration plus importante pour le profil le

plus intense (HCl). De plus, la cigarette 3R4F fumée avec ce profil HCl a des quantités d'HAP qui sont significativement plus importantes que tous les autres dispositifs pour tous les composés. Pour l'e-cig 30W on observe des quantités en composés significativement supérieures aux autres e-cigs pour le benzo(a)pyrène. Pour les e-cig 18W et lounge, on ne retrouve aucunes différences significatives entre elles. Ainsi, pour conclure, la cigarette 3R4F a des quantités en HAP plus importante que l'IQOS, lui-même plus importante que dans les e-cigs. Entre les modèles d'e-cig, seul l'e-cig 30W se distingue des 2 autres par une quantité légèrement supérieure.

Afin de se rendre compte de la diminution en composés toxiques entre les différents dispositifs, le taux de réduction des quantités d'HAPs totaux a été calculé et est présenté dans le Tableau 2.

Tableau 3 : Taux de réduction en HAP totaux entre les différents dispositifs

Hydrocarbures Aromatiques Polycyclique	Benzo(a)pyrène	Dibenzo(a,l)pyrène	Dibenzo(a,h)anthracène	Total
Taux de réduction de la <b>lounge</b> par rapport à la <b>3R4F</b> (%)	<b>99,9</b>	<b>91,2</b>	<b>99,9</b>	<b>99,4</b>
Taux de réduction de l' <b>e-cig 18W</b> par rapport à la <b>3R4F</b> (%)	<b>99,9</b>	<b>93</b>	<b>99,9</b>	<b>99,1</b>
Taux de réduction de l' <b>e-cig 30W</b> par rapport à la <b>3R4F</b> (%)	<b>99,8</b>	<b>91,2</b>	<b>99,5</b>	<b>99</b>
Taux de réduction de l' <b>IQOS</b> par rapport à la <b>3R4F</b> (%)	<b>94,4</b>	<b>40,4</b>	<b>97,8</b>	<b>96,6</b>
Taux de réduction de la <b>lounge</b> par rapport à l' <b>IQOS</b> (%)	<b>97,8</b>	<b>85,3</b>	<b>96,4</b>	<b>83</b>
Taux de réduction de l' <b>e-cig 18W</b> par rapport à l' <b>IQOS</b> (%)	<b>97,7</b>	<b>88,2</b>	<b>97,6</b>	<b>72,4</b>
Taux de réduction de l' <b>e-cig 30W</b> par rapport à l' <b>IQOS</b> (%)	<b>95,8</b>	<b>85,3</b>	<b>76,2</b>	<b>69,7</b>
Taux de réduction de la <b>lounge</b> par rapport à l' <b>e-cig 30W</b> (%)	<b>48,1</b>	<b>0</b>	<b>85,0</b>	<b>40,1</b>
Taux de réduction de l' <b>e-cig 18W</b> par rapport à l' <b>e-cig 30W</b> (%)	<b>44,4</b>	<b>20</b>	<b>90</b>	<b>9,2</b>

En comparant les e-cigs à la cigarette 3R4F, on remarque une diminution de 99% des HAP pour tous les modèles. Pour l'IQOS la diminution est tout aussi importante avec presque 97% de diminution en composés. Malgré un faible écart de diminution entre les e-cigs et l'IQOS, il y a une diminution allant de 70 à 83% en fonction du modèle. Enfin, en comparant les différents modèles d'e-cigs entre eux, le modèle 18W à une diminution de 9% par rapport à la 30W alors que la lounge diminue de 40%. Ainsi, on remarque que les e-cigs produisent moins d'HAP que l'IQOS, qui en produit moins que la cigarette 3R4F.

### 3.2.1. Dosage de la nicotine

Sur les mêmes prélèvements que les HAPs, le dosage de la nicotine a été réalisé afin de comparer la quantité produite par les différents dispositifs (Figure 15).

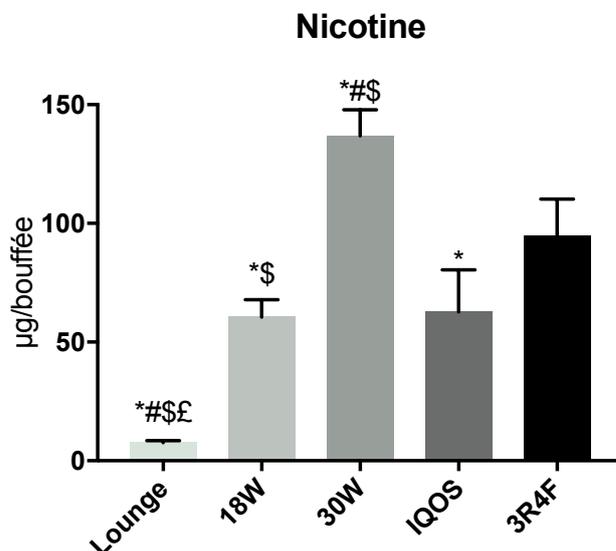


Figure 15 : Concentration en nicotine des différents dispositifs (en µg/bouffée)

Les résultats sont exprimés en µg/bouffée. (\*) différence significative par rapport à la cigarette 3R4F fumée avec le profil HCl ( $p < 0,05$ , Mann Whittney) ; (#) différence significative par rapport à l'IQOS ( $p < 0,05$ , Mann Whittney) ; (\$) différence significative par rapport à l'e-cig 30W ( $p < 0,05$ , Mann Whittney)

La quantité en nicotine produite par les e-cigs augmente en fonction de la puissance de l'e-cig. En effet, on remarque que la quantité retrouvée dans l'aérosol de la ModBox 30W est significativement supérieure à la 18 W et la lounge (respectivement 2,3 et 18 fois) ainsi qu'aux autres dispositifs. La nicotine présente dans la vapeur de la lounge est significativement inférieure (8 à 18 fois) à tous les dispositifs. L'IQOS est quant à elle semblable à ce qui est retrouvé dans l'e-cig 18W (facteur 1) mais significativement inférieur à l'e-cig 30W (2 fois moins important) ainsi qu'à la cigarette 3R4F (1,5 fois moins important). Enfin la quantité en nicotine produite par la cigarette 3R4F est significativement plus importante que tous les dispositifs mis à part l'e-cig 30W qui est 1,4 fois plus élevé. Sachant qu'un vapoteur va réguler son vapotage en fonction de la nicotine qu'il absorbe, il apparaît intéressant de normaliser les résultats précédents de concentrations en composés chimiques par la quantité de nicotine (Figure 16).

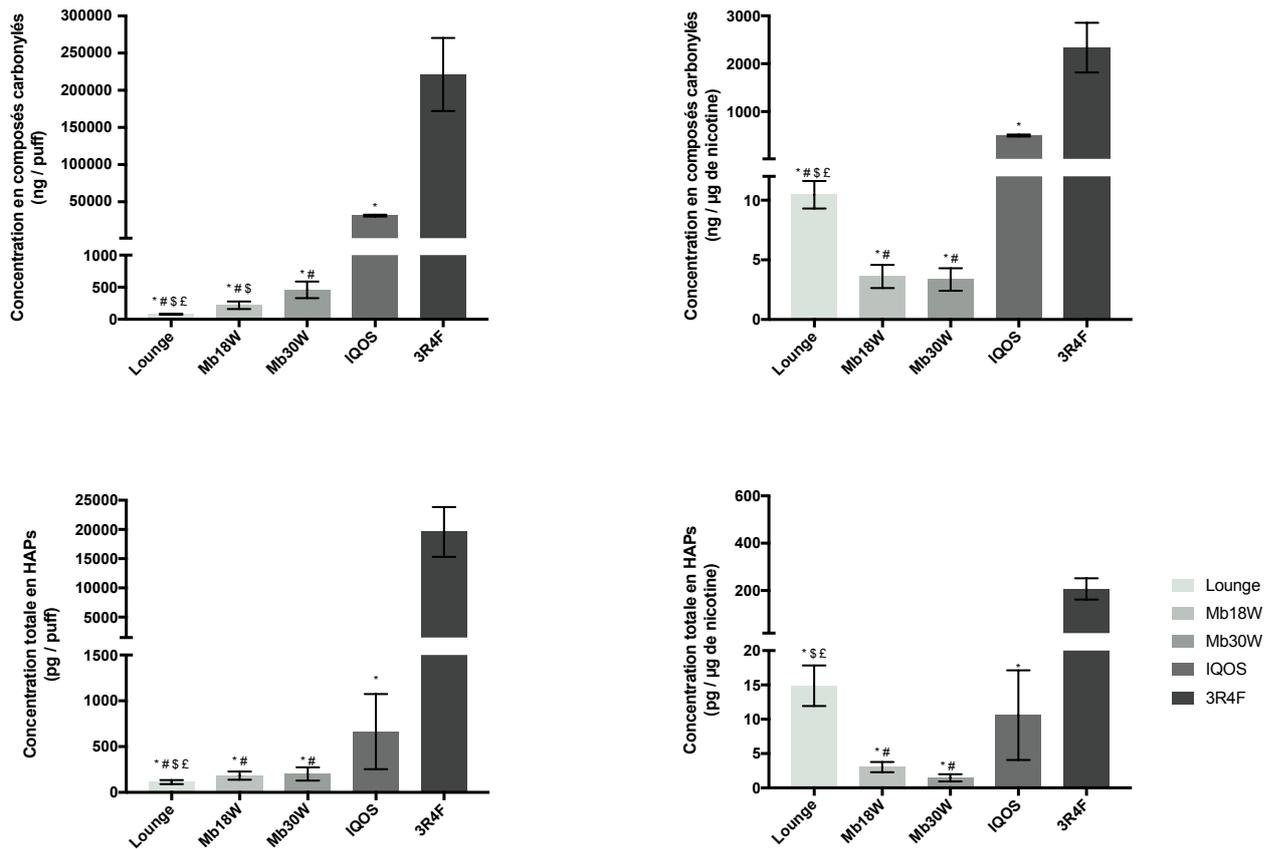


Figure 16 : Quantités totales en composés carbonylés et HAPs par bouffée et par µg de nicotine

(\*) différence significative par rapport à la cigarette 3R4F fumée avec le profil HCl ( $p < 0,05$ , Mann Wihntney) ; (#) différence significative par rapport à l'IQOS ( $p < 0,05$ , Mann Wihntney) ; (\$) différence significative par rapport à l'e-cig 30W ( $p < 0,05$ , Mann Wihntney)

Lorsque les résultats sont exprimés en masse de composés/bouffée, les tendances pour les composés carbonylés et pour les HAPs sont similaires : la cigarette 3R4F est celle produisant le plus de composés (respectivement 220 000 ng/puff et 19 500 pg/pff) suivie ensuite de l'IQOS et enfin les e-cig. En revanche quand on exprime les concentrations en fonction de la quantité de nicotine produite par bouffée, les tendances changent. En effet, on remarque que la quantité en composés produits par la lounge devient plus importante que celle produite par les autres e-cig pour les composés carbonylés (facteur de 2,9 par rapport à la Modbox 18W contre 0,4 avant normalisation et un facteur de 3 par rapport à la Modbox 30W contre 0,2 avant normalisation) et les HAPs (facteur de 4,9 par rapport à la Modbox 18W contre 0,6 avant normalisation et un facteur de 10 par rapport à la Modbox 30W contre 0,5 avant normalisation) et du même ordre de grandeur aux quantités en HAPs de l'IQOS (passage d'un facteur à 0,2 à 1,4). La cigarette 3R4F reste tout de même celle produisant le plus de composés.

### 3.3. Test de toxicité *in vitro*

#### 3.3.1. Test de viabilité cellulaire

Après avoir réalisé la caractérisation physico-chimique dans les vapeurs ou fumées, des cultures de cellules BEAS-2B ont été exposées à des aérosols/fumées d'e-cig, d'IQOS et de cigarettes 3R4F non dilués et dilués afin d'en évaluer leur toxicité aiguë par mesure de la viabilité cellulaire. Les fumées sont dites « non diluées » car la fumée n'est pas entraînée par un flux d'air qui la dilue (Bishop et al., 2018). Dans un premier temps, des tests ont été effectués sans et avec dilution (0,5 et 1L/min) sur la cigarette 3R4F et l'IQOS (Figure 17)

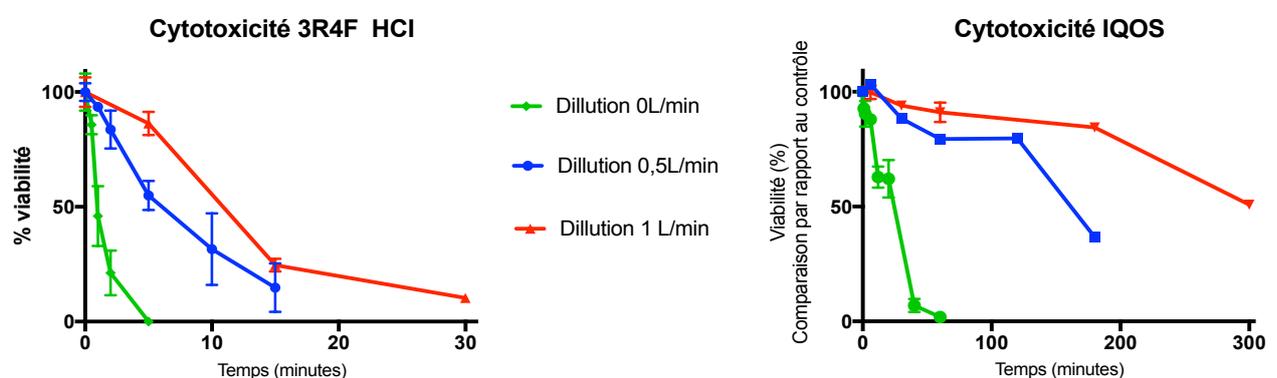


Figure 17 : Test de dilution des aérosols

Ces tests ont montré qu'au plus on augmente la dilution, au plus la toxicité arrive tardivement. Nous avons choisi d'utiliser le protocole non dilué car il permet d'obtenir des résultats similaires au protocole dilué en moins de temps. De plus, d'après Bishop et al, ce protocole permet d'augmenter la sensibilité des expositions (Bishop et al., 2018).

Afin de varier les doses, les tests ont été faits en fonction de temps d'exposition : 20, 40, 60 min pour les e-cig ; 1, 2, 6, 12, 20, 40, 60 min pour l'IQOS ; pour la cigarette 3R4F, les temps d'exposition ont été choisis par rapport aux données de la littérature qui montrent qu'une toxicité apparaît très rapidement en utilisant un protocole d'exposition non-dilué (Bishop et al., 2018), les temps choisis sont donc les suivants : 1, 2, 4, 8 min pour la 3R4F avec le profil ISO et 0,5, 1, 2, 5 min pour la 3R4F avec le profil HCl. Pour mesurer la viabilité cellulaire, un test ATP est utilisé, il permet une mesure indirecte de l'activité 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 différents temps aux cellules non-exposées (contrôles). Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 18). Une fonction mathématique est intégrée afin d'obtenir une courbe moyenne et la CI50 qui correspond à la valeur pour laquelle 50% de cytotoxicité a été observée de chaque cigarette (Tableau 4).

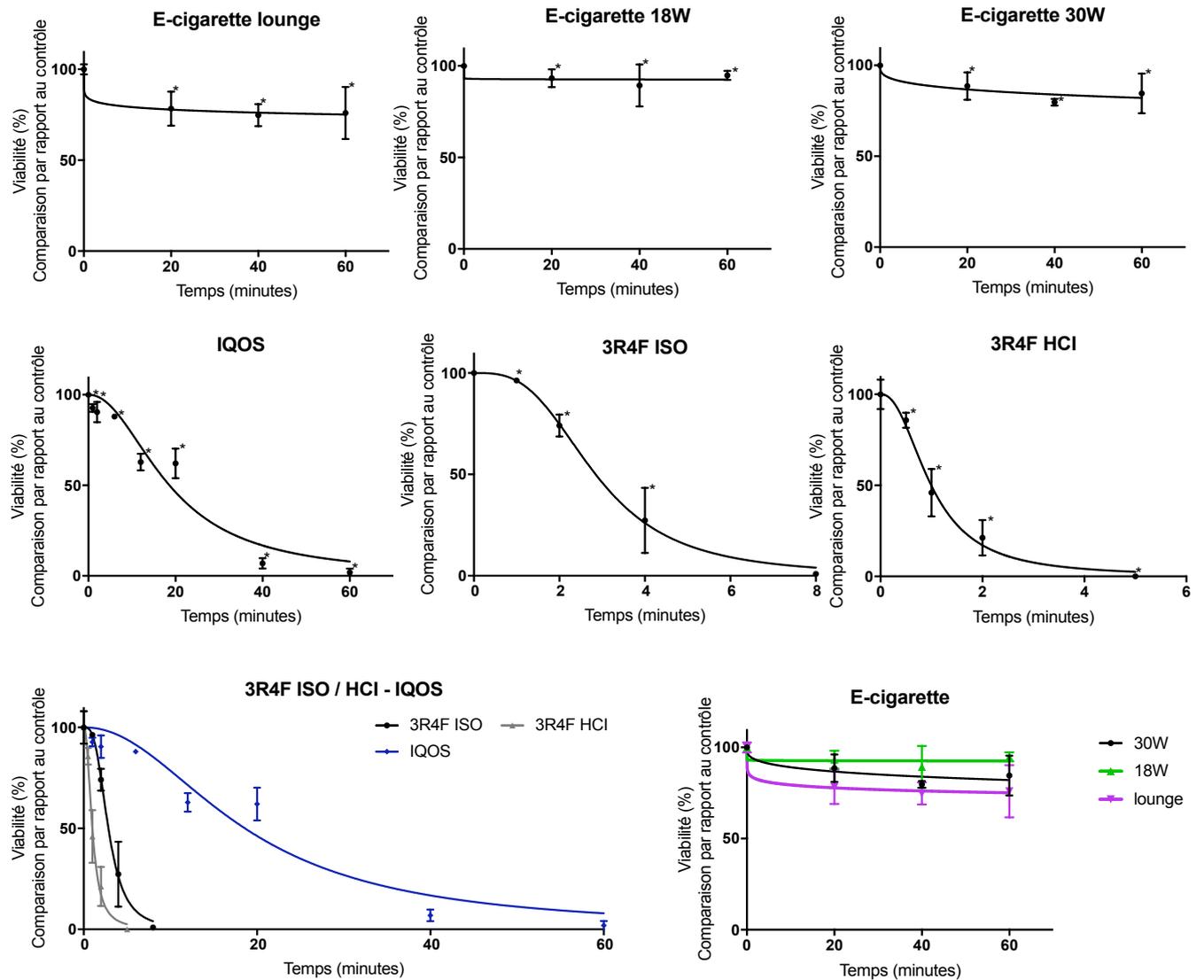


Figure 18 : Courbe de viabilité cellulaire suite à l'exposition des cellules BEAS-2B à l'e-cigarettes, IQOS et cigarettes

Viabilité obtenue par la réalisation d'un test de mesure de l'ATP. Les courbes sont obtenues par une analyse de régression non linéaire [inhibiteur] vs réponse normalisée (pente variable). (\*) différence significative par rapport au contrôle ( $p < 0,05$ , Mann Wihntney)

Tableau 4 : Concentration inhibitrice 50 (CI50) des e-cig, IQOS et cigarette

Les CI50 sont obtenues par une analyse de régression non linéaire [inhibiteur] vs réponse normalisée (pente variable).

	E-cig Lounge	E-cig 18W	E-cig 30W	IQOS	3R4F ISO	3R4F HCl
<b>CI50</b>	> 60 min	> 60 min	> 60 min	18,6 min	2,9 min	1 min

Les e-cigs ont des effets sensiblement identiques avec une faible diminution de viabilité cellulaire observée (réduction de 25 % au maximum pour le modèle Lounge). En revanche, pour l'IQOS et la cigarette 3R4F fumée selon le profil ISO et HCl celle-ci diminue tout au long l'exposition jusqu'à atteindre les 0% après respectivement 60 min, 8 min et 5 min. De

plus, si on compare les CI50, qui est la concentration à laquelle 50% des cellules exposées sont inhibé, plus la CI50 est faible, plus la toxicité cellulaire apparait rapidement. Ainsi la CI50 de l'IQOS est 6,5 fois plus importante que celle de la cigarette 3R4F fumée selon le profil ISO et 18,8 fois plus importante que celle de la 3R4F fumée avec le profil HCl. Une différence est aussi présente entre les profils utilisés pour la cigarette 3R4F avec une CI50 en profil ISO 2,9 fois plus importante qu'avec le profil HCl. La cigarette 3R4F est donc, quel que soit le profil utilisé, plus toxique que l'IQOS qui est lui-même plus toxique que les e-cigs.

### 3.3.2. Mesure de l'inflammation

Afin de se rendre compte des processus inflammatoires provoqués par l'exposition aux différents dispositifs, le dosage de 8 médiateurs de l'inflammation a été réalisé. Les dosages réalisés sont comparés par rapport au niveau basal de ces médiateurs dans les cellules BEAS-2B non-exposées (contrôles négatifs). Des contrôles positifs sont faits par un traitement avec 50 µg/ml de LPS afin d'évaluer la capacité des cellules BEAS-2B à sécréter des médiateurs inflammatoires. Les médiateurs de l'inflammation sécrétés ont été mesurés dans les sous-nageants 24h après une exposition aiguë à un aérosol/fumée. Pour les mesurer, la technologie Luminex® a été utilisée. Des doses non-cytotoxiques ou sub-toxiques ont été choisies pour étudier l'inflammation : 1 et 2 min avec le profils ISO et 30 sec et 1 min avec le profil HCl pour la cigarette 3R4F ; 1, 6 et 20 min pour l'IQOS ; 20, 40 et 60 min pour l'e-cig. Les médiateurs dosés sont GRO- $\alpha$ , IL-6, IL-8 et MCP-1.

Tableau 5 : Dosage de médiateurs de l'inflammatoires

(A) Dosages des médiateurs de l'inflammation des contrôles positifs après traitement avec 50 pg/ml de LPS. (B) Dosage de médiateurs de l'inflammatoires après des expositions aiguës aux vapeurs ou fumées d'e-cig, IQOS et cigarettes 3R4F.

Un niveau inférieur à la limite de quantification (<LOQ) a été observé pour MIP-1 $\alpha$  et RANTES.

Les résultats sont exprimés en pg / mL (A) ou par rapport au niveau trouvé dans les cellules témoins, fixé arbitrairement à une valeur de 1 (A et B). ~ : valeurs inférieures à la limite de détection. Les données représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de trois répliquats biologiques indépendants. Les ratios >1,5 ou <0,66% sont indiqués en gras.

(A)	Unité	GRO $\alpha$	IL-6	IL-8	MCP-1
Contrôle	pg/ml	1111 $\pm$ 266,2	50,2 $\pm$ 22,0	313,5 $\pm$ 49,8	1328,1 $\pm$ 84,3
	pg/ml	9916 $\pm$ 2707	2910 $\pm$ 2010	3285 $\pm$ 1862	6123 $\pm$ 1493
LPS (50µg/ml)	Rapport de concentration par rapport aux contrôles	<b>9,4 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>60,2 <math>\pm</math> 16,8</b>	<b>10,5 <math>\pm</math> 4,4</b>	<b>4,6 <math>\pm</math> 1,4</b>

(B) Temps d'exposition (en minutes)	Viabilité moyenne (%)	GRO $\alpha$	IL-6	IL-8	MCP-1
		Moy $\pm$ Écart-T	Moy $\pm$ Écart-T	Moy $\pm$ Écart-T	Moy $\pm$ Écart-T
E-cig Lounge					
20	78	0,78 $\pm$ 0,20	<b>3,47 <math>\pm</math> 0,44</b>	1,27 $\pm$ 0,76	<b>0,65 <math>\pm</math> 0,12</b>
40	75	0,91 $\pm$ 0,33	<b>4,75 <math>\pm</math> 1,23</b>	1,42 $\pm$ 0,64	<b>0,64 <math>\pm</math> 0,13</b>
60	76	0,69 $\pm$ 0,10	<b>3,60 <math>\pm</math> 1,15</b>	0,99 $\pm$ 0,26	<b>0,61 <math>\pm</math> 0,22</b>
E-cig 18W					
20	93	0,99 $\pm$ 0,03	<b>2,60 <math>\pm</math> 1,36</b>	1,09 $\pm$ 0,18	0,99 $\pm$ 0,01
40	89	0,99 $\pm$ 0,16	<b>4,84 <math>\pm</math> 0,78</b>	1,37 $\pm$ 0,18	0,86 $\pm$ 0,07
60	95	0,84 $\pm$ 0,08	<b>2,29 <math>\pm</math> 0,77</b>	0,99 $\pm$ 0,10	0,77 $\pm$ 0,10
E-cig 30W					
20	89	0,71 $\pm$ 0,20	<b>3,28 <math>\pm</math> 0,48</b>	0,87 $\pm$ 0,12	0,80 $\pm$ 0,15
40	80	<b>0,44 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>2,96 <math>\pm</math> 0,39</b>	<b>0,65 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>0,65 <math>\pm</math> 0,09</b>
60	85	<b>0,38 <math>\pm</math> 0,11</b>	<b>2,42 <math>\pm</math> 0,16</b>	<b>0,57 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>0,63 <math>\pm</math> 0,17</b>
IQOS					
1	93	0,86 $\pm$ 0,05	<b>3,52 <math>\pm</math> 0,28</b>	1,14 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,04
6	88	0,77 $\pm$ 0,15	<b>11,37 <math>\pm</math> 0,52</b>	<b>3,65 <math>\pm</math> 0,27</b>	0,72 $\pm$ 0,13
20	62	<b>0,21 <math>\pm</math> 0,11</b>	0,74 $\pm$ 0,67	1,00 $\pm$ 0,86	<b>0,17 <math>\pm</math> 0,07</b>
3R4F profil ISO					
1	96	0,99 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,25	0,97 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,05
2	73	0,75 $\pm$ 0,17	<b>4,93 <math>\pm</math> 1,06</b>	<b>4,39 <math>\pm</math> 0,95</b>	<b>0,37 <math>\pm</math> 0,07</b>
3R4F profil HCI					
0,5	86	0,78 $\pm$ 0,06	<b>2,13 <math>\pm</math> 0,85</b>	1,40 $\pm$ 0,32	0,73 $\pm$ 0,08
1	46	<b>0,26 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>2,26 <math>\pm</math> 0,86</b>	<b>1,75 <math>\pm</math> 0,84</b>	<b>0,14 <math>\pm</math> 0,04</b>

Suite aux expositions de culture cellulaire au LPS, on remarque que les cellules BEAS-2B sont capables de sécréter les médiateurs inflammatoires testés, en particulier, une induction d'un facteur 60 d'IL-6 et d'un facteur 1 de l'IL-8, témoigne d'une bonne inductibilité d'un état inflammatoire des cellules BEAS-2B par le LPS. Si on s'intéresse ensuite aux différents médiateurs de l'inflammation dosés après expositions aux aérosols/fumées, on remarque que l'IL-6 est augmenté d'au moins un facteur 2,1 pour tous les dispositifs. C'est pour l'aérosol d'IQOS suite à 6 min d'exposition que l'IL-6 a été le plus sécrété (d'un facteur de 11,4 par rapport aux cellules non-exposées). L'IL-8 est également augmentée avec l'IQOS (6 minutes d'exposition) et après 1 et 2 min d'exposition à la fumée de cigarette 3R4F respectivement pour les profils HCI et ISO (d'un facteur 4,4 ou 1,8 selon le profil ISO ou HCI, respectivement) alors qu'après une exposition avec l'e-cig 30W, les quantités se réduisent de plus en plus en fonction du nombre de bouffées. On observe une diminution des sécrétions pour MCP-1. Elles sont diminuées quel que soit le dispositif et de manière plus marquée aux fortes doses d'exposition.

## 4. Discussion

Cette étude s'est intéressée à la caractérisation physico-chimique et à la toxicité cellulaire de 3 dispositifs de sevrage tabagique différents (cigarette électronique Lounge, cigarette électronique ModBox et système de tabac chauffé appelé IQOS) afin de les comparer à la cigarette classique (3R4F).

Tout d'abord, les résultats des dosages des composés carbonylés dans les fumées ou les aérosols des différents dispositifs nous montrent que la cigarette 3R4F est celle qui produit le plus de composés carbonylés. Dans cette étude, les dosages des composés carbonylés pour la cigarette 3R4F ont été faits avec les profils ISO et HCl qui sont les standards utilisés par l'industrie du tabac. Suite aux dosages on remarque que, pour 2 des 6 composés exposés (acétone et crotonaldéhyde), la quantité par bouffée est significativement plus importante pour le profil HCl. Ensuite, les résultats des dosages des HAPs dans les fumées ou les aérosols des différents dispositifs nous montrent que la cigarette 3R4F est celle qui produit le plus d'HAP. Suite aux dosages on remarque que la quantité est significativement plus importante pour le profil HCl pour les 3 composés présentés (Benzo(a)pyrène, Dibenzo(a,l)pyrène, Dibenzo(a,h)anthracène). Ces résultats sont logiques puisque le profil HCl est un profil plus intense avec un volume d'aspiration plus important (55 mL) que pour le profil ISO (35 mL)

Bien que certains e-liquides ne contiennent pas de nicotine, la plupart en contient, et le contenu en nicotine des e-vapeurs est variable. D'après des études effectuées avec une machine à vapotage, une concentration plus élevée de nicotine dans les e-liquides entraîne un rendement plus élevé en nicotine dans les aérosols d'e-cig (Talih et al., 2015). Néanmoins, la nicotine présente dans le e-liquide ne permet pas nécessairement de prédire les expositions systémiques des utilisateurs à la nicotine. D'autres facteurs tels que la puissance de la cigarette électronique, le comportement de l'utilisateur et les modes d'utilisations sont également critiques (National Academies of Sciences et al., 2018). Les dosages de la nicotine réalisés nous permettent d'observer, comme dit précédemment, que la puissance a un rôle important dans la génération de la nicotine. En effet, au plus on augmente la puissance de l'e-cig, avec une concentration en nicotine dans les e-liquides identique, au plus la quantité en nicotine dans les vapeurs d'e-cig est importante. Les études topographiques qui étudient les comportements des vapoteurs montrent que ces derniers vont auto-réguler leur consommation (nombre de bouffée, volume d'aspiration...) en

fonction de la nicotine qu'ils absorbent. Il paraît donc intéressant de normaliser les quantités de contaminants chimiques retrouvées dans les vapeurs par les concentrations en nicotine. On remarque ainsi que l'e-cig lounge est la cigarette électronique qui va exposer les vapoteurs à la plus grande quantité de composés. En effet, étant l'e-cig avec la puissance la plus faible, la quantité en nicotine produite par bouffée sera moindre que les autres e-cigs avec une puissance plus forte. Elle entrainera ainsi une consommation plus importante (plus grand nombre de bouffée) par le vapoteur pour combler ses besoins en nicotine, ce qui aura pour conséquence indirecte une aspiration de plus grandes quantités de composés toxiques.

Pour étudier les effets cellulaires de ces aérosols, une étude *in vitro* a été réalisée en exposant des cellules épithéliales bronchiques humaines (lignée BEAS-2B) aux différentes vapeurs ou fumées. On remarque que la CI50, concentration à laquelle 50% des cellules sont inhibé, avec le profil HCl est 2,8 fois plus faible qu'avec le profils ISO, traduisant une toxicité plus importante lorsqu'un profil intense (HCl) est appliqué. Ces différences de quantité et de toxicité s'expliquent facilement par les différences des 2 profils. Le profil ISO préconise un volume de 35mL alors que le profil HCl augmente ce volume à 55mL ce qui produit donc plus de composés carbonylés et d'HAP par bouffée. De plus, La fréquence est également augmentée entre le profil ISO (1 bouffée par minute) et HCl (1 bouffée toutes les 30 secondes), ce qui peut aussi expliquer l'augmentation de toxicité en profil intense. Pour comparer nos résultats à la littérature, il est important de le faire avec des études ayant utilisées le même protocole de fumée non diluée. Bishop et al. ont testé la toxicité de la cigarette 3R4F sous les profils ISO et HCl en condition non diluée. Les tests ont été réalisés sur des cellules des voies aériennes humaines cultivées en 3D. Des résultats proches ont été obtenus puisque des CI50 de 2,1 min ont été mesurées avec le profil HCl et de 5,2 min avec le profil ISO alors que dans notre étude, les fumées de cigarette 3R4F ont montré une CI50 de 1 min avec le profil HCl et de 2,8 min avec le profil ISO dans le modèle de cellule pulmonaire bronchique BEAS-2B. Dans notre étude, nous mesurons une CI50 2,8 fois plus importante avec le profil ISO par rapport au profil HCl, ce qui est très proche des résultats obtenus par Bishop et al. (ratio de 2,5 entre les 2 profils) (Bishop et al., 2018). Cette petite différence pourrait s'expliquer en particulier par le modèle cellulaire utilisé qui n'est pas le même entre les 2 études.

Pour les autres dispositifs, aucune norme n'est réellement établie concernant l'utilisation du profil ISO ou HCl pour les tests de toxicité. Cependant dans la littérature, c'est souvent le profil HCl qui est utilisé (Farsalinos et al., 2018; Li et al., 2018; Schaller et al.,

2016a) c'est pour cette raison que nous avons testé la toxicité des dispositifs de sevrage avec le profil HCl. En termes de quantité en composés carbonylés, l'IQOS arrive en seconde place des dispositifs. En effet, l'IQOS produit des quantités en composés carbonylés plus faible que la cigarette 3R4F mais plus importante que toutes les e-cigs testées. Bien que la combustion de la cigarette ait été remplacée par un chauffage à 350 °C maximum, cela n'empêche pas ce dispositif de produire des composés toxiques (Carbonylé, HAP,... )(Auer et al., 2017) par pyrolyse (Auer et al., 2017; Davis et al., 2018). Quand on compare la réduction de composés carbonylés par rapport à la cigarette 3R4F, on retrouve des résultats proches de ceux publiés. En effet, les fabricants affirmaient qu'il y avait une diminution de 90% en composés toxiques entre l'IQOS et la cigarette 3R4F (Smith et al., 2016). Ces tests ont aussi été faits par 2 études indépendantes (Farsalinos et al., 2018; Li et al., 2018) qui ont montré une réduction d'au moins 80% des composés carbonylés, ce qui correspond aux résultats obtenus dans notre étude. Cette diminution de la quantité de composés carbonylés par rapport à la cigarette 3R4F se traduit aussi par une diminution de la toxicité de l'IQOS par rapport à la cigarette 3R4F. En effet, la CI50 de la cigarette 3R4F est de 1min alors que pour l'IQOS elle est de 18,6 min. La littérature concernant l'IQOS étant encore très peu documentée, aucune étude indépendante n'a été réalisé sur la toxicité aigüe. En ce qui concerne les travaux réalisés par PMI, ils ont montré que l'IQOS est environ 90% moins toxique que la cigarette 3R4F en toxicité aigüe (Schaller et al., 2016a). Si on se réfère aux résultats que l'on a obtenus, et qu'on l'on compare les CI50 des 2 dispositifs, on trouve une réduction de 95% de la CI50 de la cigarette 3R4F par rapport à l'IQOS. Une comparaison peut aussi être faite par rapport à un autre dispositif de tabac chauffé, produit par British American Tobacco, on remarque que les CI50 sont très proches, en effet ils obtiennent une viabilité de 50% à 24 min alors que nous trouvons une CI50 à 18,6 min (Adamson et al., 2018). Mais ces études se limitent à comparer toxicité de l'IQOS a la cigarette, sans comparaison aux autres dispositifs électroniques de sevrage, c'est toute l'originalité de notre étude qui compare également les données physico-chimiques et de toxicité *in vitro* avec celles obtenues pour des expositions à différents modèles d'e-cig.

Ainsi, les quantités de composés carbonylés générées par les e-cig sont très inférieures à la cigarette 3R4F et l'IQOS (par exemple, le dosage de l'acétaldéhyde d'une cigarette 3R4F est de 155,7 µg/bouffée alors qu'elle diminue à 22,8 µg/bouffée pour l'IQOS et diminue de nouveau pour l'e-cig 30W à 0,16 µg/bouffée). En comparant l'e-cig 30W (qui est celle des 3 e-cigs avec la quantité la plus importante en composés carbonylés) avec l'IQOS et la cigarette 3R4F, on remarque que l'e-cig produit beaucoup moins de composés

que les 2 autres dispositifs. En effet, l'aérosol de l'e-cig 30W contient de 99,9% à 97% de composés carbonylés (acétaldéhyde, propanone, propanal et crotonaldéhyde) en moins par rapport à la cigarette 3R4F. Par rapport à l'IQOS, la diminution reste importante avec une réduction allant de 98% pour l'acétaldéhyde, le propanone et le propanal à une diminution de 71,6% pour le crotonaldéhyde. Si on compare ensuite la même e-cig (modèle MobBox) utilisée avec une puissance différente (18 et 30W), on remarque que quand elle est utilisée avec une puissance de 30W, les quantités en carbonylés sont bien plus importantes. En effet, l'aérosol de l'e-cig 18W contient environ 60% de composés carbonylés en moins que l'e-cig 30W. En revanche, aucun changement significatif n'est observé entre l'e-cig 18W et l'e-cig Lounge qui est également un modèle à faible puissance (4,6W). La différence de concentration en composés retrouvés pour l'e-cig 30W ne se traduit pas par une toxicité aiguë plus importante de l'e-cig 30W. Bishop et al. ont testé, en plus de la cigarette 3R4F, la toxicité d'une e-cig (12W) pour laquelle une CI50 de 30min est obtenue. Dans notre étude, la toxicité la plus importante mesurée avec l'e-cig est de 75% de viabilité après 40 min d'exposition avec l'e-cig Lounge. Ces différences peuvent être dues à plusieurs éléments dans nos protocoles. Tout d'abord, cela peut être dû à la différence de modèle cellulaire utilisé. Puis, dans leur protocole, les arrivées d'air sont fermées au maximum afin de minimiser l'entrée d'air et donc augmenter la production des composés carbonylés alors que dans le protocole de notre étude, les arrivées d'air sont réglées à un flux moyen afin d'être au plus proche de ce qui est fait par les consommateurs. Enfin, cela peut être au e-liquide utilisé. En effet, on sait que certains e-liquides peuvent être plus toxiques que d'autres, d'une part par l'arôme et d'autre part par la quantité en nicotine (Leigh et al., 2016). Dans leur étude, un e-liquide goût mélange de tabac de 18mg/mL a été choisi alors qu'ici, un e-liquide goût tabac blond à 16mg/mL est utilisé (Bishop et al., 2018). Une seconde étude a réalisé des essais de cytotoxicité avec un aérosol non dilué d'e-cig. Ils ont observé une viabilité de 50% à un peu moins de 120 bouffées ce qui équivaut à une CI50 aux alentours des 60 min sur des cellule H292 (Cellules épithéliales pulmonaires d'un adénocarcinome humain). L'e-cig utilisée dans cette étude à une puissance de 5,7W et est utilisée avec un e-liquide goût de tabac mélangé de 18mg/mL. Si on la compare par rapport aux résultats obtenus avec l'e-cig lounge utilisée à une puissance de 4,6W, on remarque que la CI50 de cette dernière est supérieure à 1h et est encore à 76% de viabilité à 60min. Cette différence peut aussi s'expliquer, comme précédemment, par le type de cellule où le liquide utilisé ainsi que la marque et la puissance de l'e-cig (Adamson et al., 2018). Bien qu'une cytotoxicité cellulaire ne soit pas observée entre les différents dispositifs par un test ATP, les impacts au niveau cellulaire peuvent être plus précoces au phénomène de mort cellulaire et pourrait

être par exemple la génération d'un stress oxydant par production d'espèces réactives de l'oxygène ou encore l'induction d'une inflammation cellulaire.

C'est pourquoi nous avons mesuré notamment des médiateurs de l'inflammation et une augmentation de la sécrétion d'IL-6 a été observée pour tous les dispositifs mais à des temps d'exposition différents, traduisant donc une inflammation cellulaire aussi bien pour la cigarette que pour les différents types de dispositifs électroniques de sevrage tabagique. Cette augmentation d'IL-6 a déjà été décrite dans plusieurs articles qui étudient la toxicité des e-cig ou de l'IQOS (Anthérieu et al., 2017; Wu et al., 2014), c'est une réponse pro-inflammatoire à un stress cellulaire. En revanche, quel que soit le protocole d'exposition utilisé, le taux de GRO- $\alpha$  et MCP-1 diminuent dans les cellules BEAS-2B exposées aux différents dispositifs. La régulation négative de l'expression de GRO- $\alpha$  avait également été démontrée après exposition de cellules endothéliales humaines à des condensats de cigarette (Allam et al., 2013). Les auteurs ont montré que cet effet était causé par la nicotine. Une diminution du taux des différents médiateurs de l'inflammation a été mise en évidence dans notre étude aux plus longues expositions. Ces résultats peuvent s'expliquer par la toxicité obtenue (viabilité inférieure à 85%) à ces temps d'exposition. En effet, il a déjà été observé que les cellules épithéliales bronchiques pouvaient répondre de manière biphasique en fonction des concentrations en fumée ou aérosol auxquelles elles sont exposées (Comer et al., 2014): de faibles concentrations en fumée ou aérosol peuvent induire des effets proinflammatoires avec une augmentation de sécrétion en cytokines alors que des concentrations plus importantes peuvent induire des effets immunosuppresseurs avec une diminution du taux de médiateur de l'inflammation (un taux de 3,7 d'IL-8 est obtenu après 6 min d'exposition d'IQOS (88% de viabilité) alors que ce taux diminue à 1 après 20 min où la viabilité cellulaire a diminuée à 62%)

Si on compare l'inflammation provoquée par les différentes e-cig, on remarque que l'e-cig 30W, malgré une très faible cytotoxicité sensiblement identique pour tous les modèles d'e-cig, sécrète ou dérégule plus de médiateurs que les 2 autres e-cigs. En effet, l'e-cig 30W diminue la sécrétion de l'IL-8 et de GRO $\alpha$  alors qu'elle est normale pour les 2 autres e-cigs. Ces résultats de dosages de l'inflammation montrent que quel que soit le dispositif testé, une inflammation peut apparaître dans les cellules. C'est le temps d'exposition nécessaire pour provoquer ces effets inflammatoires qui va changer d'un dispositif à l'autre, avec une inflammation qui apparaîtra rapidement avec la cigarette classique, puis plus tardivement avec l'IQOS et enfin avec les e-cigs. Ces variations peuvent être expliquées non-seulement par les différences de concentrations en composés carbonylés et en HAP dans les aérosols,

mais aussi par la présence d'autres composés potentiellement toxiques. C'est pourquoi des analyses sont en cours pour doser d'autres molécules dans les aérosols : métaux et nitrosamines notamment.

Concernant les dosages des composés carbonylés, on peut noter certaines limites méthodologiques notamment sur le mode de prélèvement et la quantité que les cartouches coatées sont capables de contenir. En effet, les dosages de cigarette 3R4F ont été réalisés sur un prélèvement d'une bouffée contre 2 cigarettes complètes dans certaines publications (Farsalinos et al., 2018). Ces publications utilisent le même principe, la conjugaison des composés carbonylés par la DNPH, mais une technique différente qui utilise des barboteurs contenant un grand volume de DNPH permettant de récolter de grandes quantités en carbonylés. Bien que les quantités retrouvées par les dosages soient proches de ce qui a été retrouvé dans d'autres dosages réalisés avec des barboteurs (Annexe 3), certaines différences apparaissent clairement pour le formaldéhyde et l'acroléine. En effet, le dosage de l'acroléine pose problème sur cartouche puisqu'elle n'est pas correctement dosée pour la cigarette 3R4F. En effet, cette dernière molécule a tendance à se polymériser pour former des dimères ou des trimères d'acroléine, l'analyse en HPLC est alors très difficile car la rétention de ces polymères n'est pas la même. Nous ne pouvons donc pas interpréter les résultats pour ce composé. Un problème est aussi présent sur le dosage du formaldéhyde car si on compare les dosages obtenus pour le formaldéhyde à la littérature (Annexe 3), une différence importante est observée avec des concentrations plus faibles mesurées dans nos travaux. Des ajouts dosés de formaldéhyde ont confirmé les résultats obtenus, de plus, dans notre étude, il s'agit surtout d'avoir une quantification relative de ces composés entre les différents dispositifs, cette sous-évaluation n'est donc pas gênante.

Pour cette étude, des cellules immortalisées des voies aériennes humaines BEAS-2B ont été utilisées. Bien qu'une lignée cellulaire immortalisée soit moins représentative de l'homme qu'une culture cellulaire primaire, elle a l'avantage d'avoir une variabilité moins importante et une culture beaucoup plus simple. En effet, une culture de cellules primaires pose des problèmes quant à l'accessibilité et l'hétérogénéité (age, sexe ...) des donneurs. Il sera tout de même important de compléter ces données en testant ces dispositifs avec d'autres modèles cellulaires pour valider ces premiers résultats. Il serait également intéressant de tester d'autres marques ou arômes d'e-cig et d'autres modèles de tabac chauffé car le mécanisme de chauffage est très différent entre chaque fabricant de tabac chauffé. Les effets de la nicotine peuvent aussi être étudiés plus en détail afin de différencier les effets provoqués par la nicotine des e-liquides en comparaison à l'arôme. De plus, afin

## Discussion

---

de se rendre compte des effets toxiques à long terme, il est impératif de réaliser des études chroniques. C'est dans ce sens que le projet RESPIRE est actuellement en cours dans le laboratoire avec le but d'étudier les mécanismes de toxicité de l'e-cig sur le long-terme dans un modèle murin.

## Conclusion

Ce mémoire a donc permis d'exposer un état de l'art sur le tabagisme et les nouveaux dispositifs électroniques de sevrage tabagique (e-cigarettes et tabac chauffé). Les résultats obtenus pendant mon stage ont permis une comparaison de la composition chimique des aérosols générés ainsi que de leur toxicité cellulaire. Durant ce projet de recherche, la récolte des composés carbonylés et des HAP a été réalisée. L'évaluation de la cytotoxicité et de l'inflammation a pu être faite sur l'ensemble des échantillons, en revanche, pour l'évaluation du stress oxydant, seuls les recueils ont été réalisés et les analyses seront réalisées ultérieurement au laboratoire par des dosages par HPLC- Fluo.

Sur l'ensemble des tests réalisés, les premiers résultats montrent que la cigarette est plus toxique que l'IQOS, lui-même plus toxique que les e-cig. De plus, nous avons montré qu'une même e-cig utilisée à une faible ou une forte puissance pouvait influencer la quantité en composés carbonylés et HAP produite ainsi que la toxicité, ici visible par l'inflammation générée. Le dosage du stress oxydant en cours nous permettra de vérifier les conclusions jusqu'ici obtenues.

Suite à ces résultats, il serait intéressant de tester si ces conclusions se retrouvent avec l'utilisation d'autres modèles cellulaires ou animaux ainsi que de réaliser des tests sur un plus long-terme.

## Bibliographie

- Adamson, J., Jaunky, T., Thorne, D., Gaça, M.D., 2018. Characterisation of the borgwaldt LM4E system for in vitro exposures to undiluted aerosols from next generation tobacco and nicotine products (NGPs). *Food and Chemical Toxicology* 113, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.005>
- Allam, E., Delacruz, K., Ghoneima, A., Sun, J., Windsor, L., 2013. Effects of tobacco on cytokine expression from human endothelial cells. *Oral Diseases* 19, 660–665. <https://doi.org/10.1111/odi.12050>
- Anthérieu, S., Garat, A., Beauval, N., Soyez, M., Allorge, D., Garçon, G., Lo-Guidice, J.-M., 2017. Comparison of cellular and transcriptomic effects between electronic cigarette vapor and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. *Toxicology in Vitro* 45, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.12.015>
- Auer, R., Concha-Lozano, N., Jacot-Sadowski, I., Cornuz, J., Berthet, A., 2017. Heat-Not-Burn Tobacco Cigarettes: Smoke by Any Other Name. *JAMA 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>
- Baskara-Yhuellou, I., 2013. Effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur le profil oxydatif et la sénescence des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4+ 325.
- BEAS-2B [WWW Document], n.d. URL [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-9609.aspx?geo\\_country=fr#characteristics](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., Inaba, Y., Uchiyama, S., Kunugita, N., 2017. Comparison of chemicals in mainstream smoke in heat-not-burn tobacco and combustion cigarettes. *Journal of UOEH* 39, 201–207.
- 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/ijerph11111192>
- 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>
- Bonaldi, C., Andriantafika, F., Chyderiotis, S., Boussac-Zarebska, M., Cao, B., Benmarhnia, T., Gremy, I., 2016. Les décès attribuables au tabagisme en France. Dernières estimations et tendance, Année 2000 à 2013 528–540.
- Buratto, R., Correia, D., Parel, M., Crenna, M., Bilger, M., Debrick, A., 2018. Determination of eight carbonyl compounds in aerosols trapped in phosphate buffer saline solutions to support in vitro assessment studies. *Talanta* 184, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.048>
- Cano, M., Thimmalappula, R., Fujihara, M., Nagai, N., Sporn, M., Wang, A.L., Neufeld, A.H., Biswal, S., Handa, J.T., 2010. Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and Age-related Macular Degeneration. *Vision Research, Mechanisms in Macular Degeneration* 50, 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2009.08.018>

- 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>
- 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>
- Comer, D.M., Elborn, J.S., Ennis, M., 2014. Cigarette smoke, airway epithelial cells and host defence 13.
- Counts, M.E., Morton, M.J., Laffoon, S.W., Cox, R.H., Lipowicz, P.J., 2005. Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41, 185–227. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.12.002>
- Davis, B., Williams, M., Talbot, P., 2018. IQOS: evidence of pyrolysis and release of a toxicant from plastic 9.
- 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.
- 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>
- Eaton, D., Jakaj, B., Forster, M., Nicol, J., Mavropoulou, E., Scott, K., Liu, C., McAdam, K., Murphy, J., Proctor, C.J., 2018. Assessment of tobacco heating product THP1.0. Part 2: Product design, operation and thermophysical characterisation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 93, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.09.009>
- 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>
- 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., 2018. Carbonyl emissions from a novel heated tobacco product (IQOS): comparison with an e-cigarette and a tobacco cigarette. *Addiction*. <https://doi.org/10.1111/add.14365>
- Flouris, A.D., Chorti, M.S., Poulianiti, K.P., Jamurtas, A.Z., Kostikas, K., Tzatzarakis, M.N., Wallace Hayes, A., Tsatsakis, A.M., Koutedakis, Y., 2013. Acute impact of active and passive electronic cigarette smoking on serum cotinine and lung function. *Inhalation Toxicology* 25, 91–101. <https://doi.org/10.3109/08958378.2012.758197>
- 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).
- Forster, M., Fiebelkorn, S., Yurteri, C., Mariner, D., Liu, C., Wright, C., McAdam, K., Murphy, J., Proctor, C., 2018. Assessment of novel tobacco heating product THP1.0. Part 3: Comprehensive chemical characterisation of harmful and potentially harmful aerosol emissions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 93, 14–33. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.10.006>
- Fujioka, K., Shibamoto, T., 2006. Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke. *Environmental Toxicology* 21, 47–54. <https://doi.org/10.1002/tox.20153>
- 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>
- 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>
- 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>
- Haziza, C., de La Bourdonnaye, G., Skiada, D., Ancerewicz, J., Baker, G., Picavet, P., Lüdicke, F., 2016. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 8: 5-Day randomized reduced exposure clinical study in Poland. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81, S139–S150. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.003>
- HCSP, 2016. Bénéfices-risques de la cigarette électronique pour la population générale. Haut Conseil de la Santé Publique, Paris.
- 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.
- 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>
- IARC, 2018. List of classifications, Volumes 1–122 – IARC. URL <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications-volumes/> (accessed 7.9.18).
- Inserm, n.d. Pharmacocinétique et pharmacodynamie de la nicotine.
- 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., 2017. 3-D nasal cultures: Systems toxicological assessment of a candidate modified-risk tobacco product. *ALTEX* 23–48. <https://doi.org/10.14573/altex.1605041>
- Jaccard, G., Tabin Djoko, D., Moennikes, O., Jeannet, C., Kondylis, A., Belushkin, M., 2017. Comparative assessment of HPHC yields in the Tobacco Heating System THS2.2 and commercial cigarettes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 90, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.08.006>
- Jaunky, T., Adamson, J., Santopietro, S., Terry, A., Thorne, D., Breheny, D., Proctor, C., Gaça, M., 2018. Assessment of tobacco heating product THP1.0. Part 5: In vitro dosimetric and cytotoxic assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 93, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.09.016>

- 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>
- Kand'ár, R., Žáková, P., Lotková, H., Kučera, O., Červinková, Z., 2007. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 1382–1387. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.11.028>
- Kaur, G., Muthumalage, T., Rahman, I., 2018. Mechanisms of toxicity and biomarkers of flavoring and flavor enhancing chemicals in emerging tobacco and non-tobacco products. *Toxicology Letters* 288, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.02.025>
- 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>
- 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>
- Laguerre, G., Le Foll, B., Melihan-Cheinin, P., Rostoker, G., 2003. Les stratégies thérapeutiques médicamenteuses et non-médicamenteuses de l'aide à l'arrêt du tabac (Argumentaire). AGENCE FRANÇAISE DE SECURITE SANITAIRE DES PRODUITS DE SANTE.
- le Ministre de la Santé et des Solidarités, 2006. Efficacité, efficience et prise en charge financière des stratégies thérapeutiques d'aide au sevrage tabagique. Haute Autorité de santé.
- 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>
- Lermenier-Jeannet, A., 2018. Tabagisme et arrêt du tabac en 2018. *Observatoire français des drogues et des toxicomanies* 9.
- 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*.
- Liu, X., 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>
- Maeder, S., Peitsch, M., 2017. Comments on the article entitled “Heat-Not-Burn Tobacco Cigarettes: Smoke by Any Other Name” by Auer R, 2017.
- McCauley, L., Markin, C., Hosmer, D., 2012. An Unexpected Consequence of Electronic Cigarette Use. *Chest* 141, 1110–1113. <https://doi.org/10.1378/chest.11-1334>
- 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>
- National Academies of Sciences, E., Division, H. and M., Practice, B. on P.H. and P.H., Systems, C. on the R. of the H.E. of E.N.D., Eaton, D.L., Kwan, L.Y., Stratton, K., 2018. Nicotine. National Academies Press (US).
- 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, 2018. OMS Tabagisme [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/fr/> (accessed 3.26.19).
- 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., Gautier, A., Andler, R., Guignard, R., Richard, J.-B., Nguyen-Thanh, V., 2017. Tabac et e-cigarette en france : niveaux d'usage d'après les premiers résultats du baromètre santé 2016. Santé publique France, Saint-Maurice, France.
- Philip Morris International, n.d. IQOS [WWW Document]. URL <https://www.pmi.com/smoke-free-products/iqos-our-tobacco-heating-system> (accessed 8.9.18a).
- Philip Morris International, n.d. Our Smoke-Free Products [WWW Document]. URL <https://www.pmi.com/smoke-free-products> (accessed 8.9.18b).
- 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., Choukallah, 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<sup>-/-</sup> 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>
- Proctor, C., 2018. Assessment of tobacco heating product THP1.0. Part 1: Series introduction. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 93, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.09.010>
- Promega Corporation, n.d. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Instructions for Use of Products G7570, G7571, G7572 and G7573.
- 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>
- Schaller, J.-P., Keller, D., Poget, L., Pratte, P., Kaelin, E., McHugh, D., Cudazzo, G., Smart, D., Tricker, A.R., Gautier, L., Yerly, M., Reis Pires, R., Le Bouhellec, S., Ghosh, D., Hofer, I., Garcia, E., Vanscheeuwijck, P., Maeder, S., 2016a. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 2: Chemical composition, genotoxicity, cytotoxicity, and physical properties of the aerosol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81, S27–S47. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.10.001>
- Schaller, J.-P., Pijnenburg, J.P.M., Ajithkumar, A., Tricker, A.R., 2016b. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 3: Influence of the tobacco blend on the formation

- of harmful and potentially harmful constituents of the Tobacco Heating System 2.2 aerosol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81, S48–S58. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.10.016>
- Scheffler, S., Dieken, H., Krischenowski, O., Aufderheide, M., 2015a. Cytotoxic Evaluation of e-Liquid Aerosol using Different Lung-Derived Cell Models. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12, 12466–12474. <https://doi.org/10.3390/ijerph121012466>
- Scheffler, S., Dieken, H., Krischenowski, O., Förster, C., Branscheid, D., Aufderheide, M., 2015b. 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., Kogel, U., Talikka, M., Wong, E.T., Martin, F., Xiang, Y., Guedj, E., Ivanov, N.V., Hoeng, J., Peitsch, M.C., 2016. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2 (THS2.2). Part 5: microRNA expression from a 90-day rat inhalation study indicates that exposure to THS2.2 aerosol causes reduced effects on lung tissue compared with cigarette smoke. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81, S82–S92. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.018>
- 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>
- Sies, H., 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* 69, 965–968.
- Signes-Costa, J., de Granda-Orive, J.I., Ramos Pinedo, Á., Camarasa Escrig, A., de Higes Martínez, E., Rábade Castedo, C., Cabrera César, E., Jiménez-Ruiz, C.A., 2019. Official Statement of the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR) on Electronic Cigarettes and IQOS®. *Arch. Bronconeumol.* <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2019.04.023>
- 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>
- Stapleton, J.A., Russell, M.A., Sutherland, G., Feyerabend, C., 1998. Nicotine availability from Eclipse tobacco-heating cigarette. *Psychopharmacology* 139, 288–290.
- Strzelak, A., Ratajczak, A., Adamiec, A., Feleszko, W., 2018. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15, 1033. <https://doi.org/10.3390/ijerph15051033>
- 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.

- 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>
- Talih, S., Balhas, Z., Eissenberg, T., Salman, R., Karaoghlanian, N., El Hellani, A., Baalbaki, R., Saliba, N., Shihadeh, A., 2015. Effects of user puff topography, device voltage, and liquid nicotine concentration on electronic cigarette nicotine yield: measurements and model predictions. *Nicotine Tob. Res.* 17, 150–157. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntu174>
- Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2014. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, a016295–a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- 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>
- Thorne, D., Breheny, D., Proctor, C., Gaca, M., 2018. Assessment of novel tobacco heating product THP1.0. Part 7: Comparative in vitro toxicological evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 93, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.08.017>
- US EPA, 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).
- 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).
- Wagner, K.A., Flora, J.W., Melvin, M.S., Avery, K.C., Ballentine, R.M., Brown, A.P., McKinney, W.J., 2018. An evaluation of electronic cigarette formulations and aerosols for harmful and potentially harmful constituents (HPHCs) typically derived from combustion. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 95, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.03.012>
- 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>
- 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>
- 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., Frenzel, 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>

## Annexe 1 : Protocoles utilisés

### EXPOSITION DES CELLULES À LA FUMÉE/AÉROSOL NON DILUÉ ET TEST DE VIABILITÉ CELLULAIRE

#### PREPARATION DU MODULE D'EXPOSITION

- 1) **La veille, nettoyer** les modules d'exposition à l'alcool et les laisser sous le PSM
- 2) **Préparer** le dispositif d'exposition
  - a. **Allumer** le bain marie/ pompe à air et les analytes (*attendre 5 min pour qu'ils se stabilisent*)
  - b. **Allumer** la machine à fumer (*cf protocole*)
  - c. **Vérifier** que le nanomètre est à 1bar (*côté gauche*)
  - d. **Connecter** l'analyte 1 au tube air et régler à 20.0 mL/min
  - e. **Connecter** l'analyte 2 sur la sortie d'air (filtre bleu) du module d'exposition de la microbalance en premier et à 5mL/min en tournant le bouton sur le cube blanc avec la clé jaune 4 (faire cette opération pour chaque compartiment (en tout 7 fois))
- 3) Sous la hotte, **ajouter** 3,5mL de milieu dans les puits des modules d'exposition
- 4) **Aspirer** le surplus de milieu passé au-dessus des inserts
- 5) **Placer** les inserts dans les puits du module (*si bulle, incliner le module*)
- 6) **Fermer** les modules
- 7) **Brancher** les modules au dispositif
  - a. **Brancher** les tuyaux bleus venant du bain-marie avec les bleus et les rouges avec les rouges
  - b. **Connecter** les tubulures de sortie (*filtres bleus*) puis ceux d'entrée (*noires*) au module

#### EXPOSITION

- 1) **Choisir** le programme souhaité sur le logiciel
- 2) **Placer** une cigarette, une cigarette électronique ou l'IQOS dans l'orifice d'aspiration
  - a. Pour une **cigarette classique** (disposition : horizontale), allumer la cigarette et appuyer simultanément sur le bouton START
  - b. Pour une **cigarette électronique** (disposition : angle de 45°), appuyer d'abord sur le bouton de la e-cig pendant 1 seconde (*pour faire chauffer la résistance*) puis appuyer sur le bouton START en restant simultanément appuyer 2 secondes supplémentaires sur l'e-cig (*faire en sorte que le temps de chauffe soit le même pour chaque bouffée*)
  - c. Pour l'**IQOS** (disposition : horizontale), après l'avoir fait charger, insérer le « HEET » dans l'IQOS et rester appuyer 3 secondes sur le bouton pour faire chauffer la lame (*la LED verte clignote*). Quand la LED ne clignote plus, appuyer sur le bouton START

#### FIN EXPOSITION

- 1) **Déconnecter** les tubulures d'arrivés en **premier** (*noires*) puis les tubulures de sorties (*filtres bleus*)
- 2) **Débrancher** les tuyaux venant du bain-marie (*tuyaux bleus et rouges*)
- 3) **Mettre** les modules sous le PSM et **s'occuper** des cellules selon la manip souhaitée
- 4) **Arrêt** de la machine (*cf protocole*)

#### CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

- 1) Après l'exposition, **aspirer** puis **remplir** avec 1,5mL de milieu les puits de la plaque 6 puits
- 2) **Placer** la plaque à l'incubateur à 37°C (*Temps en fonction du temps post-exposition souhaité*)
- 3) **Après** l'incubation, **aspirer** le milieu passé sur l'insert, les transférer dans une autre plaque 6 puits
- 4) **Transférer** les 1,5mL de milieu dans 2 eppendorfs (*pour des tests d'inflammation (conserver à -20°C)*)
- 5) **Ajouter** 250 µL de **PBS** par insert et 250 µL de **Tampon reconstitué** (CellTiter® reagent) par insert
- 6) **Agiter** (agitateur orbital) 10 min à l'abri de la lumière
- 7) **Transférer** 4 fois 100µL de chaque insert (*quadripliat*) sur une plaque 96 puits opaque
- 8) **Réaliser** 4 fois un blanc avec 50µL de **PBS** et 50µL de **Tampon** (CellTiter® reagent)
- 9) **Laisser** stabiliser la luminescence 30 min à l'abri de la lumière
- 10) **Réaliser** la lecture par **luminescence**

## ENSEMENCEMENT EN INSERTS / FLASQUES

### MATERIEL

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ A mettre à 37°C :           <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Milieu LHC 9 + pénicilline/streptomycine</li> <li>➤ Solution de PBS</li> <li>➤ Trypsine 1X</li> <li>➤ Antitrypsine</li> </ul> </li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Collagène 100X à 5 mg/ml</li> <li>✓ Bleu trypan</li> <li>✓ Cellule de comptage</li> </ul> |
|---|--|

### COATER LES INSERTS

- 1) **Préparer** une solution de collagène à **0,03 mg/ml**
- 2) **Déposer 500 µl** de solution dans **chaque** insert
- 3) **Incuber** à **37°C** pendant **45 minutes**
- 4) Après l'incubation, **aspirez** la solution de collagène en inclinant la plaque vers soi
- 5) **Rincer** les inserts en déposant **500µL de PBS**
- 6) **Aspirer** la **totalité** du PBS

### REPIQUAGE

- 1) **Observer** les cellules contenues dans la flasque au microscope
- 2) **Aspirer** le milieu (*à l'opposé du tapis cellulaire*)
- 3) **Rincer** la flasque au **PBS**
  - a. **Ajouter 10 ml** de PBS (*sans projeter sur le tapis cellulaire*)
  - b. **Mettre** délicatement la flasque à l'horizontal pour que le PBS nettoie tout le tapis cellulaire
  - c. **Aspirer** le PBS (*à l'opposé du tapis cellulaire*)
- 4) **Ajouter 2ml** de trypsine 1X (*en projetant directement sur le tapis cellulaire*) et le placer 2min à 37°C
  - a. **Observer** le décollement des cellules au microscope (*taper légèrement sur le côté de la flasque pour décoller les cellules*)
- 5) **Ajouter l'antitrypsine** à un volume deux fois supérieur à celui de la trypsine (**4mL**) (*aspirez et remettre plusieurs fois le mélange sur la face du tapis de cellule*)
- 6) **Mettre** cette suspension de cellule dans un Falcon® 15 mL et le **centrifuger** à 1 500 rpm (400G) pendant 3 minutes
- 7) **Aspirer** le surnageant (*en laisser un peu pour faciliter la mise se en suspension des cellules*)
- 8) **Remettre** en suspension les cellules dans **5 ml** de milieu (*aspirez et refouler plusieurs fois pour que la solution soit bien homogène*)
- 9) **Compter** les cellules
  - a. **Transférer** 100 µl de la suspension de cellule dans un eppendorf
  - b. Y **ajouter**, à volume égale, du bleu trypan (*ici 100µl*)
  - c. **Déposer**, entre lame et lamelle, le mélange sur une lame de comptage
  - d. **Compter**, un nombre suffisant de cellules (*au moins 100*), pour estimer le nombre de cellules dans la suspension

### ENSEMENCEMENT

- 1)
  - a. **Calculer** et **mettre**, en fonction du nombre de cellules désiré pour l'ensemencement de la nouvelle flasque, le volume de la suspension nécessaire
  - b. **Ajouter 12ml** de milieu (T75) ou **4ml** de milieu (T25) dans la flasque
  - c. **Incuber** à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>
- 2)
  - a. **Calculer** pour avoir ≈ 75 000 cellules/mL/insert (*Volume total en fonction du nombre d'insert désirer*)
  - b. **Déposer 1 ml** de la suspension sur la partie supérieure de l'insert
  - c. **Déposer 2 ml** du milieu dans la partie inférieure de l'insert

## Annexe 2 : Quantité de composés carbonylés présents dans les aérosols et fumées de l'IQOS, des e-cig et de la cigarette 3R4F en µg/ bouffée

Composés µg/bouffée	LOQ ng/L	Lounge			18W			30W			IQOS			3R4F ISO			3R4F HCI		
		Moy	±	Ecart-T	Moy	±	Ecart-T	Moy	±	Ecart-T	Moy	±	Ecart-T	Moy	±	Ecart-T	Moy	±	Ecart-T
Formaldéhyde	0,006	0,006	±	0,001	0,026	±	0,0029	0,065	±	0,0237	0,153	±	0,009	0,290	±	0,110	0,246	±	0,060
Acétaldéhyde	0,009	0,033	±	0,005	0,063	±	0,0104	0,161	±	0,0464	22,839	±	0,598	113,598	±	20,888	155,724	±	56,190
Propanone	0,009	0,004	±	0,003	0,014	±	0,0030	0,029	±	0,0082	2,771	±	0,073	21,789	±	2,140	33,756	±	7,448
Acroléine	0,006	0,001	±	0,001	0,017	±	0,0039	0,044	±	0,0109	0,041	±	0,009	~			~		
Propanal	0,009	0,002	±	0,001	0,008	±	0,0024	0,023	±	0,0056	1,380	±	0,203	4,607	±	0,530	6,829	±	1,666
MVK	0,012	0,000	±	0,000	0,007	±	0,0040	0,006	±	0,0021	0,443	±	0,042	0,748	±	0,287	1,341	±	0,219
Crotonaldéhyde	0,009	0,002	±	0,000	0,016	±	0,0033	0,039	±	0,0082	0,137	±	0,010	0,734	±	0,109	1,667	±	0,782
MEK	0,012	0,001	±	0,002	0,034	±	0,0236	0,023	±	0,0096	0,628	±	0,027	2,412	±	0,871	9,013	±	1,097
Methylpropenal	0,012	~			~			~			0,335	±	0,021	0,598	±	0,739	0,842	±	0,351
Butanal	0,012	0,000	±	0,000	0,002	±	0,0001	0,002	±	0,0001	0,974	±	0,094	2,638	±	0,237	3,609	±	1,043
Benzaldéhyde	0,015	0,001	±	0,000	0,002	±	0,0003	0,003	±	0,0002	0,053	±	0,004	0,149	±	0,057	0,048	±	0,059
Isopentanal	0,009	0,001	±	0,000	0,008	±	0,0011	0,012	±	0,0007	0,385	±	0,037	1,148	±	0,262	2,057	±	0,592
Pentanal	0,009	0,001	±	0,001	0,001	±	0,0002	0,000	±	0,0001	0,024	±	0,001	0,062	±	0,012	0,166	±	0,050
Glyoxal	0,012	0,001	±	0,000	0,001	±	0,0006	0,001	±	0,0003	~			0,184	±	0,108	0,238	±	0,199
o-tolualdéhyde	0,012	0,001	±	0,000	0,003	±	0,0005	0,003	±	0,0006	0,003	±	0,00	0,043	±	0,022	~		
m-tolualdéhyde	0,009	0,000	±	0,000	0,001	±	0,0007	0,001	±	0,0008	~			~			~		
p-tolualdéhyde	0,009	0,002	±	0,000	0,001	±	0,0007	0,001	±	0,0008	0,117	±	0,025	0,640	±	0,033	0,299	±	0,200
Méthylglyoxal	0,012	0,025	±	0,003	0,013	±	0,0011	0,045	±	0,0109	0,491	±	0,070	0,802	±	0,036	0,995	±	0,251
Hexanal	0,009	0,000	±	0,000	0,001	±	0,0002	0,002	±	0,0002	0,019	±	0,013	0,075	±	0,068	~		
2,5 diMlbenzaldéhyde	0,009	0,000	±	0,000	0,001	±	0,0001	0,001	±	0,0001	0,004	±	0,007	0,105	±	0,026	~		

"~" : supérieur à la limite de quantification

## Annexe 3 : Comparaison des concentrations de composés carbonylés présents dans les aérosols d'IQOS par rapport à la littérature.

<b>Comparaison des dosages des carbonylés de l'IQOS vs littérature</b>	(Auer et al., 2017b)	(Li et al., 2018)	(Schaller et al., 2016a) Tableau 5	(Schaller et al., 2016a) Tableau 6	(Jaccard et al., 2017)	(Farsalinos et al., 2018)
Profils utilisés	35/2/2	HCl <sup>1</sup>	HCl	HCl	HCl	HCl
<b>Formaldéhyde</b>	57,188	8,368	33,092	35,057	22,932	28,594
<b>Acétaldéhyde</b>	203,015	130,510	125,146	128,671	126,300	190,194
<b>Propanone</b>	277,098	125,054	81,700	98,378	93,667	
<b>Acroléine</b>	54,441	7,692	4,336	5,190	5,088	4,537
<b>Propanal/ Propionaldehyde</b>	212,384	140,867	114,248	121,809	121,809	129,422
<b>Crotonaldéhyde</b>	234,269	25,543	39,611	43,730		81,994
<b>MEK</b>			104,549	94,541	98,901	
<b>Butanal</b>		62,258				

Profil : volume de la bouffée (mL) / durée de l'aspiration (s) / Fréquence de bouffée (s<sup>-1</sup>)

1 - HCl : 55/2/2

## Annexe 4 : Quantité d'hydrocarbures aromatiques polycycliques présentes dans les aérosols et fumées de l'IQOS, des e-cig et de la cigarette 3R4F en µg/ bouffée

Composés pg/puff	Lounge			Mb18W			Mb30W			IQOS			3R4F		
	Moy	±	Ecart-T	Moy	±	Ecart-T	Moy	±	Ecart-T	Moy	±	Ecart-T	Moy	±	Ecart-T
Naphtalène	61,53	±	9,53	75,90	±	5,61	92,21	±	6,22	71,23	±	38,86	3598,56	±	735,41
Acénaphène	0,24	±	0,09	2,57	±	1,10	4,99	±	1,40	12,51	±	13,67	1318,24	±	397,54
Fluorène	6,66	±	3,32	6,75	±	1,59	5,03	±	1,36	26,04	±	22,46	1976,68	±	387,69
Phénanthrène	7,22	±	0,71	25,19	±	8,20	22,82	±	3,53	55,94	±	34,72	2829,43	±	533,31
Anthracène	0,59	±	0,11	1,70	±	0,49	2,85	±	3,76	4,69	±	2,32	1356,20	±	266,75
Fluoranthène	9,17	±	1,44	20,12	±	11,82	11,52	±	11,89	130,90	±	79,00	1463,50	±	288,77
Pyrène	17,86	±	4,31	30,87	±	9,24	30,88	±	10,93	153,04	±	98,63	1752,44	±	304,46
Benzo(c)phenanthrene	1,86	±	0,65	4,55	±	2,18	3,15	±	4,43	10,25	±	6,93	1,52	±	0,59
cyclopenta(c,d)pyrene	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00
Benzo[a]anthracene	0,23	±	0,04	2,56	±	0,87	3,18	±	4,04	43,80	±	23,35	542,49	±	150,13
Chrysène	0,43	±	0,33	1,57	±	0,26	2,48	±	4,05	26,35	±	13,89	471,68	±	72,50
5-methylchrysene	1,51	±	0,40	1,03	±	0,70	0,63	±	0,41	1,67	±	1,03	1130,55	±	293,95
Benzo(e)pyrene	1,95	±	0,28	6,12	±	2,54	5,35	±	3,63	22,89	±	17,10	1343,91	±	303,12
Benzo[b]fluoranthene	0,26	±	0,07	1,18	±	0,26	4,17	±	7,08	18,90	±	8,91	358,95	±	125,63
Benzo[k]fluoranthene	0,24	±	0,06	0,54	±	0,08	1,42	±	2,24	18,42	±	11,14	99,55	±	28,13
Benzo[a]pyrene	0,56	±	0,19	0,60	±	0,21	1,08	±	0,33	25,61	±	13,89	457,64	±	114,51
Dibenzo(a,l)pyrene	0,05	±	0,01	0,04	±	0,00	0,05	±	0,01	0,34	±	0,16	0,57	±	0,22
Dibenzo[a,h]anthracene	0,03	±	0,00	0,02	±	0,00	0,20	±	0,33	0,84	±	0,46	38,36	±	11,86
Benzo[g,h,i]perylene	1,47	±	0,69	0,92	±	0,26	4,80	±	3,15	16,63	±	8,90	276,18	±	55,98
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	0,28	±	0,05	0,24	±	0,03	1,52	±	2,04	6,61	±	5,64	213,97	±	81,47
Dibenzo(a,e)pyrene	0,05	±	0,01	0,04	±	0,00	0,24	±	0,38	0,52	±	0,33	92,36	±	43,51
Anthanthrène	0,27	±	0,09	0,19	±	0,06	0,36	±	0,09	11,68	±	6,71	233,91	±	52,62
Coronène	0,27	±	0,11	0,52	±	0,17	2,77	±	1,04	5,49	±	1,88	25,63	±	5,40

**CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET EVALUATION DE LA TOXICITE DES AEROSOLS D'E-CIGARETTE ET D'UN SYSTEME DE TABAC CHAUFFE (IQOS)**

Sept millions de décès par an sont imputables au tabagisme. Malgré les aides actuelles au sevrage tabagique, la diminution du nombre de fumeurs n'est pas assez importante. De nos jours, de nouveaux dispositifs de substitution, présentés comme moins toxiques que la cigarette, apparaissent. Le tabac chauffé (**IQOS**) est l'une de ces nouvelles alternatives à la cigarette classique au même titre que les **e-cigarettes**, il est donc important de tester ces dispositifs afin de se rendre compte de leur potentiel toxique. C'est pourquoi cette étude s'intéresse à la caractérisation physico-chimique et à la toxicité *in vitro* de l'aérosol d'IQOS et de 2 modèles d'e-cigarettes pour les comparer à la fumée de la cigarette de référence 3R4F. La cigarette 3R4F est celle produisant le plus de **composés carbonylés et d'HAPs** (Hydrocarbure Aromatiques Polycycliques) Une réduction d'au moins 80% de ces composés est mesurée dans l'aérosol d'IQOS et des concentrations encore plus faibles sont retrouvées avec les e-cigarettes. En adéquation avec ces dosages, une **cytotoxicité** plus importante a été obtenue avec la cigarette 3R4F qu'avec l'IQOS. Seule une faible diminution de la cytotoxicité est observée avec les différents modèles d'e-cig. Enfin, une inflammation est observée quel que soit le dispositif (notamment avec une augmentation de la sécrétion d'IL-6) mais à des temps d'exposition différents. Ces nouveaux dispositifs, bien que moins toxiques, ont tout de même des effets néfastes au niveau cellulaire, il apparaît donc nécessaire de continuer à étudier leur toxicité pour pouvoir les réglementer.

Mots clés : IQOS ; e-cigarette ; composés carbonylés ; HAPs ; cytotoxicité ; inflammation

**AEROSOL PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND TOXICITY EVALUATION OF E-CIGARETTE HEAT-NOT-BURN SYSTEM (IQOS)**

Seven million deaths a year are caused by smoking. Despite the current smoking cessation aids, the decrease in the number of smokers is not significant enough. Nowadays, new substitution devices, presented as less toxic than cigarettes, appear. Heat-not-burn system (**IQOS**) is one of these new alternatives to conventional cigarettes in the same way as **e-cigarettes**, so it is important to test these devices in order to be aware of their toxic potential. Therefore, this study focuses on the physicochemical characterization and *in vitro* toxicity of aerosol of IQOS and 2 e-cigarette models to compare them to the smoke of the 3R4F reference cigarette. The 3R4F cigarette is the one producing the most **carbonyl compounds and PAHs** (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons). A reduction of at least 80% of these compounds is measured in IQOS aerosol and even lower concentrations are found with e-cigarettes. In line with these assays, a greater **cytotoxicity** was obtained with the 3R4F cigarette than with the IQOS. Only a small decrease in cytotoxicity is observed with the different e-cigs. Finally, **inflammation** is observed regardless of the device (in particular with an increase in the secretion of IL-6) but at different exposure times. These new devices, although less toxic, still have adverse effects at the cellular level, therefore, it appears necessary to continue to study their toxicity to be able to regulate them.

Keys words: IQOS; e-cigarette; carbonyl compound, PAHs, cytotoxicity, inflammation