

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

**Soutenu publiquement le 23 octobre 2017  
Par M. Nicolas BEAUVAL**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**EVALUATION DE L'IMPACT SANITAIRE DES CIGARETTES ELECTRONIQUES :  
DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODES DE DOSAGE DES  
ELEMENTS TRACE METALLIQUES POUR LA CARACTERISATION DES  
E-LIQUIDES ET DES E-VAPEURS**

---

**Membres du jury :**

**Président :**           **Professeur Jean-Pierre GOULLÉ**  
Professeur Émérite  
Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rouen

**Assesseur(s) :**   **Docteur Anne GARAT**  
Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier  
Faculté de Pharmacie, CHRU, Lille

**Professeur Christine CÉZARD**  
Praticien Hospitalier  
CHRU, Lille

**Docteur Fabrice NESSLANY**  
Directeur de recherche (IPL), Expert Toxicologue  
Laboratoire de Toxicologie de L'Institut Pasteur, Lille



**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

**Soutenu publiquement le 23 octobre 2017  
Par M. Nicolas BEAUVAL**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**EVALUATION DE L'IMPACT SANITAIRE DES CIGARETTES ELECTRONIQUES :  
DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODES DE DOSAGE DES  
ELEMENTS TRACE METALLIQUES POUR LA CARACTERISATION DES  
E-LIQUIDES ET DES E-VAPEURS**

---

**Membres du jury :**

**Président :**           **Professeur Jean-Pierre GOULLÉ**  
Professeur Émérite  
Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rouen

**Assesseur(s) :**       **Docteur Anne GARAT**  
Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier  
Faculté de Pharmacie, CHRU, Lille

**Professeur Christine CÉZARD**  
Praticien Hospitalier  
CHRU, Lille

**Docteur Fabrice NESSLANY**  
Directeur de recherche (IPL), Expert Toxicologue  
Laboratoire de Toxicologie de L'Institut Pasteur, Lille





## Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



### Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE

Vice-présidents :

- Professeur Alain DUROCHER
- Professeur Régis BORDET
- Professeur Eric BOULANGER
- Professeur Frédéric LOBEZ
- Professeur Murielle GARCIN
- Professeur Annabelle DERAM
- Professeur Muriel UBEDA SAILLARD
- Monsieur Ghislain CORNILLON
- Monsieur Pierre RAVAUX
- Monsieur Larbi AIT-HENNANI
- Madame Nathalie ETHUIN
- Madame Iona LEMAITRE

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

### Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Damien CUNY  
 Vice-Doyen, 1<sup>er</sup> assesseur : Professeur Bertrand DECAUDIN  
 Assesseur en charge de la pédagogie Dr. Annie STANDAERT  
 Assesseur en charge de la recherche Pr. Patricia MELNYK  
 Assesseur délégué à la scolarité Dr. Christophe BOCHU  
 Assesseur délégué en charge des relations internationales Pr. Philippe CHAVATTE  
 Assesseur délégué en charge de la vie étudiante M. Thomas MORGENROTH

Chef des services administratifs : Monsieur Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

| Civ. | NOM          | Prénom    | Laboratoire         |
|------|--------------|-----------|---------------------|
| Mme  | ALLORGE      | Delphine  | Toxicologie         |
| M.   | BROUSSEAU    | Thierry   | Biochimie           |
| M.   | DECAUDIN     | Bertrand  | Pharmacie Galénique |
| M.   | DEPREUX      | Patrick   | ICPAL               |
| M.   | DINE         | Thierry   | Pharmacie clinique  |
| Mme  | DUPONT-PRADO | Annabelle | Hématologie         |
| M.   | GRESSIER     | Bernard   | Pharmacologie       |
| M.   | LUYCKX       | Michel    | Pharmacie clinique  |
| M.   | ODOU         | Pascal    | Pharmacie Galénique |
| Mme  | RENNEVILLE   | Aline     | Hématologie         |
| M.   | STAELS       | Bart      | Biologie Cellulaire |

## Liste des Professeurs des Universités

| Civ. | NOM                | Prénom          | Laboratoire                             |
|------|--------------------|-----------------|---|
| M.   | ALIOUAT            | EI Moukhtar     | Parasitologie                           |
| Mme  | AZAROUAL           | Nathalie        | Physique                                |
| M.   | BERTHELOT          | Pascal          | Onco et Neurochimie                     |
| M.   | CAZIN              | Jean-Louis      | Pharmacologie – Pharmacie clinique      |
| M.   | CHAVATTE           | Philippe        | ICPAL                                   |
| M.   | COURTECUISSÉ       | Régis           | Sciences végétales et fongiques         |
| M.   | CUNY               | Damien          | Sciences végétales et fongiques         |
| Mme  | DELBAERE           | Stéphanie       | Physique                                |
| M.   | DEPREZ             | Benoît          | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| Mme  | DEPREZ             | Rebecca         | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| M.   | DUPONT             | Frédéric        | Sciences végétales et fongiques         |
| M.   | DURIEZ             | Patrick         | Physiologie                             |
| M.   | FOLIGNE            | Benoît          | Bactériologie                           |
| M.   | GARÇON             | Guillaume       | Toxicologie                             |
| Mme  | GAYOT              | Anne            | Pharmacotechnie Industrielle            |
| M.   | GOOSSENS           | Jean François   | Chimie Analytique                       |
| M.   | HENNEBELLE         | Thierry         | Pharmacognosie                          |
| M.   | LEMDANI            | Mohamed         | Biomathématiques                        |
| Mme  | LESTAVEL           | Sophie          | Biologie Cellulaire                     |
| M.   | LUC                | Gerald          | Physiologie                             |
| Mme  | MELNYK             | Patricia        | Onco et Neurochimie                     |
| M.   | MILLET             | Régis           | ICPAL                                   |
| Mme  | MUHR – TAILLEUX    | Anne            | Biochimie                               |
| Mme  | PAUMELLE-LESTRELIN | Réjane          | Biologie Cellulaire                     |
| Mme  | PERROY             | Anne Catherine  | Législation                             |
| Mme  | ROMOND             | Marie Bénédicte | Bactériologie                           |
| Mme  | SAHPAZ             | Sevser          | Pharmacognosie                          |
| M.   | SERGHÉRAERT        | Eric            | Législation                             |
| Mme  | SIEPMANN           | Florence        | Pharmacotechnie Industrielle            |
| M.   | SIEPMANN           | Juergen         | Pharmacotechnie Industrielle            |
| M    | TARTAR             | André           | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| M.   | WILLAND            | Nicolas         | Laboratoire de Médicaments et Molécules |

## Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

| Civ. | NOM      | Prénom          | Laboratoire         |
|------|----------|-----------------|---------------------|
| Mme  | BALDUYCK | Malika          | Biochimie           |
| Mme  | GARAT    | Anne            | Toxicologie         |
| Mme  | GOFFARD  | Anne            | Bactériologie       |
| M.   | LANNOY   | Damien          | Pharmacie Galénique |
| Mme  | ODOU     | Marie Françoise | Bactériologie       |
| M.   | SIMON    | Nicolas         | Pharmacie Galénique |

## Liste des Maîtres de Conférences

| Civ. | NOM              | Prénom           | Laboratoire                             |
|------|------------------|------------------|---|
| Mme  | ALIOUAT          | Cécile Marie     | Parasitologie                           |
| M.   | ANTHERIEU        | Sébastien        | Toxicologie                             |
| Mme  | AUMERCIER        | Pierrette        | Biochimie                               |
| Mme  | BANTUBUNGI       | Kadiombo         | Biologie cellulaire                     |
| Mme  | BARTHELEMY       | Christine        | Pharmacie Galénique                     |
| Mme  | BEHRA            | Josette          | Bactériologie                           |
| M    | BELARBI          | Karim            | Pharmacologie                           |
| M.   | BERTHET          | Jérôme           | Physique                                |
| M.   | BERTIN           | Benjamin         | Immunologie                             |
| M.   | BLANCHEMAIN      | Nicolas          | Pharmacotechnie industrielle            |
| M.   | BOCHU            | Christophe       | Physique                                |
| M.   | BORDAGE          | Simon            | Pharmacognosie                          |
| M.   | BOSC             | Damien           | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| M.   | BRIAND           | Olivier          | Biochimie                               |
| Mme  | CACHERA          | Claude           | Biochimie                               |
| M.   | CARNOY           | Christophe       | Immunologie                             |
| Mme  | CARON            | Sandrine         | Biologie cellulaire                     |
| Mme  | CHABÉ            | Magali           | Parasitologie                           |
| Mme  | CHARTON          | Julie            | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| M    | CHEVALIER        | Dany             | Toxicologie                             |
| M.   | COCHELARD        | Dominique        | Biomathématiques                        |
| Mme  | DANEL            | Cécile           | Chimie Analytique                       |
| Mme  | DEMANCHE         | Christine        | Parasitologie                           |
| Mme  | DEMARQUILLY      | Catherine        | Biomathématiques                        |
| Mme  | DUMONT           | Julie            | Biologie cellulaire                     |
| Mme  | DUTOUT-AGOURIDAS | Laurence         | Onco et Neurochimie                     |
| M.   | EL BAKALI        | Jamal            | Onco et Neurochimie                     |
| M.   | FARCE            | Amaury           | ICPAL                                   |
| Mme  | FLIPO            | Marion           | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| Mme  | FOULON           | Catherine        | Chimie Analytique                       |
| M.   | FURMAN           | Christophe       | ICPAL                                   |
| M.   | GELEZ            | Philippe         | Biomathématiques                        |
| Mme  | GENAY            | Stéphanie        | Pharmacie Galénique                     |
| M.   | GERVOIS          | Philippe         | Biochimie                               |
| Mme  | GOOSSENS         | Laurence         | ICPAL                                   |
| Mme  | GRAVE            | Béatrice         | Toxicologie                             |
| Mme  | GROSS            | Barbara          | Biochimie                               |
| M.   | HAMONIER         | Julien           | Biomathématiques                        |
| Mme  | HAMOUDI          | Chérifa Mounira  | Pharmacotechnie industrielle            |
| Mme  | HANNOTHIAUX      | Marie-Hélène     | Toxicologie                             |
| Mme  | HELLEBOID        | Audrey           | Physiologie                             |
| M.   | HERMANN          | Emmanuel         | Immunologie                             |
| M.   | KAMBIA           | Kpakpaga Nicolas | Pharmacologie                           |
| M.   | KARROUT          | Youness          | Pharmacotechnie Industrielle            |
| Mme  | LALLOYER         | Fanny            | Biochimie                               |
| M.   | LEBEGUE          | Nicolas          | Onco et Neurochimie                     |
| Mme  | LECOEUR          | Marie            | Chimie Analytique                       |
| Mme  | LEHMANN          | Hélène           | Législation                             |

|     |               |               |   |
|-----|---------------|---------------|---|
| Mme | LELEU-CHAVAIN | Natascha      | ICPAL                                   |
| Mme | LIPKA         | Emmanuelle    | Chimie Analytique                       |
| Mme | MARTIN        | Françoise     | Physiologie                             |
| M.  | MOREAU        | Pierre Arthur | Sciences végétales et fongiques         |
| Mme | MUSCHERT      | Susanne       | Pharmacotechnie industrielle            |
| Mme | NIKASINOVIC   | Lydia         | Toxicologie                             |
| Mme | PINÇON        | Claire        | Biomathématiques                        |
| M.  | PIVA          | Frank         | Biochimie                               |
| Mme | PLATEL        | Anne          | Toxicologie                             |
| M.  | POURCET       | Benoît        | Biochimie                               |
| M.  | RAVAUX        | Pierre        | Biomathématiques                        |
| Mme | RAVEZ         | Séverine      | Onco et Neurochimie                     |
| Mme | RIVIERE       | Céline        | Pharmacognosie                          |
| Mme | ROGER         | Nadine        | Immunologie                             |
| M.  | ROUMY         | Vincent       | Pharmacognosie                          |
| Mme | SEBTI         | Yasmine       | Biochimie                               |
| Mme | SINGER        | Elisabeth     | Bactériologie                           |
| Mme | STANDAERT     | Annie         | Parasitologie                           |
| M.  | TAGZIRT       | Madjid        | Hématologie                             |
| M.  | VILLEMAGNE    | Baptiste      | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| M.  | WELTI         | Stéphane      | Sciences végétales et fongiques         |
| M.  | YOUS          | Saïd          | Onco et Neurochimie                     |
| M.  | ZITOUNI       | Djamel        | Biomathématiques                        |

### Professeurs Agrégés

| Civ. | NOM        | Prénom  | Laboratoire |
|------|------------|---------|-------------|
| Mme  | MAYES      | Martine | Anglais     |
| M.   | MORGENROTH | Thomas  | Législation |

### Professeurs Certifiés

| Civ. | NOM      | Prénom    | Laboratoire |
|------|----------|-----------|-------------|
| M.   | HUGES    | Dominique | Anglais     |
| Mlle | FAUQUANT | Soline    | Anglais     |
| M.   | OSTYN    | Gaël      | Anglais     |

### Professeur Associé - mi-temps

| Civ. | NOM     | Prénom | Laboratoire                      |
|------|---------|--------|----------------------------------|
| M.   | DHANANI | Alban  | Droit et Economie Pharmaceutique |



### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

| Civ. | NOM       | Prénom     | Laboratoire                      |
|------|-----------|------------|----------------------------------|
| M.   | BRICOTEAU | Didier     | Biomathématiques                 |
| Mme  | CUCCHI    | Malgorzata | Biomathématiques                 |
| M.   | FRIMAT    | Bruno      | Pharmacie Clinique               |
| M.   | GILLOT    | François   | Droit et Economie pharmaceutique |
| M.   | MASCAUT   | Daniel     | Pharmacie Clinique               |
| M.   | ZANETTI   | Sébastien  | Biomathématiques                 |
| M.   | BRICOTEAU | Didier     | Biomathématiques                 |

### AHU

| Civ. | NOM     | Prénom    | Laboratoire         |
|------|---------|-----------|---------------------|
| Mme  | DEKYNDT | Bérengère | Pharmacie Galénique |
| M.   | PEREZ   | Maxime    | Pharmacie Galénique |

Année 2016-2017 (mise à jour 8 septembre 2017)



## ***Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



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

Je remercie Madame le Docteur Anne GARAT  
pour son encadrement, ses conseils et son soutien

Je remercie Madame le Professeur Christine CÉZARD  
d'avoir accepté de juger ce travail et pour ses commentaires avisés

Je remercie Monsieur le Docteur Fabrice NESSLANY  
d'avoir spontanément accepté de faire partie de ce jury

Je remercie Madame le Professeur Delphine ALLORGE  
de m'avoir accueilli au sein de son service et de m'avoir accompagné et  
soutenu tout au long de mon cursus

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

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

Je remercie Monsieur le Docteur Michael HOWSAM  
pour ses précieux conseils

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

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

A mes sœurs et toute ma famille pour leur soutien,

A Julie, pour m'avoir supporté et soutenu,

A toute l'équipe du laboratoire de Toxicologie du CHRU pour son accueil,

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

# SOMMAIRE

---

|  |    |
|--|----|
| TABLE DES FIGURES .....  | 15 |
| TABLE DES TABLEAUX .....   | 16 |
| ABREVIATIONS .....   | 17 |
| AVANT-PROPOS .....   | 19 |
| INTRODUCTION .....   | 23 |
| 1. La cigarette électronique.....  | 24 |
| a. Un nouveau produit de consommation.....   | 24 |
| b. Principe général de fonctionnement.....   | 25 |
| c. Présentation des modèles.....   | 26 |
| d. E-liquide .....   | 28 |
| 2. Un rapport bénéfice/risque en cours d'évaluation.....                                   | 32 |
| a. Etat des connaissances actuelles .....  | 32 |
| b. Focus sur la caractérisation physicochimique des e-vapeurs .....                        | 33 |
| c. Avis des autorités de santé françaises.....   | 34 |
| 3. Objectifs.....  | 35 |
| a. Impact sanitaire de la cigarette électronique .....                                     | 35 |
| b. Les éléments trace métalliques.....   | 35 |
| MATERIELS ET METHODES .....  | 38 |
| 1. Cigarette électronique, e-liquides, cigarette conventionnelle .....                     | 39 |
| 2. Méthodes de génération des e-vapeurs et fumées.....                                     | 40 |
| 3. Méthodes de collecte des ETM dans les e-vapeurs et fumées.....                          | 42 |
| 4. Méthode de dosage des ETM.....  | 42 |
| a. Utilisation de la spectrométrie de masse couplée à une torche à<br>plasma (ICP-MS)..... | 42 |
| b. Appareillage .....  | 44 |
| c. Réactifs .....  | 44 |
| d. Les interférences polyatomiques.....  | 45 |
| e. L'effet matrice.....  | 45 |
| 5. Protocole de validation de méthode.....   | 46 |
| a. Gamme de linéarité.....   | 46 |
| b. Limites de quantification.....  | 46 |
| c. Répétabilité .....  | 46 |
| d. Fidélité intermédiaire .....  | 46 |

|  |    |
|--|----|
| e. Contamination inter-échantillon.....  | 46 |
| f. Effet matrice .....   | 47 |
| 6. Valeurs de référence.....   | 47 |
| RESULTATS .....  | 48 |
| 1. Développement des méthodes de dosage des ETM par ICP-MS.....  | 49 |
| a. L'effet matrice.....  | 49 |
| b. Détermination des paramètres de robustesse.....   | 50 |
| 2. Application aux e-liquides et e-vapeurs .....   | 55 |
| a. E-liquides .....  | 55 |
| b. E-vapeurs et fumées .....   | 56 |
| DISCUSSION .....   | 58 |
| CONCLUSION.....  | 67 |
| BIBLIOGRAPHIE.....   | 69 |
| ANNEXES .....  | 78 |
| ANNEXE 1 : Tableaux des paramétrages de l'ICP-MS VARIAN 820-MS pour les analyses des e-liquides et e-vapeurs (sans et avec gaz de collision) ..... | 79 |
| ANNEXE 2 : Evaluation de l'effet de la matrice e-liquide sur l'analyse des ETM par ICP-MS .....  | 80 |
| ANNEXE 3 : Evaluation de l'effet de la matrice liquide de barbotage sur l'analyse des ETM par ICP-MS .....   | 83 |
| ANNEXE 4 : Concentrations des 15 ETM ( $\mu\text{g/L}$ ) mesurées dans 54 e-liquides provenant du même fabricant .....                             | 86 |



## TABLE DES FIGURES

---

|   |    |
|---|----|
| Figure 1. Schéma général d'une cigarette électronique avec l'exemple d'un modèle de 2 <sup>ème</sup> génération ..... | 25 |
| Figure 2. Cigarette électronique de 1 <sup>ère</sup> génération ou "Cig-a-Like" .....                                 | 26 |
| Figure 3. Cigarettes électroniques de 2 <sup>ème</sup> génération ou "Mid-size" .....                                 | 27 |
| Figure 4. Cigarettes électroniques de 3 <sup>ème</sup> génération ou "Mods" .....                                     | 27 |
| Figure 5. Cigarette électronique de 4 <sup>ème</sup> génération, ici avec une forme de boîtier ..                     | 28 |
| Figure 6. Exemple de présentation d'e-liquide.....  | 28 |
| Figure 7. Molécule du propylène glycol .....  | 29 |
| Figure 8. Molécule du glycérol.....   | 30 |
| Figure 9. Molécule de la nicotine .....   | 30 |
| Figure 10. Exemples d'arômes pour e-liquides.....   | 31 |
| Figure 11. E-cigarette, e-liquides et cigarette conventionnelle utilisés .....  | 40 |
| Figure 12. Smoking machine VC1 .....  | 41 |
| Figure 13. Caractéristiques des profils de génération de bouffée ISO 3308 et CORESTA.....                             | 41 |
| Figure 14. Schéma d'utilisation des barboteurs pour le recueil des e-vapeurs et fumées.....                           | 42 |
| Figure 15. ICP-MS Varian 820-MS .....   | 44 |
| Figure 16. Schéma du processus d'ionisation de l'échantillon dans le plasma.....                                      | 45 |

## TABLE DES TABLEAUX

---

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1. Classification des ETM (et dérivés) selon leur cancérogénicité d'après le CIRC.....   | 37 |
| Tableau 2. Exemples d'interférences rencontrées en analyse élémentaire par ICP-MS .....  | 43 |
| Tableau 3. Effet de la matrice e-liquide sur le signal des étalons internes par ICP-MS .....   | 49 |
| Tableau 4. Effet de la matrice liquide de barbotage sur le signal des étalons internes par ICP-MS.....   | 50 |
| Tableau 5. Paramètres de la méthode de dosage des ETM dans les e-liquides dilués au 1/20 <sup>ème</sup> par ICP-MS .....   | 53 |
| Tableau 6. Paramètres de la méthode de dosage des ETM dans les liquides de barbotage dilués au 1/3 <sup>ers</sup> par ICP-MS .....   | 54 |
| Tableau 7. Distribution des concentrations des ETM dans 54 e-liquides (27 arômes différents, sans et avec 16 mg/mL de nicotine). .....                                     | 55 |
| Tableau 8. Concentrations des ETM (en µg/L) dans les 6 e-liquides utilisés pour générer des e-vapeurs .....  | 56 |
| Tableau 9. Concentrations des ETM (en pg/bouffée) mesurées dans les blancs expérimentaux, les e-vapeurs et les fumées générés par la machine à fumer.....                  | 57 |
| Tableau 10. Concentrations en ETM (en µg/L) d'e-liquides rapportées dans la littérature.....   | 61 |
| Tableau 11. Extrapolation des concentrations limites des ETM dans l'e-liquide et dans l'eau destinée à la consommation humaine à une valeur d'exposition journalière ..... | 62 |

## ABREVIATIONS

---

|         |   |   |
|---------|---|---|
| AFNOR   | = | Agence française de normalisation   |
| AFSSAPS | = | Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé  |
| ANSM    | = | Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé   |
| CIRC    | = | Centre international de recherche sur le cancer   |
| COFRAC  | = | Comité français d'accréditation   |
| CORESTA | = | Centre de coopération pour les recherches scientifiques relatives au tabac  |
| CRI     | = | <i>Collision reaction interface</i> (interface de collision de réaction)  |
| ETINCEL | = | Enquête téléphonique pour l'information sur la cigarette électronique   |
| ETM     | = | Elément trace métallique  |
| FAAS    | = | <i>Flame atomic absorption spectrometry</i> (spectrométrie d'absorption atomique en flamme)   |
| FDA     | = | <i>U.S. food &amp; drug administration</i>  |
| GFAAS   | = | <i>Graphite furnace atomic absorption spectrometry</i> (spectrométrie d'absorption atomique en four graphite)                       |
| GRAS    | = | <i>Generally recognized as safe</i> (généralement reconnu comme sans danger)  |
| HAS     | = | Haute autorité de santé   |
| HCSP    | = | Haut conseil de santé publique  |
| ICP-MS  | = | <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> (spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma)                          |
| ICP-AES | = | <i>Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry</i> (spectrométrie de d'émission atomique couplée à une torche à Plasma) |
| INPES   | = | Institut national de prévention et d'éducation pour la santé  |
| ISO     | = | <i>International organization for standardization</i>   |
| LDQ     | = | Limite de quantification basse  |
| LDQH    | = | Limite de quantification haute  |
| OFDT    | = | Observatoire français des drogues et des toxicomanies   |

OFT = Office français de prévention du tabagisme  
TNS = Traitement nicotinique de substitution  
US EPA = *US environmental protection agency*

# AVANT-PROPOS

## AVANT-PROPOS

---

Le tabac (*Nicotiana tabacum*) est une plante herbacée de la famille des *Solanaceae*. D'un point de vue plus réglementaire, le tabac est défini par la directive européenne relative aux produits du tabac 2014/40/UE comme « feuilles et toute autre partie naturelle, transformée ou non, de la plante de tabac, y compris le tabac expansé et reconstitué » [1]. Il est principalement cultivé pour sa transformation en « produits du tabac », consommés par plus d'un milliard de personnes dans le monde [2]. Les cigarettes en sont les principaux représentants, auxquels s'ajoutent cigares, cigarillos, tabac à rouler, tabac à pipe, tabac à pipe à eau, tabac à mâcher, tabac à priser, tabac à usage oral ou « nouveaux produits du tabac » (ne relevant d'aucune des catégories précédemment citées et mis sur le marché après le 19 mai 2014). Trente-six pourcents de la population française fument la cigarette, le cigare, le cigarillo ou la pipe et 22 % sont des anciens fumeurs, ce qui classe la France parmi les plus grands consommateurs d'Europe [3].

La composition chimique du tabac est très complexe. Alors que quelques 2500 composés sont présents dans le tabac traité avant combustion, plus de 4000 substances sont émises dans la fumée de cigarette, dont beaucoup sont toxiques et 64 sont classées cancérigènes par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) [4]. Entre autres, la fumée de cigarette contient du monoxyde de carbone, des composés organiques volatils, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des nitrosamines spécifiques du tabac et des composés inorganiques tels que les éléments trace métalliques (ETM) [5]. Aussi, parmi ces 4000 composés figure la nicotine. Sa consommation induit rapidement une sensation de plaisir, réduit le stress et l'anxiété et favorise la gestion de l'humeur. A long terme, la nicotine possède également un puissant pouvoir addictogène et induit une forte dépendance au tabac [6].

Le tabagisme est aujourd'hui la plus grande cause de mortalité évitable dans le monde et est responsable de près de 7 millions de décès chaque année, dont environ 890 000 seraient dus au tabagisme passif [7]. Il est un facteur de risque majeur de nombreuses pathologies, cancéreuses ou non, incluant sans s'y limiter les bronchopneumopathies chroniques obstructives, les maladies cardiovasculaires et différents cancers des voies pulmonaires et aérodigestives, du sein, de la vessie, du rein ou du col de l'utérus. Au total, 21 pathologies sont formellement associées à la

consommation de tabac, un nombre possiblement sous-estimé selon une récente étude qui estime que près de 17 % de la surmortalité constatée chez les fumeurs ne pouvaient être attribués à ces 21 pathologies [8]. Ainsi, on lui attribue en France pour l'année 2010, 78 000 décès dont 47 000 par cancer [9]. D'un point de vue économique, « l'épidémie mondiale de tabagisme » représente des dommages de plus de 500 milliards de dollars par an et la réduction du tabagisme est depuis plusieurs années un enjeu de santé publique majeur. Le tabagisme est la cible de nombreuses campagnes de luttes promues et soutenues par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans le but de surveiller, mettre en garde, protéger et aider les populations contre les dangers du tabac [10]. En France, un programme national de réduction du tabagisme, lancé en 2014, vise à réduire le nombre de fumeurs quotidiens d'au moins 10 % d'ici 2019 et à aboutir à une première génération « sans tabac » d'ici 2032 [11].

Le sevrage tabagique est actuellement la seule mesure efficace pour ralentir le développement des pathologies associées et diminuer le risque de décès [12]. Des bénéfices de l'arrêt du tabac sont mêmes visibles dans les premières heures suivant la dernière cigarette, comme la diminution du taux sanguin de monoxyde de carbone. Un an après la dernière cigarette, le risque d'infarctus du myocarde est diminué de moitié, le risque d'accident vasculaire cérébral rejoint celui d'un non-fumeur. A 5 ans, le risque de cancer du poumon est presque diminué de moitié et à 10–15 ans l'espérance de vie redevient identique à celle des personnes n'ayant jamais fumé [13]. Aujourd'hui, alors que deux tiers des fumeurs déclarent souhaiter arrêter de fumer, le taux de sevrage à 6–12 mois en absence d'aide, pharmacologique ou non, est estimé entre 3 et 5 %. La majorité des tentatives d'arrêt aboutissent à une alternance de périodes de rechute et d'abstinence sur plusieurs années [14]. En France, l'aide au sevrage tabagique consiste en un accompagnement psychologique et motivationnel par des professionnels de santé associé, ou non, à un traitement médicamenteux. Ce dernier a pour objectif de soulager les symptômes de sevrage, réduire l'envie de fumer et prévenir les rechutes. En première intention sont recommandés les traitements nicotiques de substitution (TNS) qui existent sous forme transdermique (timbre ou patch), orale (gomme à mâcher, comprimés, pastilles ou spray buccal) ou inhalée (« inhaleur »). Les TNS constituent un apport quotidien de nicotine en évitant la toxicité des autres substances issues de la fumée de cigarette. Ils sont généralement bien tolérés, ne présentent pas d'effet indésirable grave identifié et augmentent significativement

l'abstinence à 6 mois. En seconde intention sont recommandés la varenicline (Champix®) et le bupropion (Zyban®), agissant respectivement sur les récepteurs nicotiques centraux et sur la recapture de la noradrénaline. Ces deux médicaments ont fait l'objet d'une surveillance particulière des autorités de santé pour des évènements indésirables graves en rapport avec le suicide [15]. Toutefois ces éléments ont été réfutés par la récente étude « EAGLES » [16]. En termes d'efficacité dans le sevrage tabagique, cette dernière étude place la varenicline devant les TNS et le bupropion, eux-mêmes devant le placebo. Ces stratégies ont aujourd'hui démontré une certaine efficacité, cependant partielle. Apparue il y a quelques années et présentée comme une alternative moins nocive au tabac, la cigarette électronique est envisagée comme nouveau moyen d'aide au sevrage tabagique et est actuellement au centre de nombreux débats.



# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

---

## 1. La cigarette électronique

### *a. Un nouveau produit de consommation*

L'origine de la cigarette électronique sous sa forme contemporaine est attribuée à Hon Lik, un pharmacien et ingénieur chinois qui créa, en 2003, un dispositif destiné à simuler l'utilisation d'une cigarette conventionnelle. Son principe général de fonctionnement est la vaporisation/aérosolisation d'un liquide, appelé « e-liquide » contenant, ou non, de la nicotine [17]. La vapeur (ou aérosol ou « e-vapeur ») ainsi créée, assimilée à la fumée de cigarette conventionnelle, est aspirée par l'utilisateur que l'on nomme « vapoteur ». Par déclinaison, l'action de « vapoter » est le « vapotage ». Aussi appelée « e-cigarette » ou « e-cig », elle est aujourd'hui le principal représentant des « inhalateurs électroniques de nicotine » qui se présentent sous des formes multiples et variées : cigares, cigarillos, pipes, pipes à eau, stylos ou clés USB par exemple [18].

La notoriété de la cigarette électronique a considérablement augmenté ces dernières années jusqu'à atteindre 99 % en France et en Europe, d'après les résultats de l'Eurobaromètre 2017 [3]. Selon ces dernières données, les français figurent parmi les plus grands expérimentateurs à l'échelle européenne, avec 24 % des personnes interrogées ayant testé au moins une fois la cigarette électronique, contre une moyenne de 15 % pour l'ensemble des 28 pays inclus dans l'enquête. De même, 4 % des français interrogés ont déclaré utiliser actuellement une cigarette électronique ou un dispositif similaire, contre une moyenne européenne de 2 %. La tendance à l'augmentation ou à la diminution du nombre d'utilisateurs réguliers reste néanmoins assez difficile à évaluer sur ces dernières années. En effet, entre 2013 et 2014 leur proportion a été estimée en France à 3,3 % selon l'enquête ETINCEL de l'OFDT [17], à 4 % selon l'Eurobaromètre 2014 [19] et à 6,0 % selon le baromètre santé de l'INPES [20]. Toutefois, le marché français de la cigarette électronique semble avoir connu une perte de vitesse en 2015 avec un chiffre d'affaires total en baisse de 10 % par rapport à 2014 et avec la disparition de près de 400 points de vente sur un total de 2400 [21]. Ce ralentissement, supposément la conséquence de la fin d'un effet de mode ou de la saturation inévitable du marché, pourrait ne pas durer, le marché étant prédit à la hausse pour 2018 [21].

Le statut légal de la cigarette électronique est variable en fonction du pays : entre autres produit de consommation, produit thérapeutique ou produit du tabac [18]. En France, initialement classée comme un produit de consommation, l'e-cigarette est devenue depuis le 20 mai 2016 un « produit du vapotage » selon l'ordonnance n° 2016-623 portant transposition de la directive européenne 2014/40/UE [22,23]. Cette modification a notamment pour effet d'améliorer les politiques et moyens de prévention en définissant les exigences de fabrication, de présentation, de vente et de propagande de la cigarette électronique et des e-liquides. L'agence française de normalisation (AFNOR) a par ailleurs publié dès mars 2015 les premières normes décrivant les exigences et méthodes d'essai de la cigarette électronique et des e-liquides (respectivement XP D90-300-1 et XP D90-300-2) qui ont été suivies en juillet 2016 par une troisième norme relative aux émissions (XP D90-300-3) [24].

### **b. Principe général de fonctionnement**

La cigarette électronique est composée de 3 parties principales : une pile ou batterie, un réservoir et un atomiseur [25]. L'e-liquide contenu dans le réservoir est passivement acheminé par capillarité, grâce à un système de mèche ou de bourre, vers une résistance chauffante (ou « coil ») située dans l'atomiseur. Le réservoir est appelé « cartomiseur » lorsqu'il contient l'atomiseur et « clearomiseur » lorsque ses parois sont transparentes. Lors d'une session de vapotage, la batterie alimente la résistance chauffante alors que l'utilisateur aspire une bouffée au niveau de l'embout terminal (ou « drip tip ») (Figure 1). Le flux d'air ainsi généré traverse la cheminée de l'atomiseur et entraîne l'e-liquide chauffé sous forme d'aérosol. Le déclenchement de la chauffe peut être activé par un bouton pression (ou « switch »), ou par l'aspiration d'une bouffée. Les modèles à déclenchement par aspiration tendent toutefois à disparaître du marché.

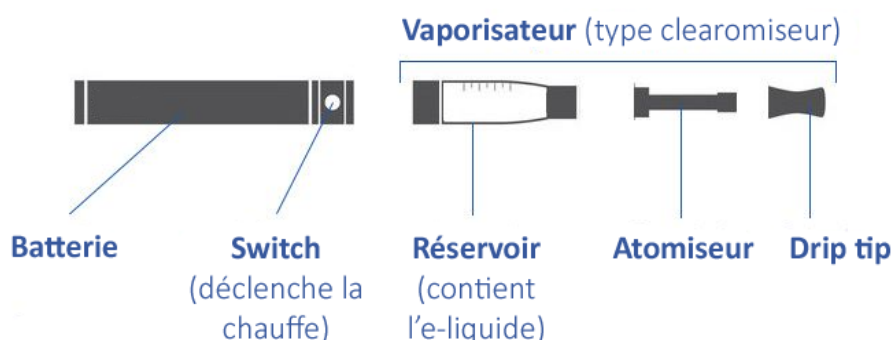


Figure 1. Schéma général d'une cigarette électronique avec l'exemple d'un modèle de 2<sup>ème</sup> génération (d'après <http://www.cigadviser.com/cigaretteelectronique>)

### **c. Présentation des modèles**

Depuis les premiers modèles commercialisés, la cigarette électronique a connu plusieurs transformations. Taille, technologie, architecture et design ont été adaptés pour satisfaire le plus grand nombre d'utilisateurs. Il est possible à l'heure actuelle de distinguer 4 générations d'e-cigarettes [26] :

#### ❖ 1<sup>ère</sup> génération : les « Cig-a-Likes »

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



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

#### ❖ 2<sup>ème</sup> génération : les « Mid-size »

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



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

❖ 3<sup>ème</sup> génération : Les modèles personnalisables ou « Mods »

Plus que réutilisables, la 3<sup>ème</sup> génération de cigarette électronique est personnalisable. Les modèles sont généralement plus imposants et présentent des formes beaucoup plus variées (Figure 4). Au-delà du *design*, ces modèles aux caractéristiques plus ou moins modulables permettent d'améliorer les sensations recherchées par l'utilisateur en ajustant les conditions de génération de la vapeur. La valeur de la résistance chauffante, la puissance appliquée par la batterie et la taille de l'entrée d'air influent notamment sur le volume, la densité et la température de la vapeur.



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

❖ 4<sup>ème</sup> génération : Mods optimisés

Davantage une 3<sup>ème</sup> génération améliorée, certains regroupent dans la 4<sup>ème</sup> génération les modèles les plus récents de cigarette électronique proposant un

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



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

#### **d. E-liquide**



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

L'e-liquide désigne l'ensemble des liquides utilisés avec la cigarette électronique [25]. Il s'agit du consommable qui est transformé en e-vapeur au cours du vapotage. Il est la plupart du temps commercialisé sous forme de flacon de 10 ou

20 mL (Figure 6). D'une manière générale, l'e-liquide est principalement composé d'un mélange, en proportions variables, de propylène glycol et glycérol auxquels s'ajoutent arômes divers, +/- nicotine, +/- eau et +/- éthanol. Le propylène glycol et le glycérol sont utilisés pour rendre l'e-vapeur visible et comme exhausteur d'arôme. Plus la teneur en propylène glycol est élevée, plus la saveur est prononcée et moins la vapeur est abondante. Inversement, plus la teneur en glycérol est élevée, plus la vapeur est abondante et moins la saveur est prononcée [27].

❖ *Propylène glycol ou propane-1,2-diol (Figure 7)*

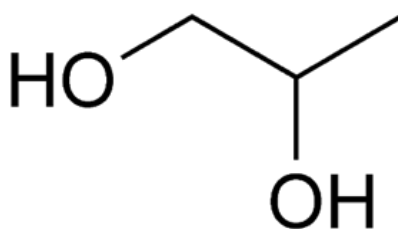


Figure 7. Molécule du propylène glycol  
([https://en.wikipedia.org/wiki/Propylene\\_glycol#/media/File:Propylene\\_glycol\\_chemical\\_structure.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Propylene_glycol#/media/File:Propylene_glycol_chemical_structure.png))

Le propylène glycol (N° CAS : 57-55-6) est un liquide incolore, légèrement visqueux, peu volatil et pratiquement inodore. Outre ses utilisations industrielles comme intermédiaire de synthèse ou composant de liquides réfrigérants, il est aussi utilisé comme solvant, émulsifiant, humectant ou conservateur dans l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique et les cosmétiques [28]. Le propylène glycol est considéré peu toxique pour l'Homme, il fait partie de la liste des substances alimentaires GRAS (pour « *generally recognised as safe* ») par la *U.S. food and drug administration* (FDA) [29]. Des expositions professionnelles peuvent conduire à des irritations cutanées et muqueuses et rarement à des allergies [28]. Il convient toutefois, dans le cas de la cigarette électronique, de nuancer ces informations avec le mode d'exposition particulier qu'est le vapotage. En effet, il s'agit là d'une exposition répétée par voie pulmonaire à un aérosol fortement concentré en propylène glycol.

❖ *Glycérol ou propane-1,2,3-triol (Figure 8)*

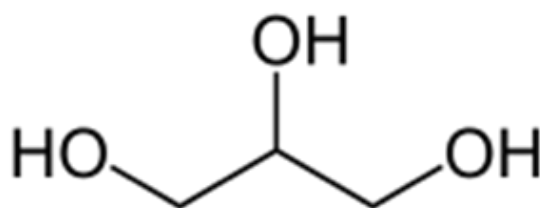


Figure 8. Molécule du glycérol  
([https://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol#/media/File:Glycerin\\_Skelett.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol#/media/File:Glycerin_Skelett.svg))

Le glycérol (N° CAS : 56-81-5), ou glycérine, est un liquide incolore, visqueux et inodore. Il est aujourd'hui utilisé dans de très nombreux domaines comme excipient dans l'industrie pharmaceutique, intermédiaire de synthèse chimique, composant de fluides industriels, humectant dans les produits du tabac ou additif dans les produits alimentaires. Le glycérol fait aussi partie de la liste de substances alimentaires GRAS et est aussi considéré comme peu toxique pour l'Homme, par inhalation ou contact cutané [29,30]. Encore une fois, le mode d'exposition particulier du vapotage, jusqu'à maintenant peu étudié, est à prendre en considération.

❖ *Nicotine (Figure 9)*

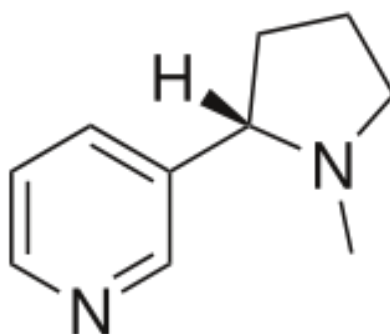


Figure 9. Molécule de la nicotine  
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotine#/media/File:Nicotine.svg>)

La nicotine (N° CAS : 54-11-5) est un alcaloïde issu du tabac et est utilisée dans les produits du tabac, produits connexes ou médicaments du sevrage tabagique. Elle se présente sous la forme d'un liquide huileux incolore à l'odeur âcre. Elle possède entre autres des effets anxiogènes, dépressogènes, anorexigènes et neurotoxiques chez l'enfant. Une intoxication aiguë peut se manifester par des signes cliniques généraux non spécifiques d'apparition rapide tels que des crampes abdominales, agitation, faiblesse, nausées, vomissements ou convulsions et peut



dans certains cas s'avérer fatale. L'exposition répétée à la nicotine favoriserait les processus d'athérosclérose, le développement d'évènements coronaires aigus et pourrait contribuer au développement des pathologies liées au tabac. Cependant, le lien de causalité est difficile à déterminer en raison de l'exposition concomitante aux nombreuses substances nocives émises dans les fumées de tabac [31]. Les données disponibles sont aujourd'hui insuffisantes pour conclure sur la cancérogénicité de la nicotine ou sur ses effets sur la reproduction [31,32]. Aussi, la nicotine possède un important pouvoir addictogène par son action sur les récepteurs nicotiniques cholinergiques du cerveau, à l'origine de la dépendance au tabac [6].

La concentration en nicotine des e-liquides vendus en France est aujourd'hui limitée à 20 mg/mL selon l'arrêté du 19 mai 2016 relatif aux produits du vapotage contenant de la nicotine, mais des produits plus concentrés sont disponibles sur internet. La quantité de nicotine émise dans les e-vapeurs est rapportée comme étant parfois inférieure, parfois supérieure à celle de la cigarette conventionnelle et comme étant fortement dépendante des conditions de génération des bouffées, incluant notamment le modèle d'e-cigarette et la durée de la bouffée [33–35]. De plus, la proportion de nicotine biologiquement disponible (forme base libre de la nicotine) pourrait être inférieure à celle attendue lorsque le pH de l'e-liquide serait < 9 [36]. Selon le rapport de l'office français de prévention du tabagisme (OFT), l'utilisation de nicotine avec l'e-cigarette présente un risque de développer une dépendance chez un non-fumeur, de maintenir la dépendance d'un fumeur ou encore de créer un pont vers le tabagisme [25].

#### ❖ *Arômes*



Figure 10. Exemples d'arômes pour e-liquides  
(<https://www.vapoclope.fr/img/cms/AROMES%20CAPELLA.jpg>)

Les marques proposent un large choix d'arômes (exemple Figure 10), ce qui constitue un outil marketing très puissant. Une étude publiée en 2014 a recensé 7764 noms uniques d'arômes pour 466 marques d'e-liquides sur des sites internet de vente anglophones, ce qui représente un nombre considérable de mélanges potentiels de molécules organiques volatiles [37,38]. Bien souvent des arômes alimentaires, ils sont considérés sans danger par ingestion, cependant leurs effets par inhalation sont peu connus. Selon leur concentration dans les e-liquides, ils pourraient représenter un intérêt sur le plan toxicologique [38]. Un lien entre des arômes spécifiques et des effets cytotoxiques a par ailleurs été rapporté [39,40]. L'utilisation du diacétyle, qui apporte une saveur beurrée, est notamment déconseillée par l'AFNOR en raison d'un risque accru de pathologies obstructives respiratoires [41,42].

En Europe, les saveurs les plus populaires sont les saveurs fruitées, suivies des saveurs de tabac, de menthe et des saveurs sucrées (chocolat par exemple) [3].

#### ❖ *Autres*

L'eau et l'éthanol entrent parfois à faible concentration dans la composition des e-liquides, en tant que fluidifiant [27]. L'éthylène glycol a également été retrouvé en différentes proportions dans des e-liquides sans qu'il en soit fait mention par le fabricant [43,44]. Solvant irritant et toxique pour l'Homme, l'éthylène glycol ne devrait pas être utilisé dans la fabrication des e-liquides.

## **2. Un rapport bénéfice/risque en cours d'évaluation**

### ***a. Etat des connaissances actuelles***

En raison de sa popularité croissante, même explosive au début des années 2010, de son positionnement concurrentiel face à la cigarette conventionnelle et du manque de données scientifiques ou de réglementation spécifique, la cigarette électronique est rapidement entrée au cœur de nombreux débats de santé publique. Alors que la perspective de disposer d'un nouveau moyen de lutte contre le tabagisme est considérée avec attention, les risques potentiels du vapotage ne sont, encore aujourd'hui, pas clairement caractérisés. Parmi les questions les plus étudiées : la cigarette électronique présente-elle un risque toxique pour l'utilisateur ? Pour son entourage ? Par rapport au tabac conventionnel ? Constitue-elle une aide

efficace au sevrage tabagique ? Peut-elle au contraire favoriser l'entrée dans le tabagisme, notamment chez les jeunes ? Peut-elle induire des dépendances à la nicotine ? Peut-elle diminuer les chances de sevrage total ?

Pour répondre à ces questions, les études scientifiques sur la cigarette électronique se sont multipliées depuis le début des années 2010 et ont abordé un certain nombre de problématiques. Une récente revue de la littérature, publiée en novembre 2016, a recensé 687 articles scientifiques explorant/décrivant pour les cigarettes électroniques (1) les caractéristiques du produit, (2) les effets sur la santé, (3) la perception des consommateurs, (4) les modes d'utilisation, (5) le potentiel d'induction de dépendance, (6) l'aide au sevrage tabagique, (7) le marketing et la communication, (8) les ventes et (9) les politiques appliquées [45]. Il en ressort qu'il existe encore aujourd'hui un certain nombre de limites à l'interprétation des données : les e-cigarettes et les techniques d'analyse physicochimique des e-vapeurs sont très variables, il n'existe pas de définition du (ou de plusieurs) profil(s) type(s) de vapoteurs, l'extrapolation des données *in vitro* et *in vivo* à l'Homme n'est pas évidente et il manque cruellement de données longitudinales chez l'Homme [45].

#### ***b. Focus sur la caractérisation physicochimique des e-vapeurs***

En comparaison des 4000 composés présents dans la fumée de cigarette conventionnelle, la question de l'exposition des vapoteurs à différents composés chimiques potentiellement toxiques issus du vapotage s'est rapidement posée. Dans la mesure où la production d'e-vapeur ne requiert aucun phénomène de combustion, les émissions de cigarette électronique sont généralement considérées comme moins nocives que la fumée de tabac. Ainsi, alors que de nombreux rapports s'accordent sur ce fait, les e-vapeurs ne peuvent pas être considérées comme totalement exemptes de composés potentiellement toxiques. En outre, la présence de différents « polluants » tels que des composés carbonylés, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, d'autres composés organiques volatiles (toluène, xylène, etc.), des nitrosamines ou des ETM a été rapportée dans les e-liquides ou leurs e-vapeurs respectives [43,46–56].

Comme précisé précédemment, il faut toutefois noter que plusieurs limites s'appliquent à l'interprétation de ces études. En effet, il n'existe actuellement pas ou peu de méthodes de référence ayant démontré leur robustesse pour la quantification des différents composés chimiques dans les e-vapeurs. Une grande variabilité de techniques de génération, de collection et d'analyse des e-vapeurs ont été utilisées à

ce jour, sans qu'il soit possible d'évaluer avec certitude leur équivalence ou de les comparer [57]. En attendant la publication d'une méthode de référence et l'harmonisation des pratiques, il convient donc d'interpréter les valeurs publiées avec précaution.

### ***c. Avis des autorités de santé françaises***

L'avis et les recommandations des autorités françaises sur l'utilisation de la cigarette électronique ont évolué ces dernières années. En 2011, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Produits de Santé (Afssaps), actuelle Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), avait recommandé de ne consommer aucun produit s'apparentant aux cigarettes électroniques et avait en outre précisé les critères selon lesquels ces produits seraient considérés comme des médicaments. En effet, les produits revendiquant l'aide au sevrage tabagique ou dont la teneur en nicotine est supérieure à 20 mg/mL relèveraient de la réglementation du médicament [58]. Dans un point d'information du 19 juillet 2016, l'ANSM rappelait qu'aucune demande d'autorisation de mise sur le marché de cigarette électronique ou de flacon de recharge, en tant que médicament ou dispositif médical, n'avait été déposée [59]. En 2014, la Haute Autorité de Santé (HAS) ne recommande pas l'utilisation de la cigarette électronique dans le sevrage tabagique sans pour autant la décourager chez un fumeur qui a commencé à vapoter et qui veut s'arrêter de fumer [60]. Le Haut Conseil de Santé Publique (HCSP), en 2016, considère que la cigarette électronique est un outil d'aide à l'arrêt du tabac chez les personnes désireuses de sortir du tabagisme et apparaît être un mode de réduction des risques du tabac en usage exclusif. Le HCSP recommande cependant de rappeler aux personnels de santé et aux fumeurs, sans en faire la publicité, les avantages et les inconvénients de l'utilisation de la cigarette électronique, et de maintenir les stratégies de prévention en place. Concernant les populations spécifiques, le HCSP recommande l'interdiction de vente aux mineurs mais ne statue pas clairement sur le cas de la femme enceinte pour lequel le risque pour l'embryon est encore inconnu [32].

La position assez prudente des autorités sanitaires témoigne du manque de recul que nous subissons encore aujourd'hui et du besoin de confirmer les données actuelles.

### **3. Objectifs**

#### ***a. Impact sanitaire de la cigarette électronique***

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans un projet visant d'une part à caractériser la composition chimique d'e-liquides et de leurs vapeurs respectives, produites par une machine à fumer (ou machine à vapoter), et d'autre part à évaluer la toxicité des e-vapeurs sur des modèles cellulaires et animaux, en comparaison de la cigarette conventionnelle.

Dans la partie analytique de l'étude, la démarche fut de développer des méthodes de dosage pour pouvoir quantifier, dans les e-liquides et les e-vapeurs, les constituants principaux des e-liquides, à savoir le propylène glycol, le glycérol et la nicotine, ainsi que différents composés potentiellement toxiques. Quinze ETM, 50 pesticides, 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques et 3 composés carbonylés ont alors été ciblés. Ces composés ont aussi été recherchés et dosés dans les fumées de cigarette conventionnelle.

Dans la partie expérimentale, des cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B) cultivées en interface air-liquide ont été exposées de manière aiguë ou répétée aux e-vapeurs et aux fumées de cigarette conventionnelle grâce au couplage d'un module d'exposition spécifique simulant le système respiratoire humain à la machine à fumer. Les effets cellulaires ont été évalués par l'analyse de la cytotoxicité, des réponses au stress oxydant et inflammatoire et par l'analyse du transcriptome. Une étude sur modèle animal est actuellement en cours de préparation.

#### ***b. Les éléments trace métalliques***

Parmi les composés chimiques d'intérêt ciblés dans cette étude figurent des éléments trace métalliques. Ce terme générique désigne indistinctement des métaux et métalloïdes réputés toxiques et remplace de manière plus appropriée l'appellation « métaux lourds » encore couramment utilisée. En effet, alors que certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement lourds (comme le Zn), certains éléments toxiques ne sont pas des métaux (comme l'As qui est un métalloïde).

Les ETM sont des éléments minéraux naturels. Ils se retrouvent dans l'air, l'eau, les sols ou les sédiments. L'Homme y est exposé par l'intermédiaire de son environnement, de son alimentation et parfois plus spécifiquement *via* son activité professionnelle, le plus fréquemment par ingestion, inhalation ou contact cutané [61].

Plusieurs ETM exercent des fonctions biologiques chez l'Homme. Certains sont qualifiés « d'oligo-éléments essentiels » lorsqu'ils répondent à 3 critères : (1) ils sont présents dans les tissus vivants à une concentration relativement constante, (2) ils provoquent, par leur retrait de l'organisme, des anomalies structurelles et physiologiques de façon similaire dans plusieurs espèces et (3) ils préviennent ou guérissent ces troubles par leur seule présence. Aujourd'hui la liste des oligo-éléments essentiels inclue le bore, le chrome, le cobalt, le cuivre, le fer, le fluor, l'iode, le molybdène, le manganèse, le sélénium le vanadium et le zinc [62]. Toutefois, plusieurs ETM, y compris ces mêmes oligo-éléments essentiels, peuvent présenter des effets toxiques au-delà d'un certain seuil d'exposition ou même sans notion de seuil. En outre, les effets toxiques des ETM sont variés, dépendent de la voie d'exposition et parfois de la forme de l'élément (ou de la molécule si dérivés) [61,63,64].

Dans cette étude, nous avons voulu étudier la contamination potentielle d'e-liquides par des ETM (quelle que soient leur origine) et le possible relargage d'ETM dans les e-vapeurs par les composants de l'e-cigarette. Pour cela nous avons ciblé 15 ETM : aluminium, antimoine, arsenic, béryllium, cadmium, chrome, cobalt, cuivre, manganèse, mercure, nickel, plomb, thallium, vanadium et zinc. Plusieurs d'entre eux (ou leurs dérivés) sont notamment classés cancérigènes avérés pour l'Homme selon le CIRC (Tableau 1).

Tableau 1. Classification des ETM (et dérivés) selon leur cancérogénicité d'après le CIRC

| <b>Élément (et dérivés)</b>                  | <b>Classement CIRC [65]</b> |
|--|-----------------------------|
| <b>Aluminium (production)</b>                | 1                           |
| <b>Antimoine (trioxyde)</b>                  | 2B                          |
| <b>Antimoine (sulfate d'antimoine (III))</b> | 3                           |
| <b>Arsenic (et composés inorganiques)</b>    | 1                           |
| <b>Béryllium (et composés)</b>               | 1                           |
| <b>Cadmium (et composés)</b>                 | 1                           |
| <b>Chrome métallique</b>                     | 3                           |
| <b>Composés chrome (III)</b>                 | 3                           |
| <b>Composés chrome (VI)</b>                  | 1                           |
| <b>Cobalt (et composés)</b>                  | 2B                          |
| <b>Cuivre</b>                                | Non disponible              |
| <b>Manganèse</b>                             | Non disponible              |
| <b>Mercure (et composés inorganiques)</b>    | 3                           |
| <b>Composés de méthylmercure</b>             | 2B                          |
| <b>Nickel (métal et alliages)</b>            | 2B                          |
| <b>Nickel (composés évalués en groupe)</b>   | 1                           |
| <b>Plomb (composés inorganiques)</b>         | 2A                          |
| <b>Plomb (dérivés organiques)</b>            | 3                           |
| <b>Thallium</b>                              | Non disponible              |
| <b>Vanadium (oxide de vanadium (IV))</b>     | 2B                          |
| <b>Zinc</b>                                  | Non disponible              |

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

# MATERIELS ET METHODES



# MATERIELS ET METHODES

---

## 1. Cigarette électronique, e-liquides, cigarette conventionnelle

L'ensemble des e-liquides et e-cigarettes utilisées dans cette étude sont de marque NHOSS® et proviennent de la société Innova (Bondues, France).

### ❖ *E-cigarette*

Le modèle d'e-cigarette utilisé pour cette étude est le modèle « Lounge », de 2<sup>ème</sup> génération, équipé d'une résistance chauffante de 2,8  $\Omega$  en alliage nickel/chrome (Figure 11). La batterie rechargeable est remplacée par une alimentation directe par branchement USB délivrant une tension de 3,6 V, pour une puissance appliquée de 4,6 W. Le déclenchement du chauffage au moment de la bouffée est réalisé de manière automatique à l'aspiration.

### ❖ *E-liquides*

Les e-liquides testés ont été fournis tels qu'ils étaient commercialisés au moment de l'étude, dans des flacons plastiques de 20 mL (Figure 11). La composition des e-liquides annoncée par le fabricant était la suivante : propylène glycol < 65 % ; glycérol < 35 % ; arômes alimentaires ; nicotine 0, 6, 11 ou 16 mg/mL.

Dans cette étude, les ETM ont été analysés à la fois dans 6 e-liquides et leurs e-vapeurs respectives : e-liquide menthe chlorophylle sans nicotine (MC/N-), ou avec 16 mg/mL de nicotine (MC/N+), e-liquide tabac blond sans nicotine (TB/N-), ou avec 16 mg/mL de nicotine (TB/N+), ainsi qu'un mélange de propylène glycol et glycérol réalisé par le fabricant dans les mêmes conditions que les produits mis sur le marché, sans nicotine (A-/N-) ou avec 16 mg/mL de nicotine (A-/N+). De plus, 48 autres e-liquides aromatisés, sans ou avec 16 mg/mL de nicotine, ont aussi été analysés.

### ❖ *Cigarette conventionnelle*

Pour cette étude, le choix de la cigarette conventionnelle s'est porté sur la cigarette de référence 3R4F (Lexington, KY) (Figure 11). Les cigarettes de référence

sont fabriquées dans le but d'être utilisées pour la recherche scientifique. Ainsi, elles présentent deux avantages non négligeables : leur mode de fabrication et leur composition sont connus [66] et une certaine masse de données scientifiques sont disponibles dans la littérature, pour comparaison notamment [67–71].



Figure 11. E-cigarette, e-liquides et cigarette conventionnelle utilisés (d'après <http://www.nhoss.com/cigarette-electronique-accessoires-nhoss-lounge/90-cigarette-electronique-nhoss-lounge-clearomiseur-color.html>, <http://www.nhoss.com/les-saveurs-classiques/58-e-liquide-saveur-classic-blond.html> et <https://ctrp.uky.edu/>)

## **2. Méthodes de génération des e-vapeurs et fumées**

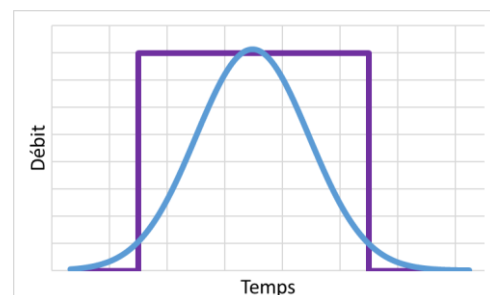
Les vapeurs de cigarettes électroniques et les fumées de cigarette 3R4F sont générées par la *Smoking Machine* VC1 (Vitrocell®, Waldkirch, Allemagne) (Figure 12). Concrètement, la machine à fumer fonctionne sur des cycles « d'aspiration » et « d'expiration ». En phase d'aspiration, une bouffée est déclenchée par un phénomène de dépression créé par le déplacement vers l'arrière d'un piston à l'intérieur d'un cylindre (Point 2, Figure 12). L'e-vapeur ou la fumée ainsi générée au niveau de la buse d'aspiration (Point 1, Figure 12) est acheminée vers l'espace créé par le déplacement du piston (Point 2, Figure 12). En phase d'expiration, l'e-vapeur ou la fumée contenue dans le cylindre est repoussée par le piston vers la sortie de la machine à fumer (Point 3, Figure 12).



Figure 12. Smoking machine VC1  
(d'après <https://www.vitrocell.com/inhalation-toxicology/smoking-machines/vc-1>)

La machine à fumer (en pratique, le déplacement du cylindre) est paramétrée selon le profil décrit dans la norme ISO 3308:2012 pour la cigarette 3R4F : une bouffée de 35 mL durant 2 secondes toutes les minutes, 8 bouffées par cigarette [72]. Pour la cigarette électronique, la machine à fumer est paramétrée selon le profil square recommandé par le CORESTA (Centre de Coopération pour les Recherches Scientifiques Relatives au Tabac) : une bouffée de 55 mL durant 3 secondes toutes les 30 secondes [73]. Ces deux profils diffèrent, en plus de leurs caractéristiques principales, par leur relation débit/temps : « en cloche » pour le profil ISO 3308 :2012 et « carrée » pour le profil du CORESTA (Figure 13).

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



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

Figure 13. Caractéristiques des profils de génération de bouffée ISO 3308 et CORESTA

### **3. Méthodes de collecte des ETM dans les e-vapeurs et fumées**

Les ETM sont collectés par un système de deux barboteurs avec fritté disposés en série (Figure 14), en sortie de machine à fumer (Point 3, Figure 12), contenant chacun 20 mL d'une solution d'acide nitrique 5 % dans de l'eau Milli-Q® (Merck Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

Les recueils de e-vapeurs et fumées sont réalisés par 3 séries consécutives et indépendantes de 96 et 48 bouffées, respectivement. Pour la cigarette électronique, son réservoir est pesé avant et après utilisation dans le but de suivre la consommation d'e-liquide lors de chaque session de

bouffées. En cas de changement d'e-liquide, de passage de cigarette électronique à cigarette conventionnelle ou à la fin des expérimentations, un nettoyage rigoureux de la machine à fumer, en particulier des parties en contact avec les e-vapeurs et fumées, est réalisé avec de l'éthanol.

Le recueil de « blancs expérimentaux » (BLC) est réalisé en plus des recueils d'e-vapeurs en utilisant le même protocole mais sans e-cigarette connectée à la machine à fumer. Ceci a pour objectif de différencier la part des ETM provenant des e-vapeurs et celle provenant de la machine à fumer ou du matériel de recueil/stockage.

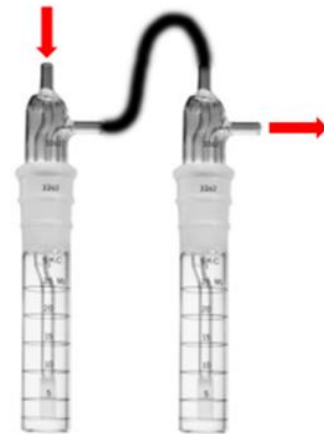


Figure 14. Schéma d'utilisation des barboteurs pour le recueil des e-vapeurs et fumées

(d'après [http://www.skinc.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=373](http://www.skinc.com/catalog/product_info.php?products_id=373))

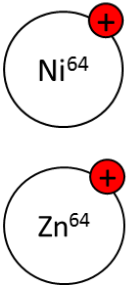
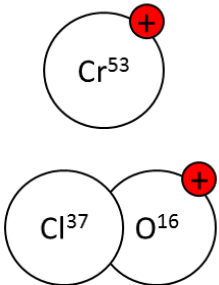
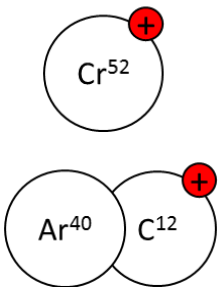
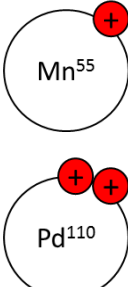
### **4. Méthode de dosage des ETM**

#### ***a. Utilisation de la spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma (ICP-MS)***

L'ICP-MS est aujourd'hui une technique de choix pour le dosage des ETM. Par rapport aux autres techniques d'analyse élémentaire qui incluent la spectrométrie d'absorption atomique en flamme (FAAS) ou en four graphite (GFAAS) et l'ICP-AES (spectrométrie d'émission atomique), l'ICP-MS dispose à la fois d'un large spectre d'éléments détectables, d'une bonne sensibilité et de la capacité de

réaliser une analyse simultanée multi-élémentaire [74]. A côté de ces avantages, l'analyse par ICP-MS présente toutefois quelques contraintes. En effet, la manipulation d'échantillons à très faibles concentrations nécessite l'utilisation de réactifs de haute pureté et un contrôle maximal des risques de contamination. Aussi, la présence d'interférences isobariques ou polyatomiques (Tableau 2), ainsi que la forte sensibilité de l'analyse à des effets de matrice, notamment sur l'ionisation des atomes, demandent une attention particulière et des adaptations méthodologiques.

Tableau 2. Exemples d'interférences rencontrées en analyse élémentaire par ICP-MS

| Type d'interférence          | Schéma  | m/z      | Minimisation des interférences   |
|------------------------------|---|----------|--|
| <b>Isobarique</b>            |   | 64<br>64 | Sélection des isotopes les plus pertinents   |
| <b>Polyatomique (oxydes)</b> |  | 53<br>53 | Optimisation des conditions nébulisation/injection/plasma<br>+<br>Utilisation de cellule de collision/réaction |
| <b>Polyatomique (argon)</b>  |  | 52<br>52 | Optimisation des conditions nébulisation/injection/plasma<br>+<br>Utilisation de cellule de collision/réaction |
| <b>Double charge</b>         |  | 55<br>55 | Optimisation des conditions nébulisation/injection/plasma<br>+<br>Sélection des isotopes les plus pertinents   |

## **b. Appareillage**

Le dosage des ETM a été réalisé par un ICP-MS Varian 820-MS (Figure 15) et un passeur automatique SPS3 (Bruker, Billireca, MA), un nébuliseur MicroMist U-Series 0,4 mL/min et une torche en quartz (Glass expansion, Pocasset, MA). Une méthode unique dosant l'ensemble des ETM ciblés a été créée, utilisant 0, 75 e 130 mL/min de débit d'hélium comme gaz de collision à l'interface de réaction de collision (CRI). Un délai suffisant de 60 secondes a été programmé entre 2 conditions pour permettre la stabilisation du signal. Des paramètres standards de puissance, profondeur d'échantillonnage et débit d'argon ont été appliqués et sont décrits dans l'ANNEXE 1.



Figure 15. ICP-MS Varian 820-MS

## **c. Réactifs**

Ont été utilisées comme calibrants des solutions de haute qualité à 1g/L d'aluminium (Al), antimoine (Sb), arsenic (As), béryllium (Be), cadmium (Cd), chrome (Cr), cobalt (Co), cuivre (Cu), manganèse (Mn), mercure (Hg), nickel (Ni), plomb (Pb), thallium (Tl), vanadium (V), et zinc (Zn) et comme étalons internes des solutions de rhodium (Rh), scandium (Sc) et yttrium (Y).

Pour l'analyse des e-liquides, les calibrants et les échantillons ont été préparés avec une solution de dilution contenant 1 % (v/v) d'acide nitrique de qualité ultrapure, 0,1 % (v/v) de triton™ et 50 µg/L d'or (Au) dans l'eau ultrapure.

Pour l'analyse des liquides de barbotage, les calibrants ont été préparés avec une solution de dilution contenant 1,67 % (v/v) d'acide nitrique de qualité ultrapure, 0,2 % (v/v) de butanol, 0,1 % (v/v) de triton™ et 50 µg/L d'Au dans l'eau ultrapure. Les échantillons ont été dilués au 1/3 à l'aide d'une solution spécifique permettant

d'obtenir les mêmes concentrations en acide nitrique, butanol, triton™ et Au que dans les calibrants.

#### **d. Les interférences polyatomiques**

L'ICP-MS Varian 820-MS est doté d'une interface de réaction de collision, alimentée par de l'hélium (He), qui permet de réduire significativement les interférences polyatomiques isobariques, notamment pour les éléments dont la masse est comprise entre 40 et 80 u [75]. Toutefois l'utilisation de gaz de collision diminue d'une manière générale l'intensité du signal, donc la sensibilité de l'analyse. C'est pour cela qu'une méthode unique a été créée, effectuant successivement pour le même échantillon un dosage sans gaz de collision, ensuite avec 75 mL/min d'He, puis avec 130 mL/min d'He. Ainsi, l'ensemble des ETM d'intérêt a été analysé en un seul dosage et dans des conditions optimisées de sensibilité et de spécificité de l'analyse. On ne peut néanmoins écarter la persistance d'interférences à l'analyse du Cr et du V en raison des fortes quantités de carbone (C) et d'oxygène (O) dans l'échantillon, malgré le débit important de gaz de collision. En l'absence de matériaux de référence certifiés pour cette matrice, il est difficile de confirmer les résultats obtenus.

#### **e. L'effet matrice**

Lors de son passage à travers le plasma, l'échantillon, sous forme d'aérosol, est séché, décomposé, dissocié, atomisé et ionisé avec si possible 100 % de conversion en ions monochargés (Figure 16). L'effet de matrice affecte ce processus et déplace l'équilibre ion/atome de l'analyte, faussant potentiellement la quantification de celui-ci [76]. Il convient alors de vérifier, pour toute nouvelle matrice, son impact sur la quantification de chaque analyte.

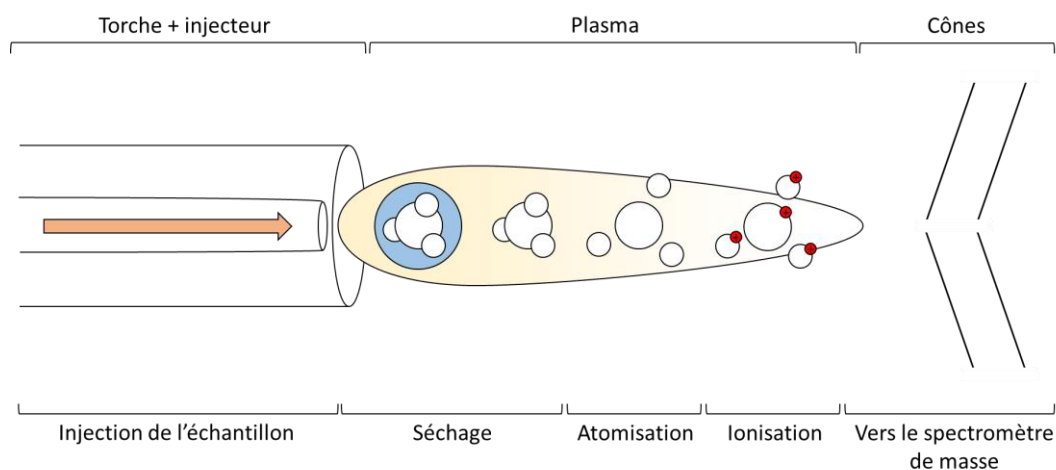


Figure 16. Schéma du processus d'ionisation de l'échantillon dans le plasma

## **5. Protocole de validation de méthode**

La validation des méthodes développées dans cette étude a été basée sur les recommandations du référentiel SH GTA 04 du comité français d'accréditation (COFRAC) [77] et de l'*US environmental protection agency* (US EPA) [78].

### ***a. Gamme de linéarité***

La linéarité de la gamme de calibration est évaluée par la réalisation de 5 points par niveau de concentration. Le coefficient de corrélation de la droite formée par la moyenne de ces points ( $R^2$ ) doit être  $\geq 0,99$ .

### ***b. Limites de quantification***

Les limites haute et basse de quantification (LDQH et LDQ, respectivement) sont estimées par la réalisation de 5 points par niveau de concentration. Elles sont respectivement définies comme les valeurs de concentration les plus hautes et les plus basses pour lesquelles le coefficient de variation (CV) de la moyenne des réplicats et la justesse de la moyenne par rapport à la valeur théorique sont  $< 20 \%$ .

### ***c. Répétabilité***

La répétabilité de l'analyse est estimée par le CV et la justesse de 5 mesures réalisées sur le même échantillon dans les mêmes conditions (même jour, même opérateur, même calibrant), à deux niveaux de concentration différents. CV et justesse doivent être  $< 20 \%$ .

### ***d. Fidélité intermédiaire***

La fidélité intermédiaire est évaluée de la même manière que la répétabilité à la différence qu'une des conditions doit être modifiée. Dans le cas présent, les mesures ont été réalisées sur des jours différents.

### ***e. Contamination inter-échantillon***

La contamination inter-échantillon est réalisée par 3 analyses successives d'un échantillon faiblement concentré (au niveau de la LDQ, soit B1, B2 et B3) suivant directement 3 analyses d'un échantillon fortement concentré (soit H1, H2 et



H3, de moyenne H). La valeur de la contamination, en pourcentage, est égale à «  $(B1 - B3) / (H - B3)$  ».

#### ***f. Effet matrice***

L'effet de la matrice sur l'analyse est estimé par la comparaison des pentes de droites de calibration réalisées dans les mêmes conditions mais en présence ou en absence de matrice (« méthode des ajouts »). Les pentes ne doivent pas différer de plus de 20 %.

### **6. Valeurs de référence**

Actuellement, il existe peu de valeurs de référence définissant les concentrations maximales « recommandées » ou « tolérées » dans les e-liquides ou les e-vapeurs. L'AFNOR, dans ses premières normes volontaires sur la cigarette électronique et les e-liquides, a proposé des valeurs pour quelques analytes spécifiques à partir d'extrapolation de données existantes [42,79]. Ces valeurs, bien qu'elles soient susceptibles de changer dans l'avenir, sont un point de départ dans l'interprétation des concentrations mesurées. Elles seront reportées dans les tableaux de résultats.

# RESULTATS

# RESULTATS

## 1. Développement des méthodes de dosage des ETM par ICP-MS

### a. L'effet matrice

Les solutions de calibrant pour ICP-MS se présentent sous la forme d'ETM dilués à concentration connue dans une solution aqueuse acidifiée. Les premiers tests ont évalué la possibilité d'utiliser une calibration sans matrice, plus rapide et plus simple à mettre en œuvre. Pour cela, l'effet de la matrice sur la détection des ETM a été testé à plusieurs dilutions en solution aqueuse : 1/5<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup> et 1/20<sup>ème</sup> pour les e-liquides et au tiers pour les liquides de barbotage.

#### ❖ E-liquides

Il s'avère d'une part que la présence de matrice affecte l'intensité du signal des étalons internes (EI) utilisés dans cette étude (Rh<sup>103</sup>, Sc<sup>45</sup> et Y<sup>89</sup>), en fonction de sa proportion dans le mélange et du débit de gaz de collision (Tableau 3). D'autre part, l'utilisation seule des EI ne permet pas de corriger de manière efficace l'effet de la matrice e-liquide sur l'analyse des ETM d'intérêt (ANNEXE 2).

Tableau 3. Effet de la matrice e-liquide sur le signal des étalons internes par ICP-MS

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

En conséquence, la calibration sans matrice est abandonnée. Le dosage des ETM par ajouts dosés semble alors être la méthode la plus pertinente dans ce cas de figure. Ayant pour objectif de développer une méthode d'analyse des e-liquides rapide et facilement applicable en routine à un grand nombre d'échantillons, il a été décidé de combiner l'analyse par ajouts dosés à l'analyse par calibration externe. Pour cela, une calibration externe a été réalisée en présence de matrice, en même proportion que dans les échantillons. Dans la mesure où il n'existe pas à l'heure

actuelle de matrice e-liquide (mélange propylène glycol / glycérol) certifiée exempte d'ETM, la gamme de calibration a été réalisée par défaut avec l'e-liquide sans arôme et sans nicotine. La quantité d'ETM apportée par cette matrice a donc été prise en compte pour la quantification. Aussi, la proportion de matrice dans la gamme de calibration et les échantillons a été fixée à 5 %, compromis acceptable entre la limitation des effets de la matrice sur la stabilité du signal et l'objectif d'obtenir des LDQ satisfaisantes.

#### ❖ *Liquides de barbotage*

Au moment de la collecte des aérosols, une certaine proportion de propylène glycol et de glycérol est dissoute dans le liquide de barbotage, rendant cette matrice légèrement différente de l'eau acidifiée. Toujours avec l'objectif d'obtenir des LDQ satisfaisantes et pour conserver une concentration d'acide nitrique tolérée par l'ICP-MS, les liquides de barbotage ont été dilués (faiblement) au tiers. Des effets moins marqués sur le signal des EI, par rapport à ceux observés avec les e-liquides, ont été constatés pour les liquides de barbotages (Tableau 4). De plus, aucun effet matrice significatif n'a été mis en évidence pour les 15 ETM d'intérêt par la méthode des ajouts dosés (ANNEXE 3).

Tableau 4. Effet de la matrice liquide de barbotage sur le signal des étalons internes par ICP-MS

| Matrice              | Signal dans matrice diluée / Signal dans diluant sans matrice (%) |                 |                   |                  |                 |                   |                  |                 |                   |
|----------------------|---|-----------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------|
|                      | Sans gaz de collision   |                 |                   | 75 mL/min (He)   |                 |                   | 130 mL/min (He)  |                 |                   |
|                      | Sc <sup>45</sup>  | Y <sup>89</sup> | Rh <sup>103</sup> | Sc <sup>45</sup> | Y <sup>89</sup> | Rh <sup>103</sup> | Sc <sup>45</sup> | Y <sup>89</sup> | Rh <sup>103</sup> |
| Liquide de barbotage | 133   | 121             | 122               | 115              | 114             | 114               | 122              | 116             | 115               |

En conséquence, l'analyse des liquides de barbotages a été réalisée par calibration externe en absence de matrice.

#### **b. Détermination des paramètres de robustesse**

Une fois les paramètres de traitement d'échantillon et d'analyse ICP-MS définis, la robustesse de la méthode a été évaluée. Gamme de linéarité, limites de quantification, répétabilité, fidélité intermédiaire et contamination inter-échantillon ont été évaluées sur la base des recommandations du COFRAC. L'ensemble des résultats sont présentés dans les Tableau 5 et Tableau 6.

### ❖ *Gamme de linéarité*

Pour des raisons pratiques, la performance de la méthode de dosage a été évaluée sur 10 niveaux de calibration, bien que différents pour certains ETM ou groupes d'ETM, couvrant un peu plus de 3 *log* de concentrations. La gamme de linéarité des 15 ETM testés a été validée sur ces 10 niveaux ( $R^2 \geq 0.99$  et CV des réplicats  $< 20\%$ ), à l'exception de l'Al pour lequel les 3 plus fortes concentrations (10, 16 et 30  $\mu\text{g/L}$ ) ont entraîné la saturation du détecteur.

En routine, considérant l'écart important de concentrations entre le début et la fin de la gamme, les courbes de calibration ont été construites avec ou sans les 3 derniers niveaux en fonction des valeurs ciblées.

### ❖ *Limites de quantification*

Avec une telle méthode de calibration, utilisant une certaine proportion de matrice potentiellement non exempte d'ETM, il n'a pas été jugé pertinent d'estimer les LDQ par la méthode « classique » qui consiste à multiplier par 10 l'écart-type de la moyenne des concentrations d'une série de blancs [77]. La LDQ a donc été déterminée comme la concentration la plus faible testée expérimentalement et satisfaisant les critères définis de précision et justesse. Pour chaque ETM, l'EI conduisant aux meilleurs résultats de LDQ et LHDQ a été choisi.

Pour les e-liquides, la part d'ETM apportée par le diluant a été estimée par l'analyse de 20 réplicats de la solution utilisée. Ce « bruit de fond » est inférieur aux LDQ établies et très inférieur à la plus faible valeur limite actuellement proposée par l'AFNOR de 1000  $\mu\text{g/L}$  ( $< 1\%$  pour tous les ETM sauf Cu et Zn,  $< 10\%$ ) [79]. Ce bruit de fond est donc considéré négligeable selon les recommandations de l'US EPA [78].

### ❖ *Répétabilité et fidélité intermédiaire*

Comme aucun matériel de référence certifié n'existe pour ces deux matrices, la répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été évaluées avec des 2 niveaux de concentration de la gamme de calibration : un faible et un élevé, déterminés pour chaque ETM en fonction de leurs LDQ respectives. Ces niveaux ont aussi été insérés au cours des dosages de routine comme contrôle d'une éventuelle déviation de l'analyse.

### ❖ *Contamination inter-échantillon*

Aucune preuve marquante de contamination possible d'un échantillon vers l'échantillon suivant, au cours d'une série d'analyses, n'a été observée. Néanmoins, dans l'éventualité du passage d'un échantillon extrêmement concentré, les échantillons suivants doivent être vérifiés ainsi que la contamination globale de l'appareillage par le passage de blancs. Au cours de cette étude, aucune concentration mesurée n'a suggéré de contamination significative.

Tableau 5. Paramètres de la méthode de dosage des ETM dans les e-liquides dilués au 1/20<sup>ème</sup> par ICP-MS

| Elément/<br>Isotope | Débit He<br>(mL/min) | Gamme de<br>travail<br>(µg/L) | Etalon<br>interne | LDQ<br>appareil<br>(µg/L) <sup>a</sup> | LDQ<br>e-liquide<br>(µg/L) <sup>b</sup> | Répétabilité / fidélité<br>intermédiaire<br>(%) | Justesse<br>(%) | Contamination<br>Inter-échantillon<br>(%) | Bruit de fond<br>(µg/L) <sup>c</sup> |
|---------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------|--|---|---|-----------------|---|--------------------------------------|
| Al <sup>27</sup>    | 0                    | 0,02 – 30                     | Sc <sup>45</sup>  | 0,2                                    | 4                                       | ≤ 7,6   | ≤ 6,2           | 0,43                                      | 3,83                                 |
| As <sup>75</sup>    | 75                   | 0,02 – 30                     | Sc <sup>45</sup>  | 0,05                                   | 1                                       | ≤ 6,1   | ≤ 10,4          | 0,26                                      | 0,074                                |
| Be <sup>9</sup>     | 0                    | 0,002 – 3                     | Sc <sup>45</sup>  | 0,005                                  | 0,1                                     | ≤ 10,8  | ≤ 7,9           | 0,38                                      | 0,035                                |
| Cd <sup>114</sup>   | 0                    | 0,002 – 3                     | Y <sup>89</sup>   | 0,02                                   | 0,4                                     | ≤ 11,0  | ≤ 4,6           | 0,25                                      | 0,066                                |
| Co <sup>59</sup>    | 75                   | 0,002 – 3                     | Rh <sup>103</sup> | 0,005                                  | 0,1                                     | ≤ 5,4   | ≤ 6,1           | 0,25                                      | 0,094                                |
| Cr <sup>53</sup>    | 130                  | 0,001 – 1,392                 | Rh <sup>103</sup> | 0,186                                  | 3,72                                    | ≤ 12,3  | ≤ 12,1          | 0,27                                      | 1,16                                 |
| Cu <sup>65</sup>    | 130                  | 0,4 – 600                     | Sc <sup>45</sup>  | 1                                      | 20                                      | ≤ 4,5   | ≤ 3,3           | 0,17                                      | 12,4                                 |
| Hg <sup>202</sup>   | 0                    | 0,02 – 30                     | Sc <sup>45</sup>  | 0,2                                    | 4                                       | ≤ 6,5   | ≤ 5,5           | 2,01                                      | 1,65                                 |
| Mn <sup>55</sup>    | 130                  | 0,002 – 3                     | Sc <sup>45</sup>  | 0,08                                   | 1,6                                     | ≤ 7,8   | ≤ 8,6           | 0   | 0,30                                 |
| Ni <sup>60</sup>    | 130                  | 0,02 – 30                     | Sc <sup>45</sup>  | 0,8                                    | 16                                      | ≤ 11,0  | ≤ 6,9           | 0,03                                      | 2,00                                 |
| Pb <sup>208</sup>   | 0                    | 0,02 – 30                     | Sc <sup>45</sup>  | 0,05                                   | 1                                       | ≤ 4,0   | ≤ 8,7           | 0,17                                      | 0,44                                 |
| Sb <sup>121</sup>   | 0                    | 0,002 – 3                     | Sc <sup>45</sup>  | 0,005                                  | 0,1                                     | ≤ 14,3  | ≤ 7,3           | 0,36                                      | 0,068                                |
| Tl <sup>205</sup>   | 0                    | 0,002 – 3                     | Sc <sup>45</sup>  | 0,005                                  | 0,1                                     | ≤ 8,9   | ≤ 9,4           | 0,39                                      | 0,022                                |
| V <sup>51</sup>     | 130                  | 0,002 – 3                     | Sc <sup>45</sup>  | 0,02                                   | 0,4                                     | ≤ 12,2  | ≤ 4,3           | 0,20                                      | 0,13                                 |
| Zn <sup>66</sup>    | 130                  | 1 – 1500                      | Rh <sup>103</sup> | 10                                     | 200                                     | ≤ 7,1   | ≤ 11,3          | 0,22                                      | 69,0                                 |

<sup>a</sup> Représente la plus petite concentration quantifiable dans un échantillon dilué.

<sup>b</sup> Représente la plus petite concentration quantifiable dans les e-liquides.

<sup>c</sup> Représente la part d'ETM apportée par la solution de dilution des échantillons (prend en compte le facteur de dilution des e-liquides).

Tableau 6. Paramètres de la méthode de dosage des ETM dans les liquides de barbotage dilués au 1/3<sup>ers</sup> par ICP-MS

| Elément/<br>Isotope      | Débit He<br>(mL/min) | Gamme de travail<br>(µg/L) | Etalon<br>interne | LDQ<br>appareil<br>(µg/L) <sup>a</sup> | LDQ<br>liquide de barbotage<br>(µg/L) <sup>b</sup> | Répétabilité / fidélité<br>intermédiaire<br>(%) | Justesse<br>(%) | Contamination<br>Inter-échantillon<br>(%) |
|--------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|--|--|---|-----------------|---|
| <b>Al</b> <sup>27</sup>  | 0                    | 0,02 – 30                  | Rh <sup>103</sup> | 0,2                                    | 0,6  | ≤ 10,2  | ≤ 13,6          | 0,18                                      |
| <b>As</b> <sup>75</sup>  | 75                   | 0,02 – 30                  | Sc <sup>45</sup>  | 0,02                                   | 0,06   | ≤ 2,7   | ≤ 6,6           | 0,06                                      |
| <b>Be</b> <sup>9</sup>   | 0                    | 0,002 – 3                  | Rh <sup>103</sup> | 0,002                                  | 0,006  | < 8,2   | < 6,7           | 0,10                                      |
| <b>Cd</b> <sup>114</sup> | 0                    | 0,002 – 3                  | Rh <sup>103</sup> | 0,002                                  | 0,006  | ≤ 7,4   | < 6,2           | 0,14                                      |
| <b>Co</b> <sup>59</sup>  | 75                   | 0,002 – 3                  | Rh <sup>103</sup> | 0,01                                   | 0,03   | ≤ 4,9   | ≤ 2,4           | 0,08                                      |
| <b>Cr</b> <sup>53</sup>  | 130                  | 0,001 – 1,392              | Sc <sup>45</sup>  | 0,186                                  | 0,558  | < 3,5   | < 0,7           | 0   |
| <b>Cu</b> <sup>65</sup>  | 130                  | 0,4 – 600                  | Rh <sup>103</sup> | 0,4                                    | 1,2  | ≤ 3,1   | ≤ 2,4           | 0,06                                      |
| <b>Hg</b> <sup>202</sup> | 0                    | 0,02 – 30                  | Rh <sup>103</sup> | 0,1                                    | 0,3  | ≤ 7,6   | ≤ 6,5           | 1,39                                      |
| <b>Mn</b> <sup>55</sup>  | 130                  | 0,002 – 3                  | Sc <sup>45</sup>  | 0,01                                   | 0,03   | ≤ 9,8   | ≤ 11,6          | 0,11                                      |
| <b>Ni</b> <sup>60</sup>  | 130                  | 0,02 – 30                  | Sc <sup>45</sup>  | 0,05                                   | 0,15   | ≤ 3,9   | ≤ 3,4           | 0,06                                      |
| <b>Pb</b> <sup>208</sup> | 0                    | 0,02 – 30                  | Rh <sup>103</sup> | 0,02                                   | 0,06   | ≤ 3,6   | ≤ 7,8           | 0,08                                      |
| <b>Sb</b> <sup>121</sup> | 0                    | 0,002 – 3                  | Rh <sup>103</sup> | 0,01                                   | 0,03   | ≤ 5,0   | ≤ 3,6           | 0,14                                      |
| <b>Tl</b> <sup>205</sup> | 0                    | 0,002 – 3                  | Rh <sup>103</sup> | 0,005                                  | 0,015  | ≤ 4,8   | ≤ 12,5          | 0,14                                      |
| <b>V</b> <sup>51</sup>   | 130                  | 0,002 – 3                  | Sc <sup>45</sup>  | 0,01                                   | 0,03   | ≤ 8,3   | ≤ 7,5           | 0,07                                      |
| <b>Zn</b> <sup>66</sup>  | 130                  | 1 – 1500                   | Sc <sup>45</sup>  | 5                                      | 15   | ≤ 7,2   | ≤ 8,7           | 0,06                                      |

<sup>a</sup> Représente la plus petite concentration quantifiable dans un échantillon dilué.

<sup>b</sup> Représente la plus petite concentration quantifiable dans les liquides de barbotage.



## 2. Application aux e-liquides et e-vapeurs

Les méthodes de dosage ainsi développées ont été appliquées au dosage des 15 ETM dans 54 e-liquides et dans les e-vapeurs issues de 6 d'entre eux.

### a. *E-liquides*

Les concentrations des 15 ETM mesurées dans l'ensemble des 54 e-liquides sont reportées en ANNEXE 4. Pour une meilleure compréhension, le Tableau 7 résume la distribution des concentrations mesurées dans les échantillons testés et compare ces valeurs aux concentrations actuellement recommandées par l'AFNOR.

Tableau 7. Distribution des concentrations des ETM dans 54 e-liquides (27 arômes différents, sans et avec 16 mg/mL de nicotine).

| Elément   | < LDQ <sup>a</sup><br>(%) | Minimum<br>(µg/L) | Maximum<br>(µg/L) | Moyenne <sup>b</sup><br>(µg/L) | Recommandations AFNOR<br>(µg/L) [79] |
|-----------|---------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Al</b> | 0                         | 8,82              | 30,7              | 12,9                           |                                      |
| <b>As</b> | 43                        | < 1               | 3,42              | 1,57                           | 3000                                 |
| <b>Be</b> | 100                       |                   | < 0,1             |                                |                                      |
| <b>Cd</b> | 100                       |                   | < 0,4             |                                | 1000                                 |
| <b>Co</b> | 19                        | < 0,1             | 0,88              | 0,26                           |                                      |
| <b>Cr</b> | 0                         | 4,08              | 11,5              | 7,16                           |                                      |
| <b>Cu</b> | 96                        | < 20              | 30,6              | 27,0                           |                                      |
| <b>Hg</b> | 94                        | < 4               | 4,5               | 4,4                            | 1000                                 |
| <b>Mn</b> | 70                        | < 1,6             | 8,4               | 4,0                            |                                      |
| <b>Ni</b> | 100                       |                   | < 16              |                                |                                      |
| <b>Pb</b> | 100                       |                   | < 1               |                                | 10000                                |
| <b>Sb</b> | 0                         | 0,40              | 214               | 7,21 <sup>c</sup>              | 5000                                 |
| <b>Tl</b> | 100                       |                   | < 0,1             |                                |                                      |
| <b>V</b>  | 80                        | < 0,4             | 1,36              | 0,60                           |                                      |
| <b>Zn</b> | 96                        | < 200             | 510               | 418                            |                                      |

<sup>a</sup> Représente le pourcentage d'échantillons pour lesquels les concentrations sont < LDQ.

<sup>b</sup> La moyenne est calculée uniquement sur les valeurs > LDQ.

<sup>c</sup> Ignorant les 2 concentrations les plus élevées mesurées dans les 54 e-liquides (99,3 et 214 µg/L), la moyenne des concentrations en Sb serait de 1,47 µg/L.

Des concentrations faibles en ETM ont été mesurées dans les 54 e-liquides, d'une manière générale < 200 µg/L, très souvent < LDQ et systématiquement inférieures aux limites proposées par l'AFNOR. Deux échantillons, du même arôme (cerise), sans et avec 16 mg/mL de nicotine, possédaient des concentrations

relativement plus élevées en Sb (214 et 99.3 µg/L, respectivement) et en Zn (325 et 510 µg/L, respectivement).

Les concentrations en ETM des 6 e-liquides utilisés pour la génération des e-vapeurs sont reportées dans le Tableau 8.

Tableau 8. Concentrations des ETM (en µg/L) dans les 6 e-liquides utilisés pour générer des e-vapeurs

| ETM | A-/N- | A-/N+ | TB/N- | TB/N+ | MC/N- | MC/N+ |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Al  | 12    | 15    | 15    | 19    | 17    | 12    |
| As  | 1,5   | 1,5   | ~     | ~     | 1,8   | ~     |
| Be  | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     |
| Cd  | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     |
| Co  | 0,27  | 0,22  | 0,20  | ~     | 0,56  | ~     |
| Cr  | 4,1   | 4,6   | 6,4   | 6,5   | 9,1   | 8,9   |
| Cu  | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     | 31    |
| Hg  | ~     | ~     | ~     | 4,5   | ~     | ~     |
| Mn  | 3,1   | 3,3   | ~     | ~     | 4.3   | ~     |
| Ni  | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     |
| Pb  | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     |
| Sb  | 1,5   | 1,5   | 1,4   | 1,8   | 1,9   | 1,2   |
| Tl  | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     |
| V   | 0,64  | 0,44  | 0,56  | 0,64  | 0,78  | ~     |
| Zn  | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     | ~     |

« ~ » : < LDQ

### **b. E-vapeurs et fumées**

Dans les e-vapeurs, Be, Cu, Hg, V et Zn n'ont été quantifiés dans aucun des échantillons. Des concentrations > LDQ d'Al, Co, Mn, Ni et Pb ont été mesurées dans les e-vapeurs, mais comparables aux blancs expérimentaux. La présence de ces éléments dans les échantillons résulte probablement d'une contamination de la machine à fumer ou des dispositifs de collection et stockage. Seuls le Cd, le Cr et le Sb ont été quantifiés dans les e-vapeurs. As, Cd, Pb et Tl ont été quantifiés dans les fumées de cigarette 3R4F.

Les concentrations des ETM mesurées dans les blancs expérimentaux, les e-vapeurs et les fumées (en pg/bouffée) sont reportées dans le Tableau 9. Pour une lecture facilitée, seuls les ETM pour lesquels au moins une valeur est > LDQ ou > BLC dans les e-vapeurs ou les fumées sont présentés.

Tableau 9. Concentrations des ETM (en pg/bouffée) mesurées dans les blancs expérimentaux, les e-vapeurs et les fumées générés par la machine à fumer

| ETM | BLC         | E-vapeur |                          |                          |                          |                         |           |       | Fumée |             | AFNOR<br>[42] |
|-----|-------------|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------|-------|-------|-------------|---------------|
|     |             | LDQ      | A-/N-                    | A-/N+                    | TB/N-                    | TB/N+                   | MC/N-     | MC/N+ | LDQ   | 3R4F        |               |
| As  | ~           | 12,5     | ~                        | ~                        | ~                        | ~                       | ~         | ~     | 25    | 147 ± 6,3   | 10 000        |
| Cd  | ~           | 1,25     | ~                        | 2,2 ± 0,6                | ~                        | ~                       | 7,7 ± 2,8 | ~     | 2,5   | 1574 ± 66,5 | 10 000        |
| Cr  | ~           | 116      | ~                        | 185 ± 32,5               | 183 ± 26,4               | 158 ± 36,3              | ~         | ~     | 232   | ~           | 15 000        |
| Pb  | 93,9 ± 85,3 | 12,5     | 64,6 ± 21,6 <sup>b</sup> | 71,5 ± 46,4 <sup>b</sup> | 86,7 ± 28,2 <sup>b</sup> | 56,3 ± 8,5 <sup>b</sup> | ~         | ~     | 25    | 578 ± 20,7  | 25 000        |
| Sb  | ~           | 6,25     | 25,9 ± 16,5              | 15,4 ± 9,4               | 10,5 ± 5,0               | ~                       | 7,7 ± 0,6 | ~     | 12,5  | ~           | 100 000       |
| Tl  | ~           | 3,1      | ~                        | ~                        | ~                        | ~                       | ~         | ~     | 6,2   | 35,7 ± 4,9  |               |

Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart type des 3 recueils consécutifs et indépendants. « ~ » : < LDQ.

<sup>a</sup> Les LDQ appliquées à l'analyse des blancs expérimentaux sont les mêmes que pour les e-vapeurs

<sup>b</sup> Considérant les concentrations mesurées dans les blancs, l'origine des émissions de Pb dans les e-vapeurs n'a pu être déterminée

# DISCUSSION

## DISCUSSION

---

En raison de leurs potentiels effets nocifs sur la santé humaine, les ETM sont des composés d'intérêt toxicologique majeur et leur étude dans les émissions de cigarettes électroniques est tout à fait justifiée. En effet, la contamination ou mauvaise qualité des e-liquides ainsi que le relargage d'ETM par les composants des e-cigarettes pourraient exposer les utilisateurs par l'intermédiaire des e-vapeurs [51,80]. Cependant, cette problématique n'a été que peu étudiée jusqu'à présent.

Tout comme pour de nombreux composés, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de référence publiée pour l'analyse des ETM dans les e-liquides ou les e-vapeurs [57]. Alors que l'ICP-MS et l'ICP-AES sont les techniques analytiques les plus utilisées [46,50–52,54,80–82], un bon nombre de paramètres relatifs aux protocoles généraux d'analyse diffèrent d'une étude à une autre. Notamment, plusieurs méthodes de collection des e-vapeurs ont été publiées : solution d'acides nitrique et chlorhydrique dans une flasque [51,80,82], barboteur contenant du méthanol [46], filtres ou membranes de cellulose [81,83] ou « EP tube » (terme repris de la publication) relié à un barboteur contenant de l'acide nitrique [52]. Varient aussi les paramètres de génération des e-vapeurs incluant l'utilisation d'une machine à fumer ou d'un dispositif « fait maison » dans le cas contraire, le paramétrage de différents profils de génération de bouffée ou de différents volumes d'échantillonnage (de 1 à 150 bouffées selon les études). De plus l'e-liquide (visqueux) et l'e-vapeur (dense et collante) sont des matrices relativement singulières qui sont susceptibles d'interférer avec des techniques non spécifiques ou prévues pour d'autres matrices (comme l'eau ou l'air en l'occurrence). L'observation d'effet matrice significatif de l'e-liquide sur l'analyse ICP-MS, dans le travail ici décrit, en est un très bon exemple. En conséquence et en attendant la publication de méthodes de référence transposables, il est nécessaire d'étudier et de décrire au mieux les paramètres de robustesse des techniques utilisées pour faciliter l'interprétation des résultats.

Les méthodes de dosage par ICP-MS développées dans cette étude, validées selon des recommandations officielles (COFRAC et US EPA) et démontrant un niveau de robustesse satisfaisant, sont aujourd'hui publiées dans la littérature [84,85]. Toutefois, il faut noter que les techniques utilisées pour générer et collecter les e-

vapeurs et fumées possèdent certaines limites qui doivent être prises en compte. Notamment, bien que l'utilisation d'une machine à fumer soit préférable à des dispositifs « moins adaptés » (comme des seringues à gaz actionnées manuellement ou des pompes péristaltiques), il est difficile d'estimer à l'heure actuelle dans quelle mesure le cheminement des e-vapeurs et fumées, à travers cette machine jusqu'au matériel de collection, affecte leurs concentrations en ETM. Il est possible d'imaginer que des ETM puissent être retenus dans la machine à fumer, par adsorption et condensation des e-vapeurs par exemple, ou au contraire relargués par des éléments de celle-ci. Pour des raisons pratiques et pour ne pas risquer d'altérer la génération de la bouffée (volume et durée d'aspiration), les barboteurs ont été volontairement positionnés en sortie de machine à fumer. De plus, il était important dans ce projet, associé à une étude *in vitro* utilisant la même machine à fumer, de caractériser les e-vapeurs auxquelles les cellules ont été exposées. Pour pallier à ce biais, au moins en partie, des blancs expérimentaux ont donc été réalisés, de la même façon que les recueils d'e-vapeurs mais sans e-cigarette connectée à la machine à fumer. Ces blancs ont permis de distinguer la part d'ETM émise dans les e-vapeurs de celle issue de la technique d'analyse. Cependant, le rendement de collection des ETM dans les e-vapeurs reste mal connu. Le meilleur indicateur actuel est la concentration des ETM dans la fumée de cigarette 3R4F : comparées aux données de Pappas *et al.*, les concentrations des fumées de 3R4F en As (2.5 vs. 1.18 ng/cigarette dans notre étude), Cd (34.5 vs. 12.6 ng/cigarette) and Pb (9.1 vs. 4.3 ng/cigarette) sont, bien que sensiblement inférieures, du même ordre de grandeur [69]. Ainsi, ne pouvant garantir une méthode de collecte 100 % quantitative, l'ensemble des résultats des e-vapeurs peut tout de même être considéré comme proche de la réalité. De plus, l'un des points forts de cette étude est la comparaison des concentrations mesurées dans les e-vapeurs et fumées, générées et collectées dans les mêmes conditions.

Les concentrations en ETM mesurées dans les e-liquides dans cette étude sont relativement faibles et homogènes pour l'ensemble des e-liquides. Seul un arôme, l'arôme cerise, présentait des concentrations légèrement plus élevées en Sb et en Zn (jusqu'à 214 et 510 µg/L, respectivement). Des concentrations comparables ont été rapportées par Palazollo *et al.* et Saffari *et al.* (Tableau 10). Ces résultats sont largement inférieurs aux premières recommandations de l'AFNOR et suggèrent

un faible risque d'exposition aux ETM par les e-liquides. Toutefois, une contamination par l'arôme ne peut être exclue et ces résultats doivent être confirmés par une analyse plus large d'autres e-liquides, d'autres marques.

Tableau 10. Concentrations en ETM (en µg/L) d'e-liquides rapportées dans la littérature

| Référence              | Présente étude [84]       | Safari <i>et al.</i> [50]                      | Palazollo <i>et al.</i> [81] | Hess <i>et al.</i> [54]        |
|------------------------|---------------------------|--|------------------------------|--------------------------------|
| <b>E-liquide</b>       | 54 e-liquides (27 arômes) | 1 e-liquide                                    | 1 e-liquide arôme tabac      | 10 e-liquides dans cartomiseur |
| <b>Al</b>              | 8,82 – 12,9               | 10,2   | 7.7                          | -                              |
| <b>As</b>              | < 1 – 3,42                | -  | 0.08                         | -                              |
| <b>Be</b>              | < 0,1                     | -  | -                            | -                              |
| <b>Cd</b>              | < 0,4                     | 0.08   | < 0.01                       | 0.137 – 755                    |
| <b>Co</b>              | < 0,1 – 0,88              | 0.09   | -                            | -                              |
| <b>Cr</b>              | 4,08 – 11,5               | 2.37   | -                            | 41.5 – 16900                   |
| <b>Cu</b>              | < 20 – 30,6               | 0.54   | < 0.01                       | -                              |
| <b>Hg</b>              | < 4 – 4,5                 | -  | -                            | -                              |
| <b>Mn</b>              | < 1,6 – 8,4               | 1.84   | 0.159                        | 11.8 – 31500                   |
| <b>Ni</b>              | < 16                      | -  | 0.161                        | 13.7 – 72700                   |
| <b>Pb</b>              | < 1                       | 0.16   | < 0.01                       | 3.17 – 4870                    |
| <b>Sb</b>              | 0,40 – 214                | 1.02   | -                            | -                              |
| <b>Tl</b>              | < 0,1                     | -  | -                            | -                              |
| <b>V</b>               | < 0,4                     | 1.61   | -                            | -                              |
| <b>Zn</b>              | < 200                     | 2.88   | 0.51                         | -                              |
| <b>Autres éléments</b> | -                         | Ag, B, Ca, Fe, K, La, Mg, Mo, Rb, S, Sn, Ti, W | Fe                           | -                              |

Il faut noter que les concentrations limites recommandées par l'AFNOR paraissent relativement élevées, notamment lorsqu'on les compare aux normes européennes pour la qualité des eaux destinées à la consommation humaine [86]. Cependant, supposant une consommation journalière de 2,5 L d'eau et de 5 mL d'e-liquide (soit environ entre 200 et 1000 bouffées en fonction du modèle d'e-cigarette utilisé), les vapoteurs seraient exposés sur une journée à des niveaux d'ETM comparables à ceux des eaux de boisson (Tableau 11).

Tableau 11. Extrapolation des concentrations limites des ETM dans l'e-liquide et dans l'eau destinée à la consommation humaine à une valeur d'exposition journalière

|           | E-liquide            |                            | Eau  |                            |
|-----------|----------------------|----------------------------|--|----------------------------|
|           | AFNOR [79]<br>(µg/L) | Extrapolation<br>(µg/jour) | Conseil de l'Union<br>Européenne [86] (µg/L) | Extrapolation<br>(µg/jour) |
| <b>As</b> | 3000                 | 15                         | 10   | 25                         |
| <b>Cd</b> | 1000                 | 5                          | 5  | 12,5                       |
| <b>Hg</b> | 1000                 | 5                          | 1  | 2,5                        |
| <b>Pb</b> | 10000                | 50                         | 10   | 25                         |
| <b>Sb</b> | 5000                 | 25                         | 5  | 12,5                       |

Les extrapolations ont été réalisées en se basant sur une consommation journalière de 5 mL d'e-liquide et 2,5 L d'eau.

Alors que ces observations s'appliquent pour des e-liquides vendus en flacon, Hess *et al.* ont rapporté des concentrations en Cd, Cr, Mn, Ni et Pb très variables et parfois bien plus élevées dans des e-liquides issus de cartomiseurs pré-remplis (Tableau 10). Ceci soulève la question du conditionnement des e-liquides. En effet, certaines e-cigarettes ne sont pas rechargeables en e-liquide, notamment les produits de 1<sup>ère</sup> génération, et utilisent comme consommables des cartomiseurs pré-remplis. Comme l'avancent les auteurs, l'origine de ces ETM pourrait être un défaut de qualité ou la conséquence du contact prolongé de l'e-liquide avec les composants du cartomiseur. Les résistances chauffantes par exemple, sont majoritairement fabriquées en alliage chrome/nickel ou fer/chrome/aluminium. Williams *et al.* ont par ailleurs montré la présence de plusieurs métaux comme l'étain dans différents composants d'e-cigarette [51,79,81]. Ces résultats suggèrent un niveau potentiel d'exposition aux ETM plus important et méritent d'être confirmés par d'autres études. En supposant le relargage d'ETM par des composants en contact avec l'e-liquide, il serait aussi intéressant d'étudier l'effet de la durée de conservation des e-liquides et cartomiseurs sur la concentration de ces ETM.

Bien que les concentrations en ETM des e-liquides devraient être, dans l'intérêt du consommateur, les plus faibles possibles, elles ne sont pas le reflet direct de l'exposition à proprement parler. Le relargage d'ETM par les composants des cigarettes électroniques étant soupçonné, l'indicateur le plus pertinent est donc leur concentration dans les e-vapeurs.

Les concentrations mesurées dans cette étude sont relativement faibles, de l'ordre de quelques dizaines à centaines de pg/bouffée. Seuls le Cd, le Cr et le Sb



ont été quantifiés dans les e-vapeurs. Des concentrations largement plus importantes en As, Cd, Pb et Tl ont été mesurées dans les fumées de 3R4F alors que Cr et Sb n'y ont pas été quantifiés. Cependant, les LDQ des ETM étant 2 fois plus élevées pour les fumées que pour les e-vapeurs, en raison du nombre de bouffées collectées, il est difficile de conclure dans quelle mesure le Cr et le Sb sont plus (ou moins) concentrés dans l'un ou l'autre des échantillons. Ces résultats sont issus de tests réalisés sur un seul modèle de cigarette électronique, d'une seule marque et devraient être confirmés par l'analyse d'autres dispositifs ou la recherche d'autres ETM. Ils suggèrent néanmoins que l'utilisation de ces e-cigarettes et e-liquides entraînerait un faible risque d'exposition aux ETM, en comparaison à l'utilisation de la cigarette classique et des limites proposées par l'AFNOR.

La comparaison de ces résultats avec la littérature est assez compliquée pour les raisons précédemment citées. De plus, comme dans cette étude, les valeurs publiées sont généralement à interpréter par rapport à des « blancs » ou « contrôles » éventuellement réalisés. Goniwicz *et al.* ont rapporté des concentrations en Cd, Ni et Pb plus élevées que dans cette étude (jusqu'à 3800 pg/bouffée pour le Pb) [46]. Toutefois les auteurs ont mesuré des concentrations d'ETM proches voire comparables pour des « échantillons blancs » et un inhalateur médical de nicotine et n'ont finalement pas conclu sur les sources potentielles de ces ETM. De la même manière, Palazollo *et al.* n'ont pas mis en évidence d'émission significative d'Al, As, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb et Zn par rapport à leur contrôle. Seul du Ni a été retrouvé à une concentration de 422 pg/bouffée [81]. Margham *et al.* ont uniquement retrouvé Cr et Ni dans leurs échantillons d'e-vapeur à 399 et 617 pg/bouffée, respectivement, As, Cu, Fe et Zn étant comparables à leurs blancs expérimentaux. Des concentrations très variables en fonction des modèles d'e-cigarette et parfois supérieures à celles mesurées dans la fumée de cigarette conventionnelle ont été rapportées dans 3 études successives de Williams *et al.*, allant de quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers de pg/bouffée. Les auteurs ont aussi mis en évidence, entre autres, la présence significative de silice et d'étain dans les e-vapeurs, en relation notamment avec les matériaux utilisés dans les composants des e-cigarettes et une mauvaise qualité de fabrication [51, 80,82]. Les concentrations les plus importantes ont été mesurées par Lerner *et al.* : de 24300 à 224700 pg/bouffée de Cu [83]. Quant au vapotage passif, Saffari *et al.* et

*Schober et al.* n'ont pas mis en évidence d'impact majeur du vapotage sur la quantité d'ETM mesurée dans l'air intérieur [50,87].

Les différentes études publiées ne s'accordent pas totalement sur la gamme d'ETM émise dans les e-vapeurs, leurs niveaux de concentration ou la comparaison e-cigarette vs cigarette conventionnelle. Compte tenu de la variabilité des modèles de cigarette électronique utilisés et des limitations actuelles, comparer directement ces données paraît donc quelque peu hasardeux. Néanmoins ces éléments confirment la nécessité de poursuivre les investigations concernant la présence des ETM dans les e-vapeurs et démontrent l'intérêt de contrôler et réglementer la fabrication des e-cigarettes.

L'exposition chronique aux ETM *via* les émissions de cigarette électronique suppose pour le consommateur une augmentation du risque de survenue de pathologies respiratoires (telles que l'asthme, des pneumonies ou fibroses), viscérales (atteinte spécifique d'organe comme le rein par exposition au Cd) et même cancéreuses [61,65]. Toutefois, l'extrapolation des données actuelles reste pour l'instant limitée. Tout d'abord, il semble que la qualité et le modèle d'e-cigarette ait un impact sur la quantité d'ETM émise. Il est évident qu'une vision plus large des différents modèles et marques sur le marché est nécessaire, en particulier les modèles les plus récents. Dans l'idéal, cette étude devrait être réalisée par un même laboratoire. En second lieu, les valeurs de référence actuellement proposées par l'AFNOR sont extrapolées à partir de recommandations préexistantes pour les médicaments inhalés et sur la base d'une consommation moyenne de 200 bouffées par jour. Même si cela représente un point de départ intéressant, il est possible que ces valeurs doivent être réajustées. A titre d'exemple, les concentrations de ces ETM dans la fumée de cigarette conventionnelle y sont aussi largement inférieures. De plus, il semble qu'il n'existe pas de « profil type » de vapoteur : Robinson *et al.* ont rapporté des consommations journalières allant de 24 à 1091 bouffées sur un échantillon de 22 individus [88]. Aussi, bon nombre d'ETM sont plus ou moins toxiques selon leur forme chimique (oxydée ou non par exemple). Aujourd'hui, aucune étude n'a recherché les différentes formes des ETM. Les futures investigations devraient inclure la spéciation de certains métaux comme le Cr et l'As dans leur analyse. Enfin, les ETM se retrouvent dans les e-vapeurs au sein d'un mélange de plusieurs composés chimiques auquel les consommateurs seront

exposés à plus ou moins long terme. La part de toxicité imputable aux métaux sera probablement difficile à évaluer. En outre, les effets aigus les plus communs rapportés associés au vapotage sont des irritations de la bouche et de la gorge, des toux sèches, des nausées et maux de tête [45]. Ces symptômes non spécifiques, décrits pour l'inhalation de nombreux ETM tels que Cd, Cr, Cu, Sb, Sn, le sont aussi pour d'autres composés comme les carbonylés, aussi émis dans les e-vapeurs [47, 53, 55,89].

Dans une interprétation des données publiées en 2014, Farsalinos *et al.* ont estimé, volontairement par excès, la consommation d'un vapoteur à 1200 bouffées/jour. Utilisant comme référence des valeurs limites d'exposition extrapolées de la *U.S. Pharmacopeia*, de l'*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* et du *National Institute of Occupational Safety and Health*, les auteurs ont ainsi conclu que l'exposition aux ETM par le vapotage était inférieure aux limites proposées et n'entraînerait pas d'effet significatif sur la santé de fumeurs passant à l'e-cigarette [90]. Il faut toutefois noter que ces travaux se sont basés uniquement sur les résultats issus de deux études. D'autres modèles d'analyse de risque ont été proposés pour d'autres composés. Notamment, Logue *et al.* ont récemment publié un modèle d'analyse du risque associé à l'émission de composés carbonylés incluant des paramètres tels que le facteur de rétention pulmonaire de l'analyte ou différents « types » de vapotage [91]. Les futures études pourraient s'inspirer de ce type de méthodologie. Néanmoins l'ensemble de ces données n'est pas encore disponible pour les ETM et les limites actuelles sur la comparabilité des valeurs publiées limiteraient l'interprétation de telles estimations.

Bien que les études actuellement publiées ne s'accordent pas totalement sur le niveau de risque encouru par un vapoteur en comparaison à un fumeur, l'émission d'ETM par les cigarettes électroniques constitue une source d'exposition supplémentaire non souhaitée pour les vapoteurs n'ayant jamais fumé.

Une des prochaines étapes et non des moindres, dans l'analyse des ETM dans les émissions de cigarette électronique, est la publication de méthodes de référence. En effet, en l'absence d'étude comparative inter-laboratoire, il est difficile d'estimer l'équivalence de deux méthodes publiées. Actuellement, des normes européennes et internationales sont en cours d'élaboration et devraient prochainement proposer un ou plusieurs protocoles de référence. Ces normes

devraient couvrir l'ensemble de la chaîne analytique, de la génération des bouffées à l'analyse de l'échantillon. Outre la méthode de collecte des e-vapeurs, qui fait partie des différences majeures entre les études actuelles, le profil de vapotage à utiliser sur les machines à fumer est aussi un point important à maîtriser. Alors que des profils de génération de bouffée sont réglementairement définis pour la cigarette conventionnelle [92], aucun profil type de vapotage n'est actuellement décrit. Le profil recommandé par le CORESTA s'est principalement basé sur des contraintes pratiques liées aux machines à fumer et aux e-cigarettes de l'époque [73]. Aujourd'hui, des études ont montré que la topographie des bouffées des vapoteurs variaient d'un individu à l'autre ou pour un même individu [88,93], ainsi qu'en fonction du dispositif utilisé [94]. Il est évident que l'utilisation d'un seul profil faciliterait la comparaison des études de caractérisation des e-vapeurs, quels que soient les composés analysés. Néanmoins, il est possible que ledit profil ne soit pas totalement adapté à tous les dispositifs testés. Dans ce cas, des résultats obtenus sur des bouffées générées de manière non réaliste sont-ils raisonnablement interprétables et comparables ? Le même type d'interrogation peut être posé, entre autres, sur l'effet du vieillissement des e-cigarettes ou de l'enchaînement d'un grand nombre de bouffées. Pour résumer, l'analyse des ETM dans les émissions de cigarette électronique manque encore cruellement de recul et un certain nombre de points sont à approfondir. Les méthodes développées dans cette étude peuvent servir de base à la mise en place de nouveaux tests ou de méthodes de référence.

Les démarches utilisées et questions posées dans cette étude s'appliquent également à l'ensemble des composés présents dans les e-liquides et les e-vapeurs. La caractérisation précise et la plus exhaustive possible des émissions des cigarettes électroniques est un objectif crucial en termes de prévention sanitaire et de réglementation des produits.

# CONCLUSION

## CONCLUSION

---

La caractérisation physicochimique des e-liquides et des e-vapeurs est une étape importante dans l'étude de l'impact sanitaire de la cigarette électronique et les ETM font partie des composés d'intérêt toxicologique majeur à étudier. Les résultats de cette étude ont montré, en accord avec la littérature, un faible risque d'exposition aux métaux par l'intermédiaire d'e-liquides conditionnés en flacons. Nous disposons maintenant de la méthodologie pour élargir l'analyse à d'autres e-liquides, d'autres marques et autrement conditionnés. Les concentrations des e-vapeurs en ETM mesurées dans cette étude sont relativement basses par rapport à la cigarette conventionnelle, à la littérature disponible et aux valeurs limites actuellement proposées par l'AFNOR, ce qui suggère un faible risque d'exposition pour le consommateur. Toutefois, les données de la littérature sont relativement discordantes et insuffisantes pour conclure sur la dangerosité absolue des émissions des ETM par la cigarette électronique. Bien que les techniques analytiques aient été rigoureusement développées et validées dans cette étude, les conditions de génération et de collection des e-vapeurs présentent encore aujourd'hui plusieurs limites. L'harmonisation des protocoles d'analyse, par de futures normes et réglementations, est essentielle pour faciliter l'interprétation et la comparaison des données. De même, une vision large des différents modèles et marques de cigarette électronique permettra une meilleure estimation du risque d'exposition des vapoteurs et « vapoteurs passifs ». Les méthodes développées dans cette étude pourront être utilisées comme base pour la mise en place de nouveaux tests.

# BIBLIOGRAPHIE

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Commission Européenne. Directive 2014/40/UE du Parlement Européen et du Conseil du 3 avril 2014 relative au rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres en matière de fabrication, de présentation et de vente des produits du tabac et des produits connexes, et abrogeant la directive 2001/37/CE. 2014 [consulté le 20 juill 2015]. Disponible sur : [http://ec.europa.eu/health/tobacco/docs/dir\\_201440\\_fr.pdf](http://ec.europa.eu/health/tobacco/docs/dir_201440_fr.pdf)
2. WHO | Tobacco [Internet]. WHO. [consulté le 2 août 2017]. Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>
3. Attitudes of Europeans towards tobacco and electronic cigarettes [Internet]. European commission; 2017 [consulté le 14 juin 2017]. Disponible sur : <http://ec.europa.eu/commfrontoffice/publicopinion/index.cfm/General/index>
4. INPES - Tabac - Le produit : Le produit : composition et effets sur l'organisme. [consulté le 3 août 2017]. Disponible sur : <http://inpes.santepubliquefrance.fr/10000/themes/tabac/tabac-composition.asp>
5. Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous compounds in tobacco smoke. Int J Environ Res Public Health. 2011;8:613-28.
6. Benowitz NL. Nicotine Addiction. N Engl J Med. 2010;362:2295-303.
7. OMS | Tabagisme [Internet]. WHO. [consulté le 3 août 2017]. Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/fr/>
8. Carter BD, Abnet CC, Feskanich D, Freedman ND, Hartge P, Lewis CE, Ockene JK, Prentice RL, Speizer FE, Thun MJ, Jacobs EJ. Smoking and mortality--beyond established causes. N Engl J Med. 2015;372:631-40.
9. Ribassin-Majed L, Hill C. Trends in tobacco-attributable mortality in France. Eur J Public Health. 2015;25:824-8.
10. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic: Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship [Internet]. World Health Organization; 2013 [consulté le 8 juill 2016]. Disponible sur : [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85380/1/9789241505871\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85380/1/9789241505871_eng.pdf)
11. Plan cancer 2014-2019 : priorités et objectifs - Plan cancer | Institut National Du Cancer [Internet]. [consulté le 6 mars 2017]. Disponible sur : <http://www.e-cancer.fr/Plan-cancer/Plan-cancer-2014-2019-priorites-et-objectifs>
12. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. BMJ. 2004;328:1519.
13. Les bénéfices de l'arrêt du tabac / Mes Fiches Pratiques / page d'accueil - tabac-info-service.fr [Internet]. [consulté le 3 août 2017]. Disponible sur : <https://www.tabac-info-service.fr/Mes-Fiches-Pratiques/Les-benefices-de-l-arret-du-tabac>



14. Stratégies thérapeutiques d'aide au sevrage tabagique : efficacité, efficience et prise en charge financière [Internet]. Haute Autorité de Santé; 2007 [consulté le 3 août 2017]. Disponible sur : [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_477515/fr/strategies-therapeutiques-d-aide-au-sevrage-tabagique-efficacite-efficience-et-prise-en-charge-financiere](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_477515/fr/strategies-therapeutiques-d-aide-au-sevrage-tabagique-efficacite-efficience-et-prise-en-charge-financiere)
15. Arrêt de la consommation de tabac : du dépistage individuel au maintien de l'abstinence en premier recours - Recommandations [Internet]. Haute Autorité de Santé; 2014 [consulté le 8 sept 2016]. Disponible sur : [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-11/recommandations\\_-\\_arret\\_de\\_la\\_consommation\\_de\\_tabac\\_octobre\\_2014\\_2014-11-17\\_14-13-23\\_985.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-11/recommandations_-_arret_de_la_consommation_de_tabac_octobre_2014_2014-11-17_14-13-23_985.pdf)
16. Anthenelli RM, Benowitz NL, West R, St Aubin L, McRae T, Lawrence D, Ascher J, Russ C, Krishen A, Evins AE. Neuropsychiatric safety and efficacy of varenicline, bupropion, and nicotine patch in smokers with and without psychiatric disorders (EAGLES): a double-blind, randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet Lond Engl.* 2016;387:2507-20.
17. Lermenier A, Palle C. Résultats de l'enquête ETINCEL-OFDT sur la cigarette électronique [Internet]. Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies; 2014 [consulté le 10 juin 2015]. Disponible sur : <http://www.ofdt.fr/BDD/publications/docs/eisxalu2.pdf>
18. Inhalateurs électroniques de nicotine - Rapport de l'OMS [Internet]. Organisation Mondiale de la Santé; 2014 [consulté le 9 sept 2016]. Disponible sur : <http://apps.who.int/gb/fctc/PDF/cop6/FCTC COP6 10-fr.pdf?ua=1>
19. Attitudes of Europeans towards tobacco and electronic cigarettes [Internet]. European comission; 2014 [consulté le 14 juin 2017]. Disponible sur : <http://ec.europa.eu/commfrontoffice/publicopinion/index.cfm/General/index>
20. Andler R, Guignard R, Wilquin J-L, Beck F, Richard J-B, Nguyen-Thanh V. Electronic cigarette use in France in 2014. *Int J Public Health.* 2016;61:159-65.
21. Suivre le secteur en perte de vitesse de l'e-cigarette [Internet]. [consulté le 14 juin 2017]. Disponible sur : <http://www.dynamique-mag.com/article/suivre-le-secteur-en-perte-de-vitesse-de-l-e-cigarette.8933>
22. Ordonnance n° 2016-623 du 19 mai 2016 portant transposition de la directive 2014/40/UE sur la fabrication, la présentation et la vente des produits du tabac et des produits connexes.
23. European Commission. Directive 2014/40/EU of the European Parliament and of the Council of 3 April 2014 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States concerning the manufacture, presentation and sale of tobacco and related products and repealing Directive 2001/37/EC. *Off J Eur Union.* 2014;L 127/1.
24. Cigarettes électroniques [Internet]. AFNOR Normalisation. [consulté le 13 août 2017]. Disponible sur : <http://normalisation.afnor.org/thematiques/cigarettes-electroniques/>

25. Dautzenberg B, Delrieu A, Deutsch A, Le Maître B, Mathern G, Radu-Loghin C, Schmitt A-A, Thomas D, Underner M. Rapport et avis d'experts sur l'e-cigarette. 2013 [consulté le 20 juill 2015]. Disponible sur : [http://www.ofta-asso.fr/docatell/Rapport\\_e-cigarette\\_VF\\_1.pdf](http://www.ofta-asso.fr/docatell/Rapport_e-cigarette_VF_1.pdf)
26. The 4 Generations of Electronic Cigarettes [Internet]. Eciglopedia. 2015 [consulté le 8 août 2017]. Disponible sur : <http://eciglopedia.com/the-4-generations-of-electronic-cigarettes/>
27. Comprendre la composition des e-liquides : comment les choisir ? [Internet]. HappeSmoke : La cigarette électronique en toute simplicité. 2014 [consulté le 2 août 2017]. Disponible sur : <https://www.happesmoke.com/blog/composition-e-liquide/>
28. Propylène-glycol (FT 226) - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [consulté le 21 févr 2017]. Disponible sur : [http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX\\_226](http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_226)
29. Select Committee on GRAS Substances [Internet]. [consulté le 2 août 2017]. Disponible sur : <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=SCOGS>
30. Glycerol - SIDS Initial Assessment Report [Internet]. Organisation for Economic Co-operation and Development; 2002 [consulté le 9 sept 2016]. Disponible sur : <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/56815.pdf>
31. Nicotine (FT 312) - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [consulté le 2 août 2017]. Disponible sur : [http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX\\_312](http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_312)
32. Haut Conseil de la santé publique. Guidance on the benefits and risks of the electronic cigarette or e-cigarette in the general population (February, 22, 2016). Rev Mal Respir. 2016;33:509-25.
33. Goniewicz ML, Kuma T, Gawron M, Knysak J, Kosmider L. Nicotine levels in electronic cigarettes. Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob. 2013;15:158-66.
34. Farsalinos KE, Yannovits N, Sarri T, Voudris V, Poulas K. Nicotine delivery to the aerosol of a heat-not-burn tobacco product: comparison with a tobacco cigarette and e-cigarettes. Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob. 2017;
35. Talih S, Balhas Z, Eissenberg T, Salman R, Karaoghlanian N, El Hellani A, Baalbaki R, Saliba N, Shihadeh A. Effects of user puff topography, device voltage, and liquid nicotine concentration on electronic cigarette nicotine yield: measurements and model predictions. Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob. 2015;17:150-7.
36. El-Hellani A, El-Hage R, Baalbaki R, Salman R, Talih S, Shihadeh A, Saliba NA. Free-Base and Protonated Nicotine in Electronic Cigarette Liquids and Aerosols. Chem Res Toxicol. 2015;28:1532-7.

37. Zhu S-H, Sun JY, Bonnevie E, Cummins SE, Gamst A, Yin L, Lee M. Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tob Control*. 2014;23 Suppl 3:iii3-9.
38. Tierney PA, Karpinski CD, Brown JE, Luo W, Pankow JF. Flavour chemicals in electronic cigarette fluids. *Tob Control*. 2015;25:e10-5.
39. Behar RZ, Luo W, Lin SC, Wang Y, Valle J, Pankow JF, Talbot P. Distribution, quantification and toxicity of cinnamaldehyde in electronic cigarette refill fluids and aerosols. *Tob Control*. 2016;25:ii94-ii102.
40. Behar RZ, Davis B, Wang Y, Bahl V, Lin S, Talbot P. Identification of toxicants in cinnamon-flavored electronic cigarette refill fluids. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2014;28:198-208.
41. Kreiss K. Work-related spirometric restriction in flavoring manufacturing workers. *Am J Ind Med*. 2014;57:129-37.
42. Association française de normalisation. Norme XP D90-300-3 - Cigarettes électroniques et e-liquides - Partie 3 : exigences et méthodes d'essais relatives aux émissions.
43. Hutzler C, Paschke M, Kruschinski S, Henkler F, Hahn J, Luch A. Chemical hazards present in liquids and vapors of electronic cigarettes. *Arch Toxicol*. 2014;88:1295-308.
44. Hahn J, Monakhova YB, Hengen J, Kohl-Himmelseher M, Schüssler J, Hahn H, Kuballa T, Lachenmeier DW. Electronic cigarettes: overview of chemical composition and exposure estimation. *Tob Induc Dis*. 2014;12:23.
45. Glasser AM, Collins L, Pearson JL, Abudayyeh H, Niaura RS, Abrams DB, Villanti AC. Overview of Electronic Nicotine Delivery Systems: A Systematic Review. *Am J Prev Med*. 2017;52:e33-66.
46. Goniewicz ML, Knysak J, Gawron M, Kosmider L, Sobczak A, Kurek J, Prokopowicz A, Jablonska-Czapla M, Rosik-Dulewska C, Havel C, Jacob P, Benowitz N. Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tob Control*. 2014;23:133-9.
47. Uchiyama S, Senoo Y, Hayashida H, Inaba Y, Nakagome H, Kunugita N. Determination of Chemical Compounds Generated from Second-generation E-cigarettes Using a Sorbent Cartridge Followed by a Two-step Elution Method. *Anal Sci Int J Jpn Soc Anal Chem*. 2016;32:549-55.
48. Varlet V, Farsalinos K, Augsburger M, Thomas A, Etter J-F. Toxicity Assessment of Refill Liquids for Electronic Cigarettes. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12:4796-815.
49. Farsalinos KE, Kistler KA, Gillman G, Voudris V. Evaluation of electronic cigarette liquids and aerosol for the presence of selected inhalation toxins. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob*. 2015;17:168-74.

50. Saffari A, Daher N, Ruprecht A, De Marco C, Pozzi P, Boffi R, Hamad SH, Shafer MM, Schauer JJ, Westerdahl D, Sioutas C. Particulate metals and organic compounds from electronic and tobacco-containing cigarettes: comparison of emission rates and secondhand exposure. *Environ Sci Process Impacts*. 2014;16:2259-67.
51. Williams M, Villarreal A, Bozhilov K, Lin S, Talbot P. Metal and silicate particles including nanoparticles are present in electronic cigarette cartomizer fluid and aerosol. *PLoS One*. 2013;8:e57987.
52. Margham J, McAdam K, Forster M, Liu C, Wright C, Mariner D, Proctor C. Chemical Composition of Aerosol from an E-Cigarette: A Quantitative Comparison with Cigarette Smoke. *Chem Res Toxicol*. 2016;29:1662-78.
53. Gillman IG, Kistler KA, Stewart EW, Paolantonio AR. Effect of variable power levels on the yield of total aerosol mass and formation of aldehydes in e-cigarette aerosols. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016;75:58-65.
54. Hess CA, Olmedo P, Navas-Acien A, Goessler W, Cohen JE, Rule AM. E-cigarettes as a source of toxic and potentially carcinogenic metals. *Environ Res*. 2017;152:221-5.
55. Sleiman M, Logue JM, Montesinos VN, Russell ML, Litter MI, Gundel LA, Destailats H. Emissions from Electronic Cigarettes: Key Parameters Affecting the Release of Harmful Chemicals. *Environ Sci Technol*. 2016;50:9644-51.
56. Kosmider L, Sobczak A, Fik M, Knysak J, Zaciera M, Kurek J, Goniewicz ML. Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: effects of nicotine solvent and battery output voltage. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob*. 2014;16:1319-26.
57. Bansal V, Kim K-H. Review on quantitation methods for hazardous pollutants released by e-cigarette (EC) smoking. *Trends Anal Chem*. 2016;78:120-33.
58. Afssaps. Communiqué de presse L'Afssaps recommande de ne pas consommer de cigarette électronique [Internet]. Disponible sur : <http://documentation.fhp.fr/documents/20396r2.pdf>
59. Informations réglementaires relatives à la cigarette électronique - Point d'Information - ANSM: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [consulté le 14 sept 2017]. Disponible sur : <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Informations-reglementaires-relatives-a-la-cigarette-electronique-Point-d-Information>
60. Haute Autorité de Santé. Arrêter de fumer et ne pas rechuter: la recommandation 2014 de la HAS.
61. Spéciation des métaux - Toxicité des métaux et de leurs différentes formes [Internet]. [consulté le 14 août 2017]. Disponible sur : [http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Tableau\\_Toxicite\\_des\\_métaux\\_et\\_des\\_metalloïdes\\_sous\\_leurs\\_différentes\\_formes\\_chimiques\\_.pdf](http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Tableau_Toxicite_des_métaux_et_des_metalloïdes_sous_leurs_différentes_formes_chimiques_.pdf)

62. Berger MM. Oligoéléments - quoi de neuf ? Swiss Med Forum. 2003;31:720-6.
63. Goldhaber SB. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. Regul Toxicol Pharmacol. 2003;38:232-42.
64. WHO | Trace elements in human nutrition and health [Internet]. WHO. [consulté le 14 août 2017]. Disponible sur : <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241561734/en/>
65. IARC Monographs- Classifications [Internet]. [consulté le 28 juill 2016]. Disponible sur : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
66. CTRP [Internet]. [consulté le 8 août 2017]. Disponible sur : <https://ctrp.uky.edu/>
67. Eldridge A, Betson TR, Gama MV, McAdam K. Variation in tobacco and mainstream smoke toxicant yields from selected commercial cigarette products. Regul Toxicol Pharmacol. 2015;71:409-27.
68. Pappas RS, Fresquez MR, Martone N, Watson CH. Toxic metal concentrations in mainstream smoke from cigarettes available in the USA. J Anal Toxicol. 2014;38:204-11.
69. Pappas RS, Gray N, Gonzalez-Jimenez N, Fresquez M, Watson CH. Triple Quad-ICP-MS Measurement of Toxic Metals in Mainstream Cigarette Smoke from Spectrum Research Cigarettes. J Anal Toxicol. 2016;40:43-8.
70. Wang X, Wang Y, Qin Y, Ding L, Chen Y, Xie F. Sensitive and selective determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke using a graphene-coated solid-phase microextraction fiber prior to GC/MS. Talanta. 2015;140:102-8.
71. Bodnar JA, Morgan WT, Murphy PA, Ogden MW. Mainstream smoke chemistry analysis of samples from the 2009 US cigarette market. Regul Toxicol Pharmacol. 2012;64:35-42.
72. International Organization for Standardization. ISO 3308:2012 - Routine analytical cigarette-smoking machine -- Definitions and standard conditions.
73. Tayyarah R. E-Cigarette Task Force, Technical Report, 2014 Electronic Cigarette Aerosol Parameters Study; 2015. Disponible sur : [https://www.coresta.org/sites/default/files/technical\\_documents/main/ECIG-CTR\\_ECigAerosolParameters-2014Study\\_March2015.pdf](https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/ECIG-CTR_ECigAerosolParameters-2014Study_March2015.pdf)
74. Lab Technology Face Off: ICP-AES vs. ICP-OES vs. ICP-MS [Internet]. [consulté le 8 août 2017]. Disponible sur : <http://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/165450-Lab-Tech-Face-Off-ICP-AES-vs-ICP-OES-vs-ICP-MS/>
75. May TW, Wiedmeyer RH. A table of polyatomic interferences in ICP-MS. At Spectrosc-NORWALK Conn. 1998;19:150-5.
76. Effets des éléments de matrice sur la sensibilité de la mesure par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif [Internet]. IRAMIS. [consulté le 29 août 2017]. Disponible sur : [http://iramis.cea.fr/Phoce/Vie\\_des\\_labos/Ast\\_ast\\_visu.php?id\\_ast=867](http://iramis.cea.fr/Phoce/Vie_des_labos/Ast_ast_visu.php?id_ast=867)

77. Comité français d'accréditation. Document SH GTA 04 - révision 01 - Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale ; 2015. Disponible sur : <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
78. US Environmental Protection Agency. Method 6020A for Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. 2007.
79. Association française de normalisation. Norme XP D90-300-2 - Cigarettes électroniques et e-liquides - Partie 2 : exigences et méthodes d'essai relatives aux cigarettes e-liquides.
80. Williams M, To A, Bozhilov K, Talbot P. Strategies to Reduce Tin and Other Metals in Electronic Cigarette Aerosol. PLoS ONE. 2015;10.
81. Palazzolo DL, Crow AP, Nelson JM, Johnson RA. Trace Metals Derived from Electronic Cigarette (ECIG) Generated Aerosol: Potential Problem of ECIG Devices That Contain Nickel. Front Physiol. 2016;7:663.
82. Williams M, Bozhilov K, Ghai S, Talbot P. Elements including metals in the atomizer and aerosol of disposable electronic cigarettes and electronic hookahs. PLoS One. 2017;12:e0175430.
83. Lerner CA, Sundar IK, Watson RM, Elder A, Jones R, Done D, Kurtzman R, Ossip DJ, Robinson R, McIntosh S, Rahman I. Environmental health hazards of e-cigarettes and their components: Oxidants and copper in e-cigarette aerosols. Environ Pollut Barking Essex 1987. 2015;198:100-7.
84. Beauval N, Howsam M, Antherieu S, Allorge D, Soyez M, Garçon G, Goossens JF, Lo-Guidice JM, Garat A. Trace elements in e-liquids - Development and validation of an ICP-MS method for the analysis of electronic cigarette refills. Regul Toxicol Pharmacol. 2016;79:144-8.
85. Beauval N, Antherieu S, Soyez M, Gengler N, Grova N, Howsam M, Hardy EM, Fischer M, Appenzeller BMR, Goossens J-F, Allorge D, Garçon G, Lo-Guidice J-M, Garat A. Chemical Evaluation of Electronic Cigarettes: Multicomponent Analysis of Liquid Refills and their Corresponding Aerosols. J Anal Toxicol. 2017;1-9.
86. Conseil de l'Union Européenne. Directive n° 98/83/CE du 03/11/98 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.
87. Schober W, Szendrei K, Matzen W, Osiander-Fuchs H, Heitmann D, Schettgen T, Jörres RA, Fromme H. Use of electronic cigarettes (e-cigarettes) impairs indoor air quality and increases FeNO levels of e-cigarette consumers. Int J Hyg Environ Health. 2013;217:628-37.
88. Robinson RJ, Hensel EC, Morabito PN, Roundtree KA. Electronic Cigarette Topography in the Natural Environment. PLoS ONE. 2015;10:e0129296.
89. Khlystov A, Samburova V. Flavoring Compounds Dominate Toxic Aldehyde Production during E-Cigarette Vaping. Environ Sci Technol. 2016;50:13080-5.

90. Farsalinos KE, Voudris V, Poulas K. Are Metals Emitted from Electronic Cigarettes a Reason for Health Concern? A Risk-Assessment Analysis of Currently Available Literature. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12:5215-32.
91. Logue JM, Sleiman M, Montesinos VN, Russell ML, Litter MI, Benowitz NL, Gundel LA, Destailats H. Emissions from Electronic Cigarettes: Assessing Vapers' Intake of Toxic Compounds, Secondhand Exposures, and the Associated Health Impacts. *Environ Sci Technol*. 2017;51:9271-9.
92. ISO/TR 19478-2:2015(en), ISO and Health Canada intense smoking parameters — Part 2: Examination of factors contributing to variability in the routine measurement of TPM, water and NFDPM smoke yields of cigarettes [Internet]. [consulté le 23 févr 2017]. Disponible sur : <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:19478:-2:ed-1:v1:en>
93. Robinson RJ, Hensel EC, Roundtree KA, Difrancesco AG, Nonnemaker JM, Lee YO. Week Long Topography Study of Young Adults Using Electronic Cigarettes in Their Natural Environment. *PloS One*. 2016;11:e0164038.
94. Cunningham A, Slayford S, Vas C, Gee J, Costigan S, Prasad K. Development, validation and application of a device to measure e-cigarette users' puffing topography. *Sci Rep*. 2016;6:35071.

# ANNEXES



## ANNEXES

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

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

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

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

Figure 1/3

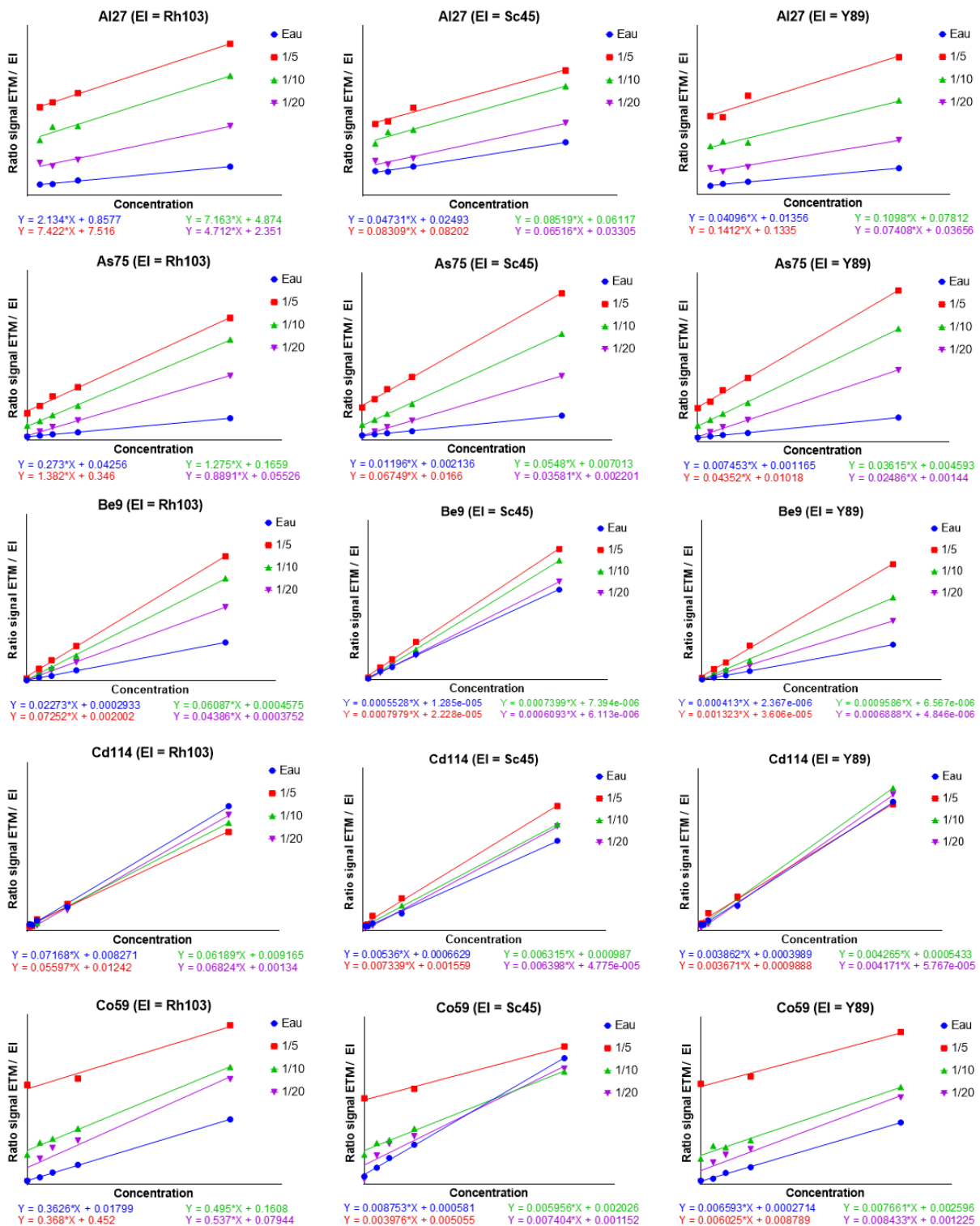


Figure 2/3

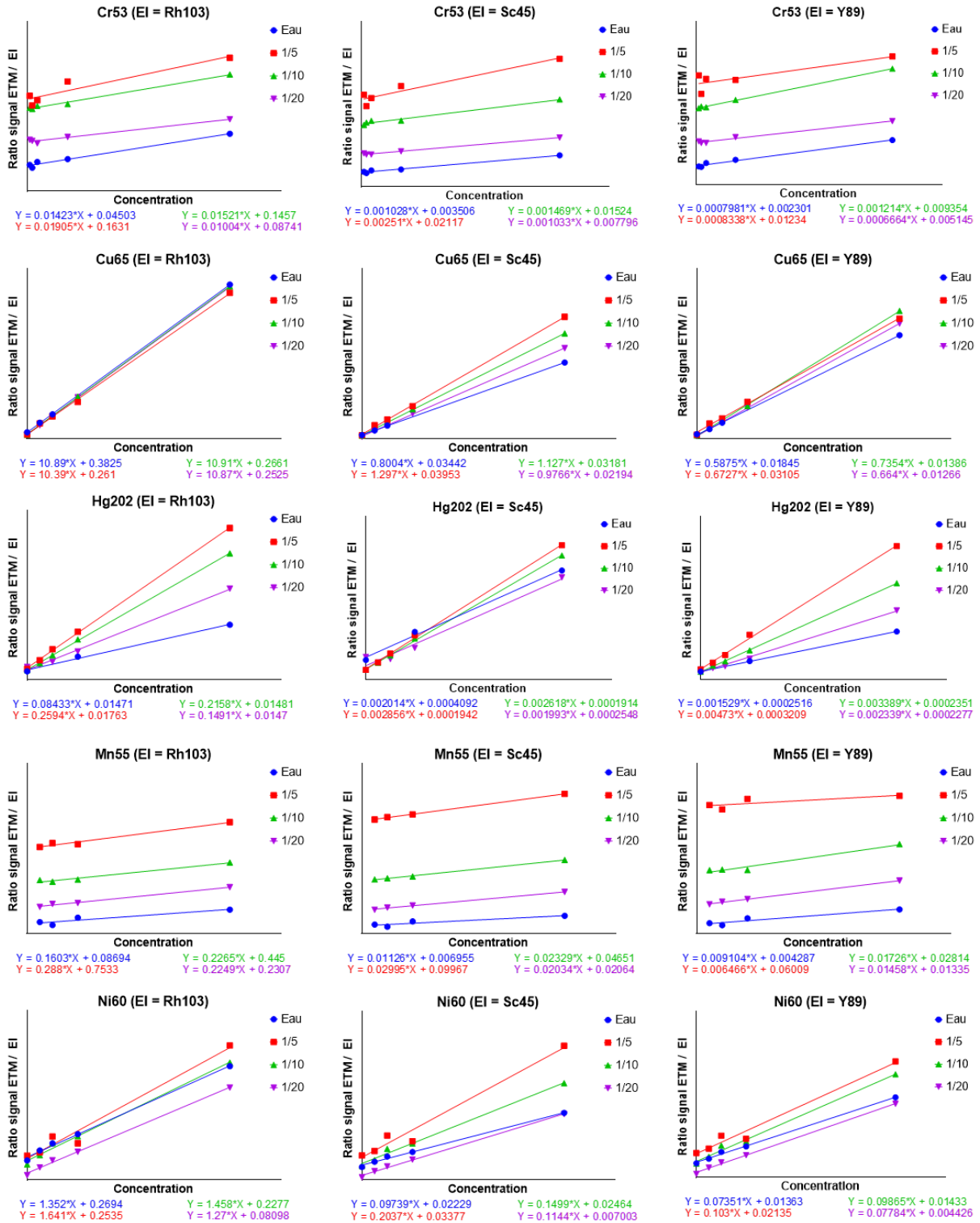
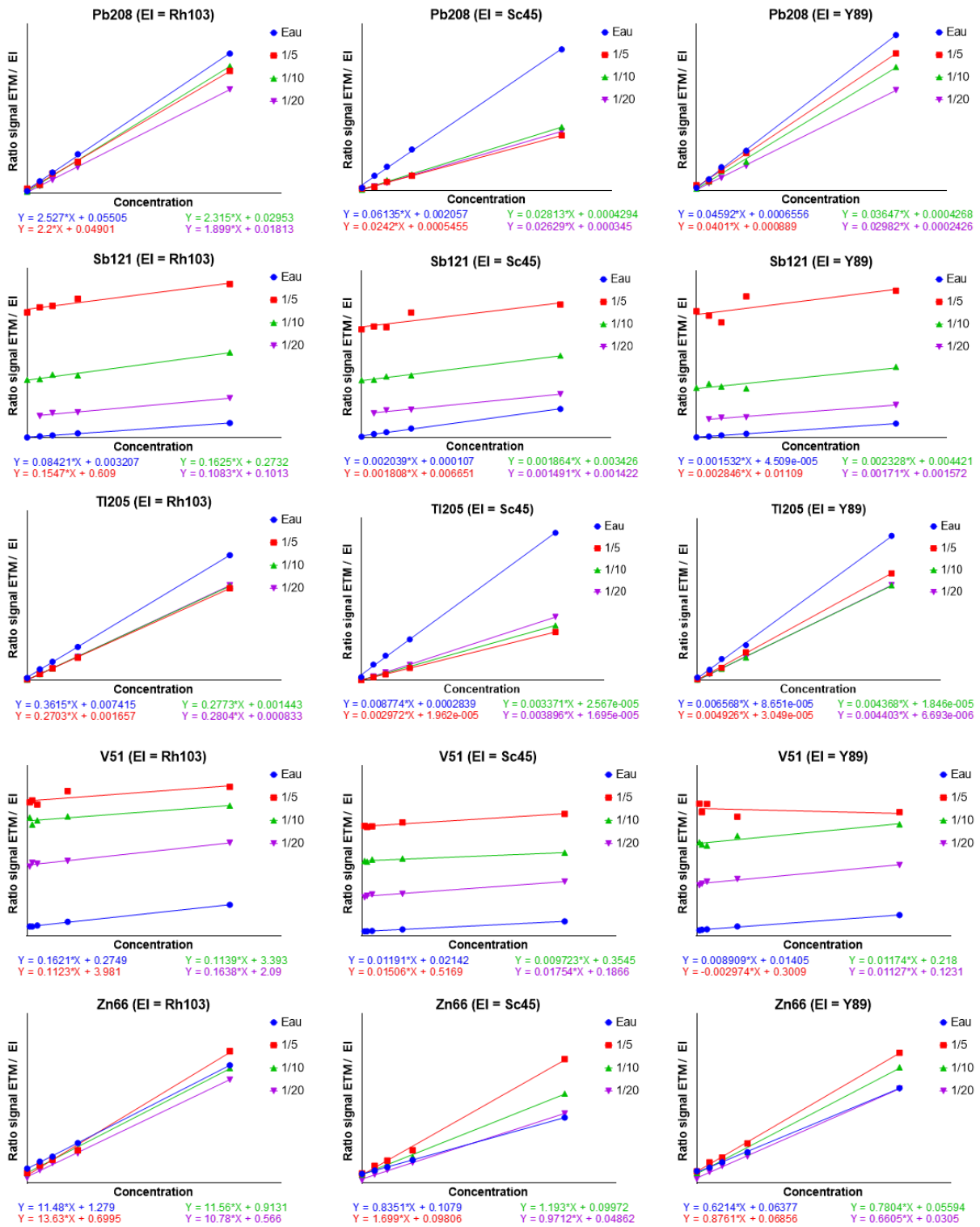


Figure 3/3



## ANNEXE 3 : Evaluation de l'effet de la matrice liquide de barbotage sur l'analyse des ETM par ICP-MS

Sont présentés ci-après les ajouts dosés réalisés en absence (eau) et en présence (barboteur) de matrice liquide de barbotage. L'effet de la matrice est considéré significatif lorsque la pente de la droite « barboteur » diffère de plus de 20 % par rapport à la pente de la droite « eau ».

Figure 1/3

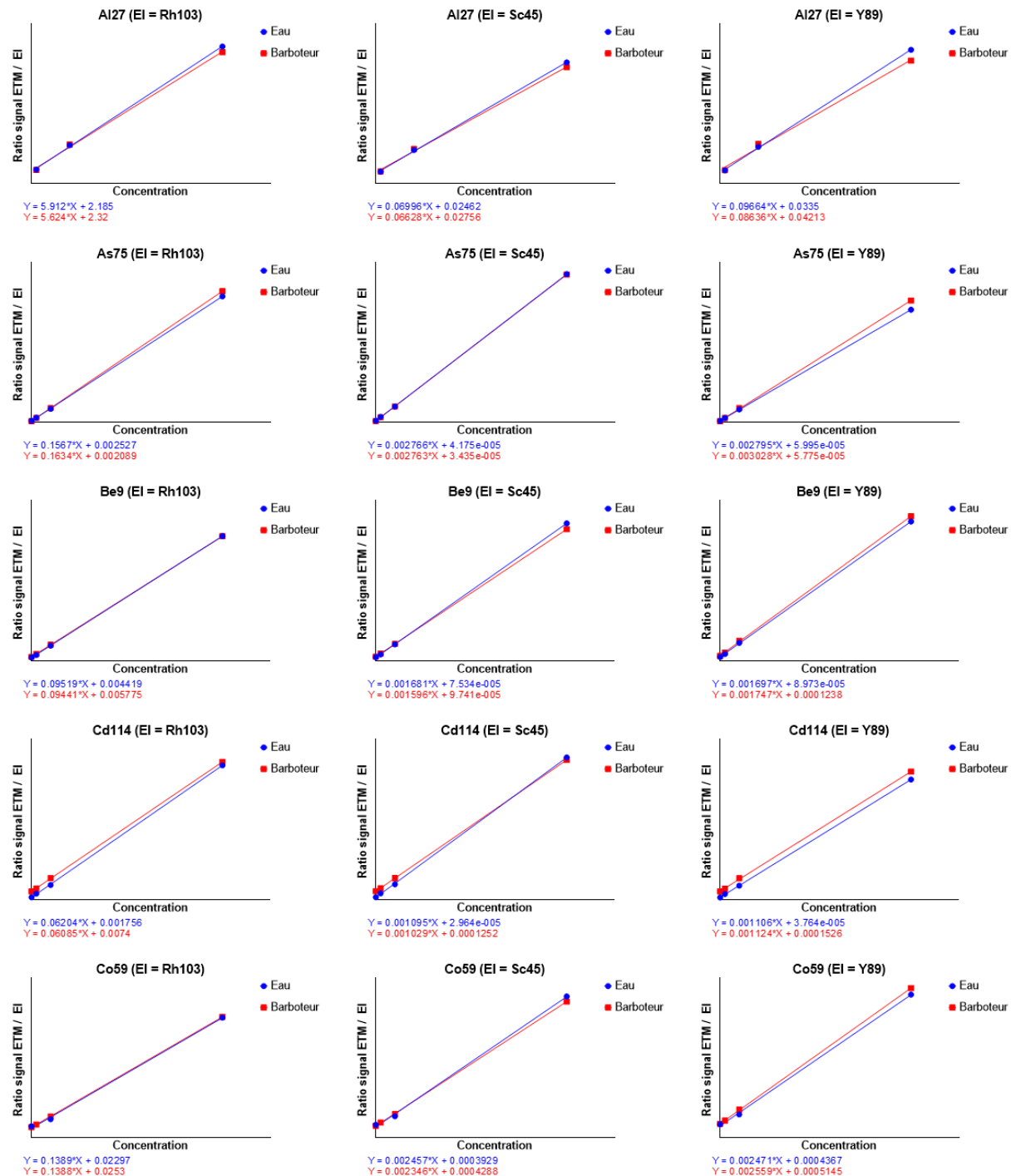


Figure 2/3

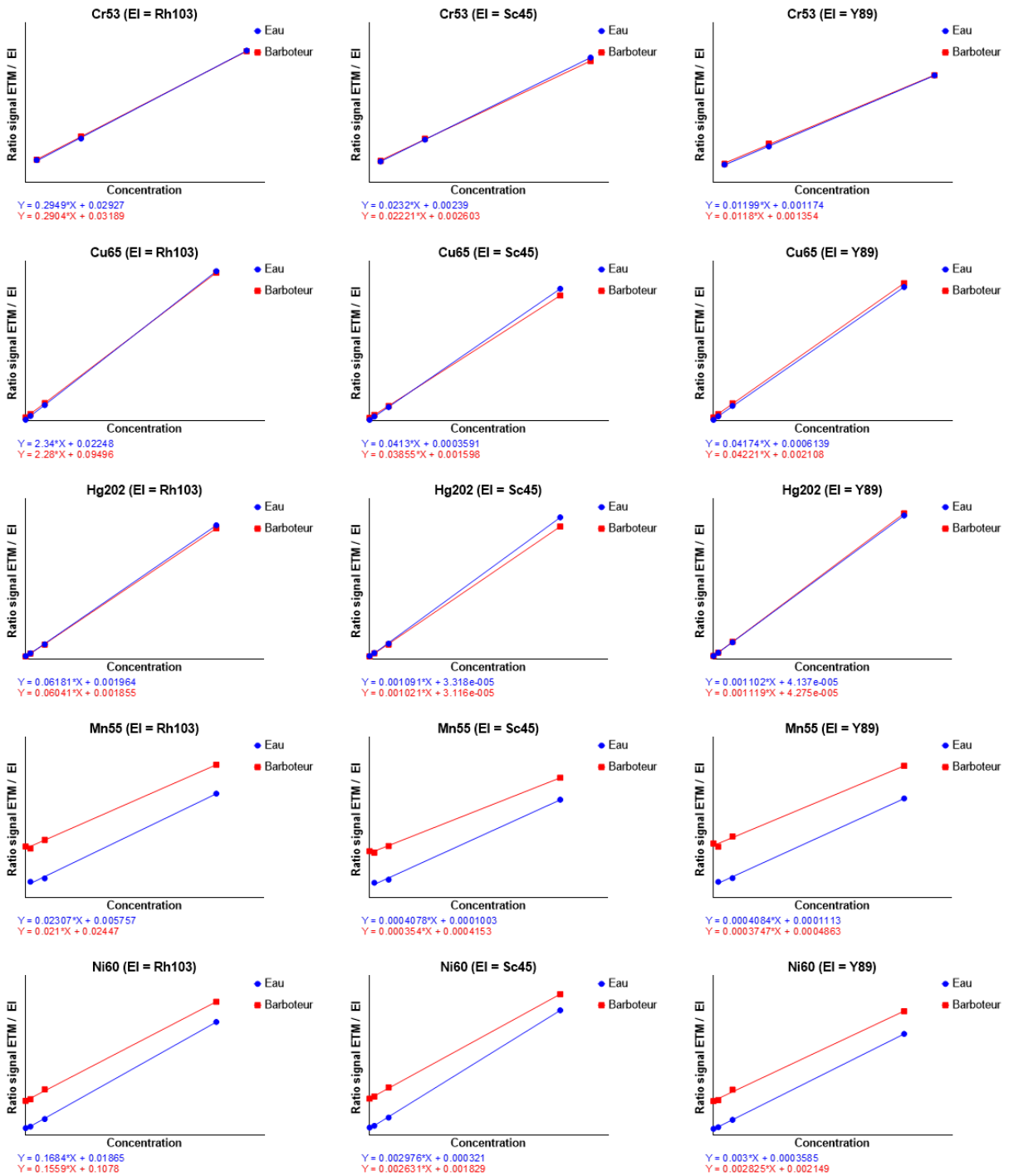
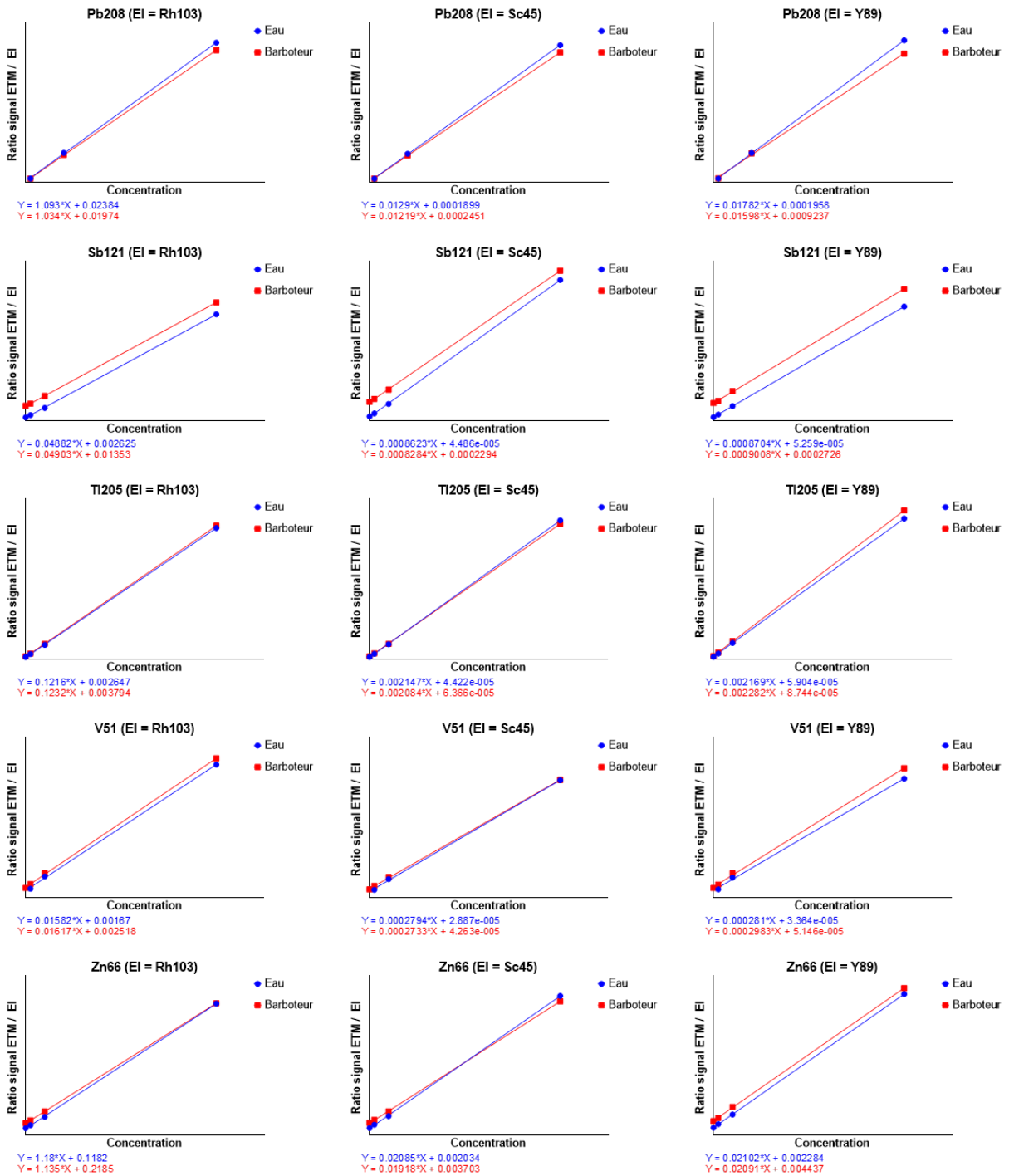


Figure 3/3



**ANNEXE 4 : Concentrations des 15 ETM (µg/L) mesurées dans 54 e-liquides  
provenant du même fabricant**

|       | Al | As  | Be    | Cd    | Co    | Cr   | Cu   | Hg  | Mn    | Ni   | Pb  | Sb  | Tl    | V     | Zn    |
|-------|----|-----|-------|-------|-------|------|------|-----|-------|------|-----|-----|-------|-------|-------|
| 1 N-  | 12 | 1,5 | < 0,1 | < 0,4 | 0,27  | 4,1  | < 20 | < 4 | 3,1   | < 16 | < 1 | 1,5 | < 0,1 | 0,64  | < 200 |
| 1 N+  | 15 | 1,5 | < 0,1 | < 0,4 | 0,22  | 4,6  | < 20 | < 4 | 3,3   | < 16 | < 1 | 1,5 | < 0,1 | 0,44  | < 200 |
| 2 N-  | 15 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,20  | 6,4  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,4 | < 0,1 | 0,56  | < 200 |
| 2 N+  | 19 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | < 0,1 | 6,5  | < 20 | 4,5 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 0,8 | < 0,1 | 0,64  | < 200 |
| 3 N-  | 11 | 2,9 | < 0,1 | < 0,4 | 0,13  | 6,9  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 2,1 | < 0,1 | 0,54  | < 200 |
| 3 N+  | 31 | 1,6 | < 0,1 | < 0,4 | < 0,1 | 6,6  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 2,5 | < 0,1 | 1,36  | < 200 |
| 4 N-  | 17 | 1,8 | < 0,1 | < 0,4 | 0,56  | 9,1  | < 20 | < 4 | 4,3   | < 16 | < 1 | 1,9 | < 0,1 | 0,78  | < 200 |
| 4 N+  | 12 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | < 0,1 | 8,9  | 31   | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,2 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 5 N-  | 12 | 3,4 | < 0,1 | < 0,4 | 0,26  | 8,5  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,5 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 5 N+  | 12 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | < 0,1 | 7,2  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 0,5 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 6 N-  | 12 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | < 0,1 | 6,7  | < 20 | 4,5 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,1 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 6 N+  | 14 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | < 0,1 | 6,5  | < 20 | 4,1 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 0,9 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 7 N-  | 13 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,88  | 6,8  | < 20 | < 4 | 8,4   | < 16 | < 1 | 0,4 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 7 N+  | 13 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,88  | 7,1  | < 20 | < 4 | 8,1   | < 16 | < 1 | 0,8 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 8 N-  | 14 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,29  | 6,4  | < 20 | < 4 | 3,8   | < 16 | < 1 | 1,6 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 8 N+  | 15 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,26  | 6,7  | < 20 | < 4 | 3,6   | < 16 | < 1 | 1,3 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 9 N-  | 12 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,13  | 6,7  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,2 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 9 N+  | 16 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,17  | 7,0  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,2 | < 0,1 | 0,46  | < 200 |
| 10 N- | 11 | 3,4 | < 0,1 | < 0,4 | 0,23  | 6,0  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,4 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 10 N+ | 14 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,14  | 6,2  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,4 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 11 N- | 12 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,41  | 11,5 | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 214 | < 0,1 | < 0,4 | 325   |
| 11 N+ | 15 | 1,8 | < 0,1 | < 0,4 | 0,30  | 7,8  | < 20 | < 4 | 3,4   | < 16 | < 1 | 99  | < 0,1 | 0,62  | 510   |
| 12 N- | 13 | 1,4 | < 0,1 | < 0,4 | 0,31  | 6,2  | < 20 | < 4 | 3,4   | < 16 | < 1 | 1,6 | < 0,1 | 0,66  | < 200 |
| 12 N+ | 14 | 1,5 | < 0,1 | < 0,4 | 0,27  | 7,2  | < 20 | < 4 | 3,1   | < 16 | < 1 | 1,5 | < 0,1 | 0,56  | < 200 |
| 13 N- | 14 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | < 0,1 | 7,3  | 23   | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,2 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 13 N+ | 12 | 1,4 | < 0,1 | < 0,4 | 0,13  | 10,0 | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,8 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 14 N- | 17 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | < 0,1 | 7,6  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,1 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 14 N+ | 13 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | < 0,1 | 7,4  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 0,5 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 15 N- | 11 | 1,4 | < 0,1 | < 0,4 | < 0,1 | 6,6  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,4 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 15 N+ | 12 | 1,5 | < 0,1 | < 0,4 | 0,30  | 7,1  | < 20 | < 4 | 2,9   | < 16 | < 1 | 1,7 | < 0,1 | 0,54  | < 200 |
| 16 N- | 15 | 1,2 | < 0,1 | < 0,4 | 0,34  | 5,8  | < 20 | < 4 | 3,4   | < 16 | < 1 | 1,1 | < 0,1 | 0,44  | < 200 |
| 16 N+ | 14 | 1,2 | < 0,1 | < 0,4 | 0,32  | 6,2  | < 20 | < 4 | 3,3   | < 16 | < 1 | 1,6 | < 0,1 | 0,56  | < 200 |
| 17 N- | 10 | 1,0 | < 0,1 | < 0,4 | 0,22  | 8,8  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 2,2 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 17 N+ | 11 | 1,1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,20  | 8,0  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,4 | < 0,1 | 0,4   | < 200 |
| 18 N- | 11 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,12  | 5,9  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,2 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 18 N+ | 11 | 1,1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,16  | 7,1  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,9 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 19 N- | 11 | 1,0 | < 0,1 | < 0,4 | 0,20  | 8,3  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,7 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 19 N+ | 12 | 1,0 | < 0,1 | < 0,4 | 0,16  | 8,4  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,3 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 20 N- | 10 | 1,1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,21  | 6,6  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,5 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 20 N+ | 10 | 1,1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,17  | 6,1  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,5 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 21 N- | 11 | 1,2 | < 0,1 | < 0,4 | 0,21  | 5,8  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,5 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 21 N+ | 12 | 1,2 | < 0,1 | < 0,4 | 0,28  | 5,9  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,3 | < 0,1 | 0,4   | < 200 |
| 22 N- | 9  | 3,1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,32  | 6,9  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,9 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 22 N+ | 13 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,18  | 7,2  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,3 | < 0,1 | 0,62  | < 200 |
| 23 N- | 9  | 2,3 | < 0,1 | < 0,4 | 0,17  | 7,4  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 2,4 | < 0,1 | 0,52  | < 200 |
| 23 N+ | 14 | 1,3 | < 0,1 | < 0,4 | 0,16  | 7,3  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,6 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 24 N- | 11 | 1,3 | < 0,1 | < 0,4 | 0,34  | 7,0  | < 20 | < 4 | 3,1   | < 16 | < 1 | 1,6 | < 0,1 | 0,66  | < 200 |
| 24 N+ | 12 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,20  | 7,5  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 2,6 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 25 N- | 12 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,16  | 7,7  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,8 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 25 N+ | 12 | 1,2 | < 0,1 | < 0,4 | 0,31  | 7,7  | < 20 | < 4 | 2,8   | < 16 | < 1 | 1,4 | < 0,1 | 0,72  | < 200 |
| 26 N- | 9  | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,11  | 7,0  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,1 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 26 N+ | 11 | < 1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,11  | 7,5  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 1,3 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |
| 27 N- | 18 | 1,3 | < 0,1 | < 0,4 | 0,35  | 7,2  | < 20 | < 4 | 3,7   | < 16 | < 1 | 2,0 | < 0,1 | 0,52  | < 200 |
| 27 N+ | 10 | 1,1 | < 0,1 | < 0,4 | 0,19  | 9,2  | < 20 | < 4 | < 1,6 | < 16 | < 1 | 2,2 | < 0,1 | < 0,4 | < 200 |

Un numéro correspond à un arôme. « N- » : sans nicotine. « N+ » : avec nicotine.



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

Beauval N<sup>1</sup>, Howsam M<sup>2</sup>, Antherieu S<sup>1</sup>, Allorge D<sup>1</sup>, Soyez M<sup>1</sup>, Garçon G<sup>1</sup>, Goossens JF<sup>2</sup>, Lo-Guidice JM<sup>1</sup>, Garat A<sup>1</sup>

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

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

## **Correspondence to:**

Garat A

Mail: anne.garat-2@univ-lille2.fr

Phone: +33(0)3 20 44 49 60

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

## **Word counts:**

Abstract: 175 words

Text: 3339 words

References: 466 words

## **Abstract**

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

## **Keywords**

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

## **Highlights**

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

## **Introduction**

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

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

The limited data available in the scientific literature on e-cigarettes falls into two broad categories: 1) *in vivo* or *in vitro* studies with animal or cellular models to examine effects of exposure to e-liquid vapors (Cervellati et al., 2014; Sussan et al., 2015), or 2) characterization studies focused on determining the constituents of the e-liquids themselves or of their vapors (Cheng, 2014). As part of a larger study to explore both these avenues and in view of the paucity of published data on trace element (TE) content of e-liquids, as well as the recent publication of the AFNOR guidelines, we developed and validated an analytical method to quantify a range of TEs in e-liquids.

The e-liquid matrix consists almost entirely of organic solvents, propylene glycol (propane-1,2-diol) and vegetal glycerin (propane-1,2,3-triol), and is of type rarely studied by inductively coupled plasma (ICP) techniques for TE analysis. This matrix leads to strong signal modifications and, in addition, no “metal-free” matrix for use as a calibration blank in TE analyses is currently available. Given these considerations, any

method will necessarily have limitations which is why we embarked on a rigorous validation of our method. The methodology and results of ICP with mass spectrometric (MS) detection analysis of a range of e-liquids from a French brand are presented here.

## **Material and methods**

### ***a. Reagents and solutions***

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

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

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

### ***b. Instrumentation***

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

power, sampling depth and argon flow rates were applied (RF power 1.40 kW, sampling depth 7.0 mm, plasma flow 16.5 L/min, auxiliary flow 1.65 L/min, sheath gas 0.20 L/min, nebulizer flow 1.05 L/min).

**c. Protocol of validation**

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

**Results**

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

**d. Matrix effect**

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

**e. Linearity and working range**

The linearity of the responses was judged acceptable on obtaining a coefficient of determination ( $R^2$ ) > 0.99 on the average *ratio* of element to internal standard (Sc, Y or Rh) intensities from 5 replicate analyses carried out under repeatability conditions. A maximum of 10 standard levels were used to construct calibration curves. Working calibration ranges were determined by the relative standard deviation (RSD) of the 5 replicates

being < 20 %; internal standards did not induce noteworthy variability. The linearity was validated across the 10 levels covering the working calibration ranges given in table 1 for all elements except Al, for which the 3 highest concentrations (10, 16 and 30 ppb) led to detector saturation.

***f. Limits of detection and quantification***

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

***g. Repeatability and intermediate precision***

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

***h. Inter-samples contamination***

Inter-sample contamination (“memory effect”) was determined by dosing, after suitable rinses, 3 high concentrations (H1, H2 and H3 whose average is H) followed by 3 low concentrations (L1, L2 and L3).

Contamination was equal to  $\frac{L1-L3}{H-L3}$ . Contamination levels thus measured were found to be < 0.5 % for all TEs,

except Hg (2 %).

*i. E-liquid assays*

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

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

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

## **Discussion**

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

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

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

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

With such low concentrations in samples and such large working ranges for calibrations, slight variations in calibration curve slopes could have a relatively large impact on results, especially intermediate precision. While coefficients of determination of calibration curves were > 0.99 in all cases during the validation of the method, several slopes were slightly different (but significantly so:  $p < 0.05$ , Student t-test, data not shown) with



or without inclusion of the 3 last points (additions 8, 9 and 10). Therefore, curves were constructed with 7 or 10 calibration levels depending on targeted concentrations.

Some elements, especially Cr and, to a lesser extent, V, were almost certainly interfered by the high amounts of carbon in the matrix, even when a high flow rate of CRI gas was employed. The application of correction equations for Cr or V did not clearly improve results and sometimes impaired calibration, so no correction equation was used in our method. In the absence of a suitable certified reference material for these elements in e-liquid, it is difficult to confirm or discount the results for Cr or V obtained here. However, variability is likely less important among e-liquids compared to biological matrices, so interferences should be comparable within, or perhaps even between, brands. Nevertheless, our results for those elements known to suffer from polyatomic interferences related to carbon should be viewed with caution. Chromium is a component of nichrome wires used in many e-cigarette devices and has been reported in e-liquid vapors (Williams et al., 2015). Its accurate quantification is necessary to investigate a potential contamination of e-cigarette emissions and the exposure of users. Other collision/reaction cell configurations or high resolution ICP-MS may minimize the impact of interferences on quantification of Cr and offer more reliable results compared with the instrument used in the present work.

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

Quality control assays were largely within acceptable limits of concentrations for all elements ( $< 30$  % from the mean for lower level,  $< 10$  % from the mean for higher level checks). Even if some controls were

occasionally (though only slightly) outside of acceptable limits for some elements, quantifiable concentrations in samples measured for a second time on a different day were very close to the first measurements (< 23 % from the mean of the two values). The Sb concentrations measured in two samples containing the cherry flavoring were initially outside of the calibration range (214 and 99.3 ppb); subsequent analysis of a 40 times dilution of the same samples led to comparable concentrations (respectively 238 and 111 ppb), while use of an extended calibration curve to quantify 20-fold dilutions of these samples gave values slightly closer to the original results (respectively 200 and 102 ppb – these repeat analyses were performed on a different day). Moreover, while inter-sample contamination values suggested the possibility of a very slight memory effect for a few elements (*ie.* 2 % for Hg), in practice 3 to 5 rinses after the highest calibration points led to good control levels, and the analysis of the 5 main runs of each measurement revealed no contamination problem. Taken together, these results indicate that, despite its limitations, this multi-elemental ICP-MS method demonstrated good robustness and could be used routinely.

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

## **Conclusion**

We developed and validated an analytical method using ICP-MS to quantify concentrations of 15 TEs in electronic cigarette refill fluids (“e-liquids”). With e-liquids producing a significant matrix effect and no certified reference material available, we performed a rigorous validation of the method informed by the COFRAC and USEPA method guidelines which demonstrated satisfactory linearity, precision, limits of quantification and robustness. A range of 27 different e-liquids from a single manufacturer, both with nicotine (16 g/L) or without nicotine and containing different flavorings (or not), was thus analyzed and found to contain very small amounts of some of these 15 elements (< 10 ppb or < LLQ for all elements except for Al, Cr, Cu, Sb and Zn, whose maximal concentrations were 30.7 ppb, 11.5 ppb, 30.6 ppb, 214 ppb and 510 ppb, respectively). All quantifiable

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

### **Funding**

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

### **Conflict of interest**

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

### **References**

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

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

**Table 12. Method parameters of TE analysis in 20 fold dilutions of e-liquids by ICP-MS.**

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

<sup>1</sup> Instrument LLQ represents the lowest quantifiable concentration in the diluted sample.

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

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

<sup>4</sup> Contamination value for Mn55 was found to be slightly negative and was taken to be 0.

**Table 13. Distribution of TE concentrations in 27 e-liquids with nicotine (16 g/L) and without nicotine.** These data summarize the TE concentrations found during the first analysis of each e-liquid. The average concentrations for each element were calculated using only the quantifiable values (*ie.* no substitutions were made for values < LLQ).

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

---

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



# Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
☎ 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr/>



## DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : BEAUVA L. Nicolas

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 23 10 2017 à 13.h.30. Amphithéâtre ou salle : Cazin

Avis du conseiller (directeur) de thèse

Nom : GARAT

Prénom : Anne

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :  
.....  
.....

Date : 12/09/17

Signature:

Avis du Président de Jury

Nom : Goullé

Prénom : Jean-Pierre

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :  
.....  
.....

Date : 12/09/2017

Signature:

Décision de Monsieur le Doyen

Favorable

Défavorable

Le Doyen  
  
DUCUNY

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.







Université de Lille 2

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)**  
Année Universitaire 2016/2017

**Nom :** BEAUVAL  
**Prénom :** Nicolas

**Titre du mémoire / thèse :** EVALUATION DE L'IMPACT SANITAIRE DES CIGARETTES ELECTRONIQUES : DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODES DE DOSAGE DES ELEMENTS TRACE METALLIQUES POUR LA CARACTERISATION DES E-LIQUIDES ET DES E-VAPEURS

**Mots-clés :** Toxicologie – Analytique – Cigarette électronique – E-liquide – E-vapeur – Eléments trace métalliques – ICP-MS

---

**Résumé :** Dans un contexte d'épidémie mondiale du tabagisme, la cigarette électronique est devenue très populaire. Bien qu'il soit généralement admis que ses vapeurs semblent moins nocives que la fumée de cigarette conventionnelle, elles ne sont pas totalement exemptes de composés potentiellement toxiques. Notamment, des éléments trace métalliques (ETM) pourraient contaminer les e-liquides ou être relargués, par usure de certains composants des cigarettes électroniques, dans les e-vapeurs. Le dosage simultané de 15 ETM par spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma (ICP-MS) a été développé pour des e-liquides et des e-vapeurs générées par une machine à fumer. Une attention particulière a été portée au développement de ces méthodes en raison des caractéristiques physicochimiques particulières des e-liquides et e-vapeurs, matrices visqueuses composées majoritairement de propylène glycol et glycérol. Des concentrations relativement faibles des 15 ETM étudiés ont été retrouvées dans les e-liquides d'un fournisseur français et dans leurs e-vapeurs respectives, largement inférieures aux valeurs limites actuellement proposées par l'association française de normalisation. En comparaison à la fumée de cigarette conventionnelle, seuls du chrome et de l'antimoine ont été quantifiés dans les e-vapeurs à des concentrations comparables ou supérieures. Ces résultats suggèrent un faible risque d'exposition aux ETM pour les consommateurs, inférieur à celui du tabac. Cependant, les rares études scientifiques aujourd'hui disponibles ne s'accordent pas totalement sur leurs conclusions. L'harmonisation des techniques et l'étude d'un plus grand nombre de dispositifs, marques et modèles sont les futures étapes nécessaires à l'évaluation du risque sanitaire lié aux ETM émis par les cigarettes électroniques.

---

**Membres du jury :**

**Président :** **Professeur Jean-Pierre GOULLÉ**  
Professeur Émérite  
Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rouen

**Assesseur(s) :** **Docteur Anne GARAT**  
Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier  
Faculté de Pharmacie, CHRU, Lille

**Professeur Christine CÉZARD**  
Praticien Hospitalier  
CHRU, Lille

**Docteur Fabrice NESSLANY**  
Directeur de recherche (IPL), Expert Toxicologue  
Laboratoire de Toxicologie de L'Institut Pasteur, Lille