

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE (ED414)

Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neurocardiovasculaire (UR7296)

THÈSE présentée par :

Amelia-Naomi SABO

soutenue le : 1^{er} décembre 2022

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/Spécialité : **PHARMACOLOGIE – PHARMACOCINETIQUE**

Étude des effets des liquides pour cigarette électronique et de la cigarette classique chez l'Homme, la souris et sur un modèle de barrière alvéolo-capillaire

THÈSE dirigée par :

Monsieur MONASSIER Laurent

PU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur BERLIN Ivan

MCU-PH, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière-Sorbonne Université

Monsieur ANTHÉRIEU Sébastien

MCU, Université de Lille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Madame MASCAUX Céline

examineur, PU-PH, Université de Strasbourg

INVITE :

Madame KEMMEL Véronique

membre invité, MCU-PH, Université de Strasbourg

« Celui qui accroit sa science, accroit sa peine. »

Roi Salomon

Remerciements

Tout d'abord, je remercie les membres rapporteurs, le Dr. Sébastien Anthérieu et le Dr. Ivan Berlin, d'avoir si gentiment accepté la responsabilité d'évaluer mon travail de thèse. Je suis honorée de leur présence dans le jury et je les remercie de l'attention qu'ils porteront à mon travail. Je remercie également la Pr. Céline Mascaux, examinatrice de mon travail, d'avoir accepté de l'évaluer et de s'être rendue disponible pour la soutenance de ma thèse.

Ensuite, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Pr. Laurent Monassier, pour son accueil au sein du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neurocardiovasculaire, pour l'intérêt manifesté à l'égard de cette recherche qui a été quelque peu greffée à la thématique du laboratoire, pour son regard critique, avisé et toujours constructif. Je garde également un bon souvenir de sa pédagogie lors des cours du DIU de formation des investigateurs aux essais cliniques.

Je tiens à remercier mon encadrante, le Dr. Véronique Kemmel. Il était évident qu'elle fasse partie de ce jury de thèse, alors « invitée » est bien peu. Je la remercie de m'avoir permis d'intégrer le Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire lors de mon stage de deuxième année de Master de Recherche en Pharmacocinétique et pour ses conseils généreux pendant les années d'internat et de doctorat qui ont suivi. Je la remercie pour sa patience et sa grande disponibilité car je lui ai donné des tonnes de choses à corriger ! Le dévouement pour son équipe, sa façon de concevoir des expériences scientifiques, d'en tirer des conclusions valables et d'écrire de manière à « raconter une belle histoire », m'ont aidé à grandir. Je la remercie de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce beau sujet... et sur tant d'autres !

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de l'équipe du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neurocardiovasculaire pour leur enrichissante et fructueuse collaboration, ainsi que pour leur soutien. Sylvia, parce qu'elle a

accepté que j'occupe son bureau au 6^{ème} étage du vieux bâtiment 3. C'est dans ce bureau où il faisait trop froid l'hiver et beaucoup trop chaud l'été, qu'est née une belle amitié. Je la remercie pour sa grande gentillesse, son oreille toujours attentive aux besoins de chacun, les bonnes recettes de cuisine partagées, et les belles sorties champignons en forêt ! Guillaume, pour ses précieux conseils, son dévouement pour les essais cliniques et la pharmacologie, son approche rigoureuse de la science, toutes ces années de collaboration et son attitude toujours pacifique qui est agréable au quotidien. Hugues, pour ses blagues nulles, ses bonnes adresses en Italie et son « coin à morilles » qu'il va finir par m'indiquer. Estelle, pour ses bons conseils et les discussions autour des protocoles d'immunohistochimie. Nathalie, pour les questions de pharmacologie et ses remarques toujours pertinentes lors des réunions de laboratoire. Ahmad, pour sa disponibilité et sa gentillesse. Alizée pour ses roses en papier. Hugo, pour sa passion pour les expressions françaises. Elisa, pour sa bonne humeur quotidienne et ses bons gâteaux. Emma, ma stagiaire de M1 que j'ai vu grandir et à qui j'ai le privilège de passer le flambeau pour ce beau projet. Ses qualités humaines, sa grande générosité, son oreille toujours à l'écoute font d'elle une personne dont on veut s'entourer et qu'on ne veut pas laisser partir. Enfin, je remercie les stagiaires avec qui j'ai eu la chance de travailler. L'ambiance de travail a toujours été excellente.

Je remercie également l'équipe de la plateforme cardiovasculaire et pulmonaire de l'Institut Clinique de la Souris, en particulier Ghina, Emilie et Alain, pour leur aide précieuse et leur grande gentillesse.

Je remercie l'équipe des EFR pour son implication dévouée dans le projet VAPexp'AIR.

J'exprime également ma reconnaissance à tous les membres du Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire de l'Hôpital de Hautepierre pour avoir

construit un environnement accueillant pour apprendre et effectuer des recherches, ainsi que pour leur précieuse aide technique.

Plus personnellement, je remercie mes ami(e)s de Paris, Marseille, Nancy et Strasbourg qui ont partagé des bouts de parcours universitaires avec moi depuis plus de dix ans maintenant et qui seront, j'en suis certaine, des ami(e)s pour la vie. Leur indéfectible et attachante amitié m'est précieuse.

Qu'il me soit permis de dédier ce mémoire à ma famille qui m'a soutenue durant toutes ces longues années d'études et dans la réalisation de cette thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents pour tout l'amour qu'ils me donnent et l'exemple de vie qu'ils ont toujours été pour moi, mes frères et sœurs pour leur soutien inconditionnel et leurs caractères qui font que chez nous, nous ne nous ennuyons jamais, mes neveux et nièces pour le soleil qu'ils apportent dans ma vie, ma belle-famille pour leur grand cœur et l'amour qui en découle.

Enfin, je remercie mon cher mari qui a été là pour m'épauler, m'encourager et me supporter pendant ces années de thèse. Je le remercie pour la touche d'humour et de folie qu'il apporte dans ma vie. Je lui suis à jamais reconnaissante.

A Emmanuel.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures.....	10
Liste des annexes	17
Introduction	18
I. Point sur la consommation tabagique dans le monde et en France	19
II. La cigarette électronique : un nouveau dispositif de délivrance de la nicotine	22
III. Caractéristiques des principaux composants des e-liquides	24
1) Le propylène-glycol.....	24
2) La glycérine végétale.....	28
3) La nicotine	30
4) Arômes.....	44
5) Additifs	52
IV. Les aérosols de cigarette électronique	53
V. Les problématiques posées par la e-cigarette	55
VI. Objectifs des travaux de thèse	57
1 ^{ère} partie : Pharmacocinétique de la nicotine et formation de radicaux libres de l’oxygène chez l’Homme : étude clinique VAPexp’AIR	58
I. VAPexp’Air : Objectifs de la recherche.....	59
II. Autorisations légales et financement de l’essai clinique	59
1) Autorisations légales.....	59
2) Financement.....	60
III. Plan expérimental	60
IV. Population de l’étude	60
1) Calcul du nombre de sujets nécessaires.....	60
2) Recrutement et critères d’inclusion/non-inclusion	61
V. Déroulement de l’essai clinique.....	61
1) Visite de pré-sélection	61
2) Visite d’inclusion V0.....	62
3) Randomisation	63
4) Déroulement de la visite de suivi V1.....	63

5)	Déroulement de la visite de suivi V2 et fin de l'étude	65
VI.	Les systèmes de délivrance de la nicotine utilisés lors de l'étude.....	65
1)	Dispositif de délivrance de la nicotine.....	65
2)	E-liquides.....	66
VII.	Méthodes analytiques	67
1)	Dosage de la nicotine et de la cotinine par LC-MS ²	67
2)	Mesure de la production du stress oxydant	68
VIII.	Analyse des données.....	69
1)	Analyse pharmacocinétique.....	69
2)	Analyses statistiques.....	69
IX.	Résultats.....	70
1)	Caractéristiques de la population de l'étude.....	70
2)	Cinétiques	76
X.	Discussion.....	85
2 ^{ème}	partie : Validation d'un modèle murin d'inflammation chronique post-exposition à la cigarette classique.....	92
I.	Contexte du projet <i>in vivo</i>	93
II.	Pistes physiopathologiques de la BPCO.....	95
1)	Rôle du déséquilibre entre les espèces oxydantes et antioxydantes	95
2)	Rôle de l'excès de protéases.....	97
3)	Rôle de l'inflammation.....	98
4)	L'hypothèse de la sérotonine.....	99
III.	Objectifs du projet <i>in vivo</i>	102
IV.	Choix du modèle animal.....	102
V.	Étude pilote : Exposition des souris à la fumée de cigarette classique selon un régime « normal » d'exposition en vue d'obtenir une inflammation pulmonaire chronique	104
1)	Schéma expérimental de l'étude.....	104
2)	Le protocole d'exposition.....	104
3)	Résultats de l'étude pilote.....	106
4)	Conclusions de l'étude pilote du projet <i>in vivo</i>	112
VI.	Étude principale : Exposition des souris à la fumée de cigarette classique selon un régime intense d'exposition en vue d'obtenir une inflammation pulmonaire chronique ...	113
1)	Schéma expérimental de l'étude.....	113
2)	Protocole d'exposition.....	114

3) Résultats de l'étude principale.....	115
VII. Discussion.....	120
1) L'étude de faisabilité	121
2) L'étude principale.....	123
3 ^{ème} partie : Effets des liquides pour cigarettes électroniques sur un modèle de co-culture cellulaire mimant la barrière alvéolo-capillaire.....	129
I. Importance de la barrière alvéolo-capillaire dans l'étude de l'exposition aux liquides pour cigarette électronique	130
II. Modélisation de la barrière alvéolo-capillaire <i>in vitro</i>	133
1) Choix des lignées cellulaires utilisées dans notre modèle de barrière alvéolo-capillaire	133
2) Mise en œuvre et validation de notre modèle de barrière alvéolo-capillaire.....	135
3) Conclusion sur la validation du modèle de barrière alvéolo-capillaire <i>in vitro</i>	145
III. Article 1 : Effets des principaux composants des liquides pour cigarette électronique et de 5 liquides commercialisés aromatisés, avec ou sans nicotine, sur le modèle de barrière alvéolo-capillaire	146
IV. Article 2 : Étude de l'effet de la nicotine sur un modèle cellulaire de barrière alvéolo-capillaire	192
Conclusion et perspectives	221
Bibliographie	230
Annexes	263
Résumé	278
Abstract.....	278

Liste des tableaux

Tableau I : Tableau résumant les paramètres pharmacocinétiques d'absorption nicotinique à partir de différents dispositifs délivrant de la nicotine. (D'après la source : Sabo, 2021).	39
Tableau II – Composition des e-liquides 1 et 2 selon les données du fournisseur.	66
Tableau III – Transitions et paramètres analytiques de la LC/MS ² (triple quadripôle Sciex 5500®).	68
Tableau IV - Données démographiques, fonction respiratoire et habitudes de vie des patients randomisés.	71
Tableau V – Résumé des données relatives à la consommation nicotinique habituelle, les antécédents de sevrage nicotinique et la prise de nicotine à partir des e-liquides 1 et 2 (EL1 et EL2) lors du protocole de vapotage aux visites 1 et 2 de l'essai clinique VAPexp' AIR.	72
Tableau VI – Résumé des paramètres pharmacocinétiques obtenus pour la nicotine après vapotage du e-liquide 1 (EL1) et du e-liquide 2 (EL2).	80
Tableau VII – Résumé des paramètres pharmacocinétiques obtenus pour la cotinine plasmatique après vapotage du e-liquide 1 (EL1) et du e-liquide 2 (EL2).	83
Tableau VIII – Tableau récapitulatif des analyses de corrélation entre les paramètres pharmacocinétiques de la nicotine plasmatique et les paramètres de production de radicaux libres de l'oxygène (RLO) dans le sang total après vapotage.	85
Tableau IX – Classification de la sévérité de la BPCO selon la GOLD 2022. La valeur prédite est définie par des abaques, prenant en compte l'âge, le sexe, la taille et l'origine ethnique.	94
Tableau X – Modèles expérimentaux décrits dans la littérature permettant de développer une inflammation pulmonaire à la suite d'une exposition à la fumée de cigarette classique.	113
Tableau XI – Protocole d'exposition avec le nombre de cigarettes prévues par le protocole de Lee et al., 2018.	115
Tableau XII – Protocole d'exposition avec ajustement du nombre de cigarettes consommées à partir du 5 ^{ème} jour d'exposition.	116
Tableau XIII – Protocole d'exposition avec ajustement du nombre de cigarettes consommées à partir du 16 ^{ème} jour d'exposition avec passage à une exposition selon un régime normal (ISO 3308:2012)	117

Tableau XIV – Conditions de culture testées pour obtenir la croissance des lignées.	135
Tableau XV – Caractérisation phénotypique de la lignée épithéliale NCI-H441.	142
Tableau XVI – Caractérisation phénotypique de la lignée endothéliale HULEC-5a.	143
Tableau XVII – Résultats des RT-qPCR et WB obtenus lors de la recherche des acteurs majeurs du système sérotoninergique dans les lignées NCI-H441 et HULEC-5a.	144

Liste des figures

Figure 1 - Prévalence du tabagisme quotidien selon le sexe parmi les 18-75 ans, France, évolution 2000-2020. Source : Pasquereau et al. 2021.....	20
Figure 2 – Mécanisme de transformation du e-liquide en aérosol par la cigarette électronique. Source : <i>Comment fonctionne une cigarette électronique ? (www.cigaretteelec.fr, site consulté le 07/10/2022)</i>	22
Figure 3 - Formule semi-développée du propylène-glycol.....	24
Figure 4 - Voies métaboliques hépatiques du propylène glycol. Source : Fiche INRS_226....	25
Figure 5 – Voies et sous-produits possibles formés lors de la déshydratation thermique du propylène-glycol. Source : Sleiman et al. 2016.....	27
Figure 6 - Formule semi-développée de la glycérine végétale ou glycérol.....	28
Figure 7 – Représentation des énantiomères R et S de la molécule de nicotine.	31
Figure 8 – Évolution de la cigarette électronique et classification en 4 générations successives. Source : site de <i>Texas department of state health services</i> consulté le 07/10/2022 (https://www.dshs.texas.gov/Vaping/WhatisVaping/).....	34
Figure 9 – Profils pharmacocinétiques de la nicotine plasmatique après vapotage de plusieurs e-liquides aromatisés (vanille, cerise, menthol, café, tabac classique) contenant tous 24 mg/mL de nicotine comparés à la cigarette classique (Voos et al. 2020).....	38
Figure 10 – Principales voies de transformation de la nicotine et de la cotinine chez l’homme avec les enzymes impliquées dans les différentes réactions (Nakajima and Yokoi 2005).	43
Figure 11 – Répartition de la fréquence des ingrédients déclarés comme arômes par les fabricants en France. Source : https://www.anses.fr/en/system/files/CONSO2018SA0189Ra-1.pdf , site consulté le 07/10/2022.	44
Figure 12 – Classification des arômes, selon leur nature chimique, en fonction de leur fréquence d'apparition dans les liquides pour cigarettes électroniques. Source : <i>Omaiye et al., 2019</i>	45
Figure 13 – Concentrations totales d'arômes dans les liquides pour cigarettes électroniques. Source : <i>Omaiye et al., 2019</i>	45
Figure 14 – Structure des isomères du menthol.	49
Figure 15 – Schéma expérimental de l’étude VAPexp’AIR.	60

Figure 16 – Figure résumant le déroulement des visites de suivi V1 et V2 de l'étude VAPexp'AIR.	65
Figure 17 – Influence des facteurs démographiques (A) sexe, (B) poids et (C) IMC sur la prise de nicotine. Aucune différence n'a été mise en évidence pour ces trois paramètres. Analyses statistiques : (A) comparaison des moyennes par un test de Student avec $\alpha = 0,05$, (B) et (C) régression linéaire simple et intervalle de confiance à 95%.	74
Figure 18 – Graphiques illustrant l'analyse des covariables de consommation nicotinique comme (A) la consommation exclusive de e-cigarette ou la consommation concomitante de tabac et de e-cigarette, (B) la concentration de nicotine habituelle dans le e-liquide et (C) la dépendance à la nicotine selon le questionnaire de Fagerström en 6 questions. Analyses statistiques : (A) comparaison des moyennes avec un test de Student, (B) et (C) les comparaisons entre les différents groupes ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 1 facteur ($\alpha = 0,05$) suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett. * : $p = 0,0221$	75
Figure 19 – Masse de nicotine inhalée estimée à partir de la masse de e-liquide consommée (cadre de gauche) et la moyenne des différences entre le e-liquide 2 et le e-liquide 1 (cadre de droite). La différence de masse de nicotine entre les deux e-liquides a été statistiquement significative, $p = 0,0137$. Analyse statistique paramétrique pour des échantillons appariées (test de Student, $\alpha = 0,05$).	75
Figure 20 – Graphiques illustrant l'analyse des effets des covariables : démographiques (A) sexe, (B) poids et (C) IMC, (D) des habitudes de consommation nicotinique du sujet, (E) de la concentration de nicotine habituelle dans le e-liquide et (F) de la dépendance à la nicotine mesurée selon le questionnaire de Fagerström, sur la prise de nicotine dans les groupes du e-liquide 1 (vert) et du e-liquide 2 (rose). Aucun effet de ces covariables n'a été mis en évidence sur la prise de nicotine que ce soit pour le groupe du e-liquide 1 ou du e-liquide 2. Analyses statistiques : (A), (D) – (F) les comparaisons entre les différents groupes ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs ($\alpha = 0,05$) suivi d'un test de comparaisons multiples de Šidák ; (B) et (C) régression linéaire simple avec intervalle de confiance à 95%.	76
Figure 21 – Profils pharmacocinétiques obtenus pour la nicotine plasmatique dans l'ensemble de la population étudiée. La ligne continue représente la moyenne des concentrations à un temps donné.	77
Figure 22 – Corrélations entre la masse de nicotine consommée et les paramètres pharmacocinétiques (A) concentrations maximales dans le plasma (C_{max}) ($R^2 = 0,4021$) et	

(B) aires sous la courbe (AUC_{0-80}) ($R^2 = 0,3205$). **(C)** Corrélation entre les C_{max} et les AUC_{0-80} ($R^2 = 0,8665$) mesurées. Analyse statistique : régression linéaire simple avec intervalle de confiance à 95%..... 77

Figure 23 – **(A)** Corrélations entre la masse de nicotine consommée et les concentrations maximales de nicotine dans le plasma (C_{max}) pour le e-liquide 1 (vert, $R^2 = 0,3039$) et le e-liquide 2 (rose, $R^2 = 0,5074$) et **(B)** entre la masse de nicotine consommée et les aires sous la courbe (AUC_{0-80}) pour le e-liquide 1 (vert, $R^2 = 0,2433$) et le e-liquide 2 (rose, $R^2 = 0,4466$). **(C)** Corrélations entre les C_{max} et les AUC_{0-80} pour le e-liquide 1 (vert, $R^2 = 0,9292$) et le e-liquide 2 (rose, $R^2 = 0,8187$). Analyse statistique : régression linéaire simple avec intervalle de confiance à 95%..... 78

Figure 24 – Graphiques illustrant l’effet des covariables caractérisant la consommation nicotinique sur la C_{max} et l’ AUC_{0-80} . La consommation exclusive de e-cigarette a montré un effet significativement différent par rapport à la consommation concomitante de tabac et de e-cigarette sur **(A)** la C_{max} ($p = 0,0131$) et **(D)** l’ AUC ($p = 0,0031$). **(E)** Le groupe des individus ayant une concentration de nicotine habituelle dans leurs e-liquides > 10 mg/mL possèdent une AUC_{0-80} supérieure comparée aux individus ayant une concentration de nicotine habituelle dans leurs e-liquides < 6 mg/mL ($p = 0,0019$) ou compris entre 6 et 10 mg/mL ($p = 0,0058$), mais **(B)** aucun impact n’a été identifié sur la C_{max} . Malgré une tendance à l’augmentation de **(C)** la C_{max} et **(F)** l’ AUC en fonction du score de Fagerström, aucune différence significative n’a été démontrée. Analyses statistiques : (A) et (D) comparaison des moyennes avec un test de Student ; (B), (C), (E) et (F) analyses des variances ANOVA à un facteur ($\alpha = 0,05$) suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett. 79

Figure 25 – Graphiques illustrant l’influence des covariables sur la C_{max} dans les groupes des e-liquides (EL1 et EL2). Les covariables sont **(A)** le sexe, **(B)** le poids et **(C)** l’IMC, mais aussi **(D)** la consommation exclusive de e-cigarette ou la consommation concomitante de tabac et e-cigarette, **(E)** la concentration de nicotine dans les e-liquides habituellement consommés par les sujets et **(F)** le score de Fagerström calculé pour le sujet. Aucune de ces covariables n’a montré une influence sur la C_{max} de la nicotine. Analyses statistiques : (A), (D), (E) et (F) analyses des variances ANOVA à deux facteurs suivies d'un test de comparaisons multiples de Šídák, $\alpha = 0,05$; (B) et (C) régression linéaire simple avec intervalle de confiance à 95%..... 81

Figure 26 – Graphiques illustrant l’effet des covariables sur l’ AUC_{0-80} dans le groupe des e-liquides à l’étude (EL1 en vert et EL2 en rose). Les covariables sont **(A-C)**

démographiques et **(D-F)** liées à la consommation nicotinique. **(E)** Dans le groupe du e-liquide 1, les individus ayant une concentration de nicotine habituelle dans leurs e-liquides > 10 mg/mL possèdent une AUC₀₋₈₀ supérieure à celle des individus ayant une concentration de nicotine habituelle dans leurs e-liquides < 6 mg/mL ($p = 0,0225$) ou comprise entre 6 et 10 mg/mL ($p = 0,0459$), cependant cet effet n'a pas été identifié dans le groupe du e-liquide 2. Aucune autre covariable n'a montré d'impact sur l'exposition à la nicotine. Analyses statistiques : (A), (D), (E) et (F) analyse des variances ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples de Šidák, $\alpha = 0,05$; (B) et (C) régression linéaire simple avec intervalle de confiance à 95%. * : $p < 0,05$ 82

Figure 27 – Profils pharmacocinétiques obtenus pour la cotinine plasmatique dans l'ensemble de la population étudiée. La ligne continue représente la moyenne des concentrations obtenues. 83

Figure 28 – Formation de radicaux libres de l'oxygène (RLO) dans le sang au cours du temps pour **(A)** les deux e-liquides, **(B)** le e-liquide 1 et **(C)** le e-liquide 2. Analyse statistique : Comparaison des moyennes avec un test de Student avec $\alpha = 0,05$. * : $p = 0,0256$ 84

Figure 29 – Illustration de la pathophysiologie de la bronchopneumopathie chronique obstructive (*Scarlata et al. 2020*). 93

Figure 30 – Mécanismes de développement de la BPCO induits par le stress oxydant (*He et al. 2020*). 96

Figure 31 – Récepteurs et actions de la sérotonine. Source : site consulté le 07/10/2022, <https://manualofmedicine.com/> 100

Figure 32 – Protocole d'exposition progressif des souris à la fumée de cigarette dans l'étude pilote incluant 24 souris réparties dans 2 bras expérimentaux (12 souris exposées à la fumée de cigarette classique et 12 souris exposées à l'air ambiant). 105

Figure 33 – Machine d'exposition InExpose system (EMKA technologies) permettant une exposition à la fumée de cigarette classique en mode « nose-only ». Les flèches indiquent l'emplacement des souris. Des filets de contention pour souris sont fixés sur une tour avec des orifices individuels permettant la distribution équivalente de la fumée à chaque souris exposée. 106

Figure 34 – Variation du poids au cours du mois d'exposition par groupe expérimental (n = 12 souris par groupe en début d'expérimentation). 106

Figure 35 – **(A)** Évolution du PENH au cours du temps après nébulisation de solutions de méthacholine à des concentrations croissantes (0,01 à 0,4 M). **(B)** Effet des différentes concentrations de méthacholine sur le PENH à 4 minutes post-nébulisation. Analyse

statistique : comparaison des moyennes de PENH obtenues dans les 2 groupes après chaque nébulisation par test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$ % ; $n_{\text{groupe contrôle}} = 11$; $n_{\text{groupe fumée}} = 12$. * $p < 0,05$	108
Figure 36 – Concentration de sérotonine sanguine dans les deux groupes expérimentaux. Les résultats obtenus par chromatographie liquide de haute performance couplée à une détection spectrofluorimétrique n’ont pas montré de différence entre les 2 groupes de souris. Analyse statistique : test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$; $n_{\text{groupe contrôle}} = 11$; $n_{\text{groupe fumée}} = 12$	109
Figure 37 – Analyse des cellules immunitaires retrouvées dans le LBA des souris des 2 groupes expérimentaux (groupe contrôle en vert et groupe exposé à la fumée de cigarette en orange). Les populations cellulaires mesurées sont (A) les globules blancs totaux, (B) les macrophages, (C) les polynucléaires neutrophiles, (D) les lymphocytes totaux, (E) les lymphocytes T et (F) les lymphocytes B. Analyse statistique : comparaison des moyennes de chaque groupe par test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$; $n_{\text{groupe contrôle}} = 6$; $n_{\text{groupe fumée}} = 5$	110
Figure 38 – Résultats des modifications de l’expression d’ARN _m pulmonaires obtenus par RT-qPCR. Aucune différence n’a été mise en évidence entre les médianes dans les 2 groupes expérimentaux pour (A) MMP-2, (B) MMP-9, les récepteurs muscariniques périphériques (C) M1, (D) M2 et (E) M3, (F) le marqueur RAGE, les marqueurs apoptotiques (G) bax, (H) bcl2 et (I) le ratio bax/bcl2 ($p > 0,05$). Analyse statistique : test non-paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney avec $\alpha = 0,05$ et $n = 3$ par groupe expérimental.....	111
Figure 39 – Résultats des modifications de l’expression d’ARN _m pulmonaires obtenus par RT-qPCR. Aucune différence n’a été mise en évidence entre les médianes dans les 2 groupes expérimentaux pour les marqueurs du système sérotoninergique : (A) l’enzyme TPH-1, (B) le transporteur de recapture de la sérotonine SERT, les récepteurs (C) 5-HTR2A, (D) 5-HTR2B, (E) 5-HTR4, (F) 5-HTR6, (G) 5-HTR7, $p > 0,05$. Analyse statistique : test non-paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney avec $\alpha = 0,05$ et $n = 3$ par groupe expérimental.	112
Figure 40 – Illustration du modèle expérimental implanté pour l’étude principale d’exposition des souris à la fumée de cigarette classique.....	114
Figure 41 – (A) Suivi du poids des animaux dans les deux groupes expérimentaux sur la durée de l’étude. Malgré une tendance à des poids plus faibles chez les souris exposées à la fumée de cigarette 1R6F, aucune différence n’a été identifiée entre les deux groupes d’exposition. (B) Poids des poumons le jour du sacrifice. Analyse statistique : comparaison des	

- moyennes de chaque groupe par test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$; $n_{\text{groupe contrôle}} = 12$; $n_{\text{groupe fumée}} = 6$ 116
- Figure 42 – Analyse des cellules immunitaires retrouvées dans le LBA des 2 groupes (exposé à l'air en vert et exposé à la fumée de cigarette en rouge). Les populations cellulaires analysées sont **(A)** les globules blancs totaux, **(B)** les macrophages, **(C)** les polynucléaires neutrophiles, **(D)** les lymphocytes T, **(E)** les lymphocytes B et **(F)** les polynucléaires éosinophiles. Analyse statistique : comparaison des moyennes obtenues dans les 2 groupes par test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$ % ; $n_{\text{groupe contrôle}} = 12$; $n_{\text{groupe fumée}} = 6$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 118
- Figure 43 – Dosage d'un panel de cytokines et chémokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-33, IL-10 et MCP-5) dans le lavage broncho-alvéolaire des souris exposées à l'air et à la fumée de cigarette classique 1R6F. Analyse statistique : comparaison des moyennes obtenues dans les 2 groupes par test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$; $n_{\text{groupe contrôle}} = 12$; $n_{\text{groupe fumée}} = 6$ 119
- Figure 44 – Coupes histologiques de poumons de souris du groupe contrôle (**CTL**) exposé à l'air et du groupe exposé à la fumée de cigarette de référence (**1R6F**). Les coupes colorées à l'hématoxyline (noyaux) et à l'éosine (cytoplasme) montrent un élargissement des espaces alvéolaires et une rupture des alvéoles. Ces éléments sont caractéristiques d'un emphysème se développant dans le groupe de souris exposées à la fumée de cigarette. 119
- Figure 45 – Schématisation du tractus respiratoire inférieur avec focus sur la barrière alvéolo-capillaire et les effets des particules de fumée de cigarette sur la réaction inflammatoire. « tar » : goudrons, CD : cellules dendritiques, MON : monocytes, PMN : polynucléaires neutrophiles, M ϕ : Macrophage, TLR : toll-like receptor, Type I cell : pneumocyte de type I, Type II cell : pneumocyte de type II. 130
- Figure 46 – Nombre de cellules viables **(A)** NCI-H441 et **(B)** HULEC-5a cultivées dans différentes conditions pendant 8 jours. 136
- Figure 47 – Illustrations de l'expérimentation de perméabilité de la barrière cellulaire au bleu Trypan. **(A)** Les monocultures (NCI-H441 et HULEC-5a), la co-culture des 2 lignées et le contrôle sont mis en contact, sur la partie apicale de l'insert, d'une solution de bleu Trypan dilué au 1/16^{ème} dans le milieu spécifique. **(B)** Plaque de 96 puits contenant les 100 μL prélevés du côté basolatéral à des temps prédéfinis. **(C)** Cinétiques des absorbances normalisées par rapport au T₀ correspondant pour chaque condition, à J4, J7 et J9 de culture. Analyse statistique : Comparaison des monocultures (NCI-H441 (\blacktriangle et *) et

HULEC-5a (● et *) et de la co-culture (■ et *) versus contrôle (◆) à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. n = 3 expérimentations en triplicata. 138

Figure 48 – Évolution de la résistance trans-épithéliale/endothéliale (TEER) électrique au cours du temps. Densités cellulaires initiales pour HULEC-5a à J0 et NCI-H441 en monoculture et co-culture à J2 sont de 5×10^4 /puits pour les deux lignées. Analyse statistique : Comparaison des monocultures NCI-H441 (▲ et *) et HULEC-5a (● et *) versus co-culture (■) et monoculture NCI-H441 versus monoculture HULEC-5a (*) à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. n = 3. 140

Figure 49 – Images d'immunofluorescence obtenues pour (A) le marqueur CD31 membranaire (#ab28364, Abcam, 1/100^{ème}) et (B) le facteur de von Willebrand cytoplasmique (#ab6994, Abcam, 1/100^{ème}) pour les cellules endothéliales HULEC-5a, ainsi que pour (C) l'occludine (#33-1500, Thermo Fisher, 1/100^{ème}) pour les cellules épithéliales alvéolaires NCI-H441. Les anticorps secondaires utilisés sont pour (A) et (B) les anticorps secondaires chèvre anti-lapin conjugués à l'Alexa fluor-488 (#AP132JA4, Sigma-Aldrich, 1/500^{ème}) et pour (C) les anticorps secondaires chèvre anti-souris conjugués à l'Alexa fluor-647 (#ab150115, Abcam, 1/500^{ème}). Les flèches blanches indiquent le marquage membranaire. 143

Liste des annexes

Annexe 1 – Résultats des méta-analyses sur l’efficacité des cigarettes électroniques dans le sevrage tabagique.....	264
Annexe 2 – Liste des critères d’inclusion et de non-inclusion dans l’essai clinique VAPexp’AIR	266
Annexe 3 – Fiche de rappel des tâches à réaliser pour le bon déroulement des visites de suivi.....	267
Annexe 4 – Auto-questionnaire à compléter lors de la visite de suivi V1.....	270
Annexe 5 – Test de Fagerström en 6 questions sur la dépendance nicotinique.....	274
Annexe 6 – Auto-questionnaire simplifié à compléter lors de la visite de suivi V2.....	275
Annexe 7 – Recommandations des sociétés savantes et institutions sur l’utilisation de la cigarette électronique dans le sevrage tabagique.....	277

Introduction

I. Point sur la consommation tabagique dans le monde et en France

La consommation chronique de tabac ou tabagisme cause plus de 8 millions de morts chaque année dans le monde, dont environ 1,2 million concerne des non-fumeurs involontairement exposés à la fumée. Par conséquent, il représente la première cause de décès évitables et une des plus graves menaces ayant jamais pesé sur la santé publique mondiale (Organisation mondiale de la santé, OMS, <https://www.who.int/fr>).

En France, la prévalence tabagique diffère selon le sexe, l'âge, les régions géographiques et le niveau de vie. Depuis 2014, le renforcement de la lutte contre le tabagisme se traduisant par la mise en place de plans nationaux impliquant des mesures comme le remboursement des substituts nicotiques, la hausse des prix du tabac et la prévention du tabagisme, a permis une réduction de 4,5 % du tabagisme quotidien entre 2014 et 2019. Ainsi, en 2019, 34,6% des hommes et 26,5 % des femmes de 18 à 75 ans déclaraient fumer. Malgré tout, pour la même année, la prévalence du tabagisme restait élevée en France par rapport aux pays anglo-saxons où elle s'élevait à 14 % au Royaume-Uni et aux États-Unis) (sites consultés le 07/10/2022 : <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/healthandlifeexpectancies/bulletins/adultsmokinghabitsingreatbritain/2019>; https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/adult_data/cig_smoking/index.htm). En 2020, dans un contexte de crise sanitaire, le baromètre de Santé Publique France montrait un arrêt de la dynamique de réduction de la prévalence du tabagisme aboutissant à une stabilisation des données observées en 2019 (Pasquereau et al., 2021) (Figure 1).

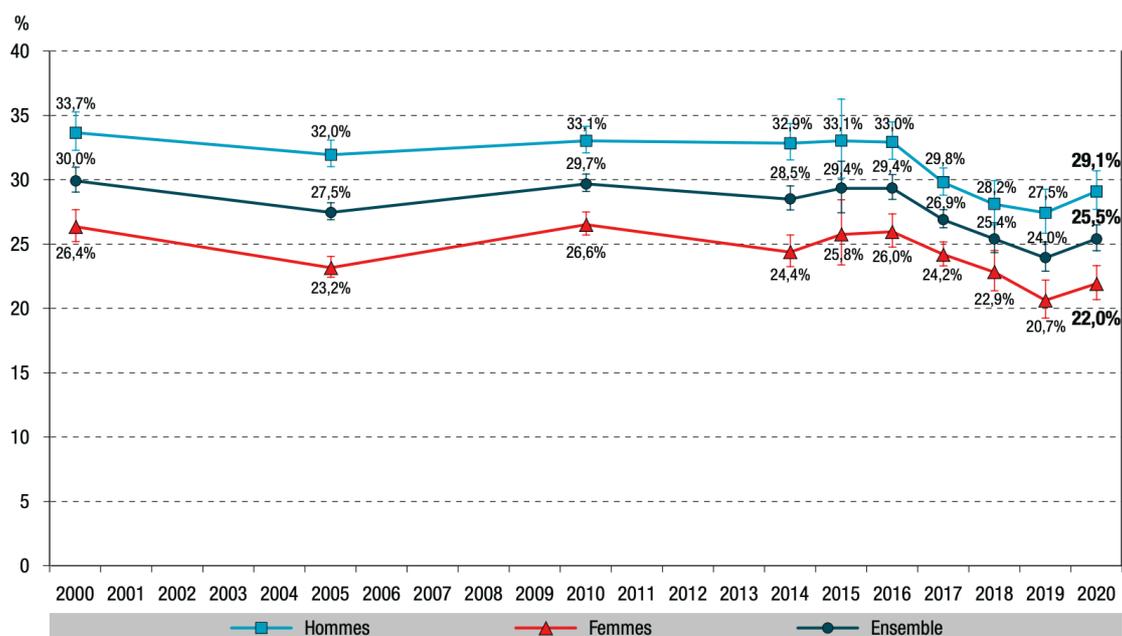


Figure 1 - Prévalence du tabagisme quotidien selon le sexe parmi les 18-75 ans, France, évolution 2000-2020. Source : Pasquereau et al. 2021

Responsable de plus de 73 000 décès annuels en France, le tabagisme constitue la première cause de mortalité évitable (Bonaldi, 2017) et le coût économique annuel de la morbidité liée au tabac est estimé à 122 milliards d'euros (Kopp, 2015).

Dans ce contexte, la lutte contre le tabagisme est une priorité de santé publique, mais se heurte à la difficulté du sevrage de l'addiction tabagique qui passe par le biais de la nicotine, mais aussi par d'autres mécanismes comme le geste comportemental ou encore le plaisir de la sensation de la fumée au fond de la gorge. En France en 2020, 29,9 % des fumeurs quotidiens avaient fait une tentative de sevrage d'au moins une semaine au cours des 12 derniers mois. Si cet indicateur a subi une réduction significative par rapport à 2019 (33,4 %, $p < 0,05$), il reste à un niveau supérieur aux années précédentes (~25 % entre 2016 et 2018), montrant la volonté d'arrêter le tabac dans une large population de fumeurs (Pasquereau et al., 2021). Néanmoins, pour ceux qui ont réussi un sevrage, seuls 5 % des fumeurs réussissent à rester abstinents au tabac sur le long terme (Hughes, Keely, and Naud 2004). Pour augmenter la proportion de sevrages tabagiques réussis, il est important de mettre à disposition des consommateurs des

moyens psychopharmacologiques efficaces pour lutter contre la dépendance à la nicotine. En France, de nombreuses pharmacothérapies d'aide au sevrage tabagique sont disponibles sur le marché parmi lesquelles se trouvent les substituts nicotiques (gommes, patches à la nicotine...), le bupropion (ZYBAN®) (inhibiteur de la recapture de la noradrénaline et de la dopamine) ou la varénicline (CHAMPIX®) (agoniste partiel du récepteur nicotinique cholinergique $\alpha 4\beta 2$ et agoniste entier du récepteur nicotinique cholinergique $\alpha 7$) (Cahill et al. 2016). Malgré la vaste panoplie de moyens pharmacologiques disponibles utilisés, le pourcentage de réussite aux tentatives de sevrage tabagique reste faible (environ 10 %) (Fagerström and Eissenberg 2012). En effet, lorsque l'individu arrête de fumer, l'absence de nicotine provoque un manque parfois douloureux caractérisé par une irritabilité, de l'anhédonie et de l'anxiété, des difficultés de concentration, des troubles du sommeil et une augmentation de l'appétit (Hughes and Hatsukami 1986). Par ailleurs, les substituts nicotiques disponibles sur le marché ne délivrent pas la nicotine selon le même profil pharmacocinétique que la cigarette. Cela laisse souvent l'individu insatisfait car il présente un syndrome de sevrage lié à l'arrêt du tabac qui n'est que partiellement compensé par les produits de substitution. Pour augmenter la probabilité de réussir à arrêter de fumer, il est conseillé de combiner des traitements substitutifs nicotiques possédant des pharmacocinétiques de libération de la nicotine complémentaires comme le patch qui permet une libération progressive de la nicotine à travers la peau et le spray nasal qui permettent une absorption rapide de la nicotine par la muqueuse nasale (Lindson et al. 2019). Toutefois, le pourcentage d'abstinence à 6 mois pour une telle combinaison thérapeutique reste encore faible (15,5%) (Caldwell, Adamson, and Crane 2014). Il est donc important de développer des systèmes permettant une délivrance de nicotine plus attractive en termes de geste comportemental et d'effets pharmacologiques recherchés par les fumeurs.

II. La cigarette électronique : un nouveau dispositif de délivrance de la nicotine

Un nouveau dispositif de délivrance de nicotine, la cigarette électronique (e-cigarette, vapoteuse ou vaporette), a fait son apparition en France dans les années 2005 et a initialement été présenté comme non nocif ou moins nocif, les producteurs mettant en avant la e-cigarette comme un instrument efficace dans la politique de réduction du risque de nuire à la santé par rapport au tabac. Depuis sa création par le pharmacien Lik Hon (Chine, 2003), le marché international de la e-cigarette n'a cessé de se développer, atteignant 1 milliard d'euros en France en 2021.

En 2020, en France, 37,4 % des 18-75 ans ont déclaré avoir déjà expérimenté la e-cigarette. Ce pourcentage est en hausse par rapport à 2019 (34,4 %, $p < 0,001$). Dans la même tranche d'âge, 5,4 % des 18-75 ans déclarent utiliser la e-cigarette et la prévalence du vapotage quotidien s'élevait à 4,3 % (Pasquereau et al., 2021).

Malgré l'existence d'un grand panel de dispositifs électroniques proposé dans le commerce, une e-cigarette se compose toujours de trois éléments de base : un atomiseur, un réservoir qui contient un liquide (e-liquide) et une batterie. Toutes les e-cigarettes fonctionnent selon un principe commun d'aérosolisation du e-liquide par le chauffage d'une résistance (Figure 2).

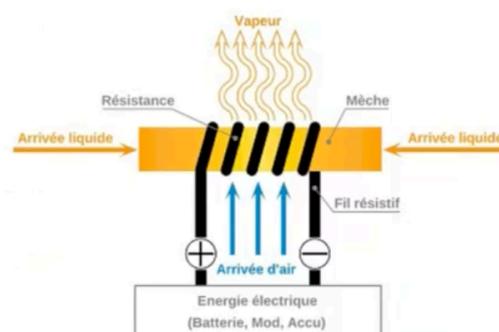


Figure 2 – Mécanisme de transformation du e-liquide en aérosol par la cigarette électronique. Source : *Comment fonctionne une cigarette électronique ?* (www.cigaretteelec.fr, site consulté le 07/10/2022)

Le e-liquide contient principalement 4 types de molécules : le propylène-glycol (PG), la glycérine végétale (VG), la nicotine et des molécules aromatiques. Le PG et la VG permettent

la formation de l'aérosol et servent de véhicule à la molécule de nicotine ainsi qu'aux arômes. Le PG et la VG peuvent être présents en différentes proportions, ce qui définit le ratio PG/VG. Ce ratio détermine l'aspect du nuage d'aérosol (volume, densité) et la sensation de contraction de la gorge chez l'utilisateur lors de l'inhalation de l'aérosol (ou « hit ») : plus un e-liquide sera riche en VG, plus il sera épais et visqueux et le volume d'aérosol produit sera important, ce qui se traduira par des gros nuages d'aérosol. Inversement, plus un e-liquide sera riche en PG, plus il sera fluide, le volume d'aérosol sera réduit et le nuage d'aérosol sera presque invisible. Cependant, la sensation de contraction dans la gorge lors du contact de l'aérosol sur la muqueuse sera importante (Harvanko et al. 2019).

Le PG, la VG et la vaste gamme d'arômes présents dans les e-liquides sont le plus souvent d'origine agro-alimentaire. Par ailleurs, certains additifs comme l'éthanol, peuvent être ajoutés en faible quantité dans la composition des e-liquides.

III. Caractéristiques des principaux composants des e-liquides

1) Le propylène-glycol

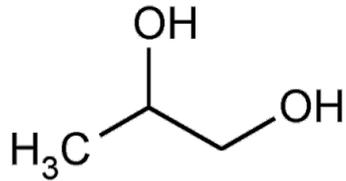


Figure 3 - Formule semi-développée du propylène-glycol.

a) Propriétés physico-chimiques

Le PG (Figure 3) est un liquide incolore, légèrement visqueux à température ambiante, peu volatil et pratiquement inodore. Étant très hygroscopique, il est utilisé dans l'industrie comme humectant pour absorber l'eau et maintenir l'humidité dans certains médicaments, cosmétiques ou produits alimentaires. Il est également utilisé comme solvant pour les colorants et les arômes dans l'industrie de la peinture et des plastiques. Par ailleurs, le PG est utilisé comme excipient dans des produits pharmaceutiques à application topique, des solutions parentérales, des solutions orales ou des aérosols. Dans les e-liquides, le PG est utilisé pour sa capacité à solubiliser la nicotine et les arômes.

b) Propriétés pharmacocinétiques

Le PG est bien absorbé par voie orale, mais aussi par la peau et les muqueuses. Comme illustré dans la figure 4, le métabolisme du PG passe par des oxydations, dans le foie, par des déshydrogénases NAD-dépendantes et est transformé en acide lactique puis en acide pyruvique. Environ 45 % du PG est éliminé par voie rénale sous forme inchangée ou après glucuronidation.

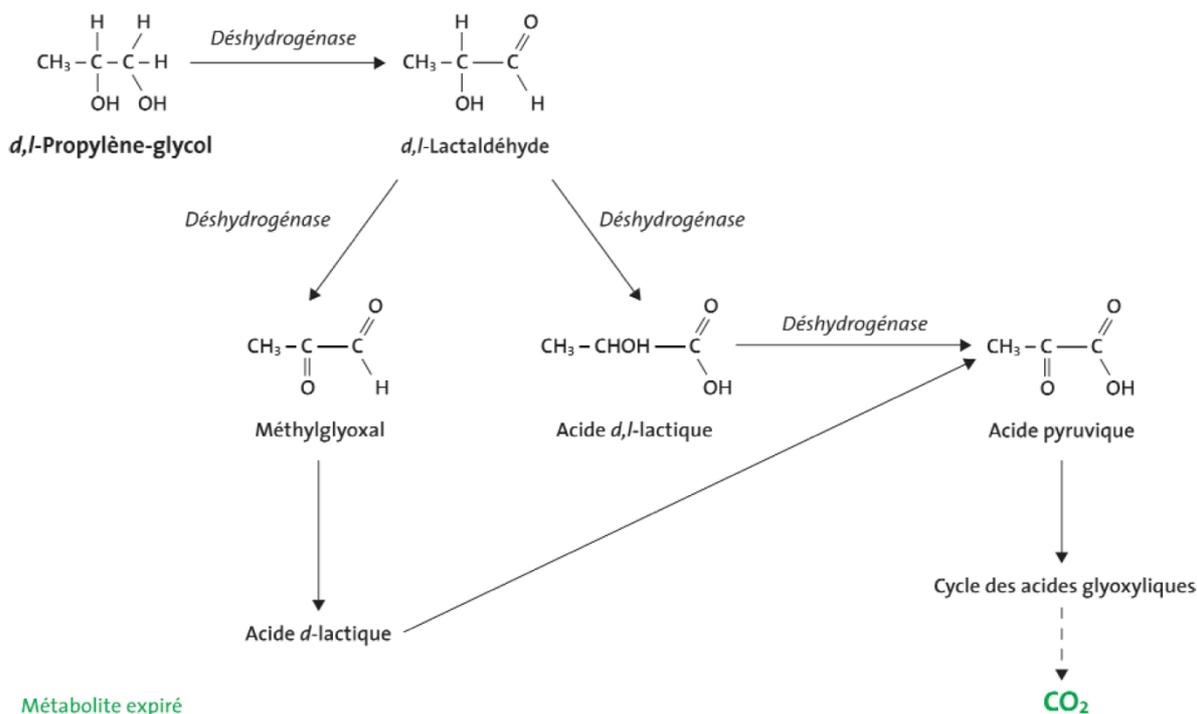


Figure 4 - Voies métaboliques hépatiques du propylène glycol. Source : Fiche INRS_226.

La demi-vie d'élimination du PG est dose-dépendante. A des doses IV de 3 ou 4,5 g/m² administrées sur une durée de 4 heures, la demi-vie terminale était d'environ 1,8 heure et pour des doses plus élevées (7,5 g/m² sur 4 heures), la demi-vie augmentait à 3,1 heures, ce qui suggère une élimination saturable du PG (Speth et al. 1987). Après des administrations répétées *per os* de doses plus élevées (20,7 g trois fois par jour, ou 41,4 g deux fois par jour), des demi-vies terminales de 3,8 ± 0,8 heures ont été identifiées (Yu, Elmquist, and Sawchuk 1985).

Aucune étude pharmacocinétique n'a évalué les concentrations de PG dans le sang/sérum après l'utilisation de dispositifs contenant des e-liquides à base de PG.

c) Effets des expositions aiguë et chronique

Des valeurs de dose létale médiane (DL50) par voie orale ont été rapportées chez la souris (25 à 32 g/kg), le rat (8 à 46 g/kg) et le cobaye (18 à 20 g/kg) après une exposition orale aiguë au PG (United States Environmental Protection Agency, 2008). Les études de toxicité chronique chez l'animal n'ont pas réussi à démontrer, ni à identifier un organe cible de la toxicité du PG

pour des doses allant jusqu'à plusieurs grammes par kilogramme et par jour, et dépassant celles d'une exposition alimentaire ou professionnelle (Gaunt et al. 1972; McMartin 2014). Cependant, des cas cliniques publiés attestent que l'administration par voie orale ou intraveineuse de doses très élevées de PG chez l'homme peut produire des effets toxiques qui semblent être liés à l'hyperosmolarité du PG et à une acidose métabolique liée à la formation d'acide lactique secondaire à son métabolisme (Lim, Poole, and Pageler 2014).

Aucune valeur limite d'exposition (VLE) professionnelle n'a été établie par l'Union Européenne (UE) pour le PG et la Food and Drug Administration (FDA) en 1973 a classé le PG parmi les molécules « généralement reconnues pour être sûres » (Generally Recognized As Safe ou GRAS). Les substances GRAS sont considérées comme généralement sûres dans les conditions d'utilisation comme additif alimentaire et sont considérées sans danger lors d'ingestions, mais pas nécessairement pour d'autres voies d'administration comme l'inhalation. En 1974, l'OMS a recommandé une dose maximale de 25 mg/kg/jour de PG ingérée comme additif alimentaire.

Le PG étant utilisé lors de spectacles pour former des brouillards organiques, sa toxicité a fait l'objet d'études et d'une législation détaillée. Ainsi, la VLE professionnelle fixée par le Royaume-Uni est de 474 mg/m³. Une VLE sur 8 heures de 10 mg/m³ a été établie par l'Occupational Safety and Health Administration (OSHA, 2006) pour tous les brouillards organiques sans limites d'exposition spécifiques, ni de toxicité identifiée. Le Conseil de la santé des Pays-Bas recommande, en 2007, une limite d'exposition au PG de 50 mg/m³ sur 8 heures. Enfin, une dose maximale cumulée de 69 g/jour a été proposée pour la population pédiatrique (Lim et al. 2014).

Les effets du PG sur la santé, à la suite d'une exposition chronique par inhalation chez l'animal, sont pauvrement décrits dans la littérature et ne révèlent pas de toxicité majeure (Konrádová, Vávrová, and Janota 1978; Suber et al. 1989). Il n'existe pas d'études cliniques sur la toxicité potentielle du PG (par exemple, trou anionique, acidose lactique, ...) chez les utilisateurs

intensifs de e-cigarettes. Les concentrations de PG dans l'air après une consommation quotidienne extrême de e-liquide (5 à 25 mL/jour avec 50 à 95 % de PG dans le e-liquide) ont été estimés entre 1 et 6 mg/m³. Ces niveaux d'exposition sont suffisamment proches de la VLE pour être considérés comme préoccupants (Burstyn 2014).

Dans les conditions ambiantes de température et de pression, le PG est un produit stable. À température élevée (> 127°C), la décomposition des fonctions hydroxyles, selon les conditions de génération d'aérosols, peut induire la formation de composés volatils toxiques tels que les époxydes (oxyde de propylène ou 2,3-époxy-1-propanol) et les aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde) (Sleiman et al. 2016; Uchiyama et al. 2020) (Figure 5).

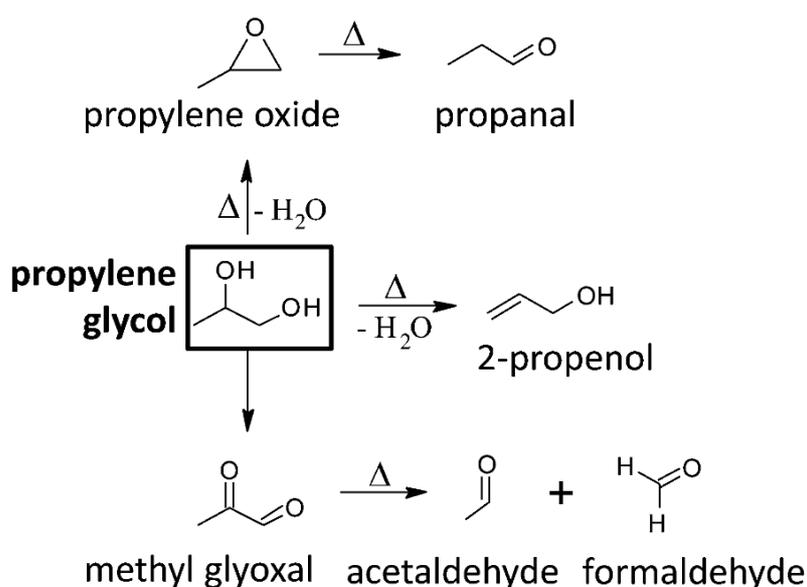


Figure 5 – Voies et sous-produits possibles formés lors de la déshydratation thermique du propylène-glycol.
Source : Sleiman et al. 2016.

La formation de ces produits de dégradation dépend des caractéristiques du dispositif (puissance du dispositif, apport en oxygène), de la proportion PG/VG dans le e-liquide et des habitudes de vapotage de l'utilisateur (Kosmider et al. 2014; Laino et al. 2012; Ooi et al. 2019; Sleiman et al. 2016; Son, Giovenco, et al. 2020). Le PG ayant une température de décomposition thermique plus basse que la VG (127°C versus 200°C), les e-liquides ayant un pourcentage plus grand de PG que de VG produisent, dans les mêmes conditions d'aérosolisation, davantage de

composants toxiques que les e-liquides ayant des pourcentages plus faibles de PG (Kosmider et al. 2014; Son, Giovenco, et al. 2020).

In vitro, un nombre restreint d'études a examiné les effets du PG sous forme liquide ou d'aérosol et les résultats varient d'une étude à l'autre. Certaines de ces études ont montré que l'exposition au PG augmentait faiblement la concentration d'IL-6 et n'avait que peu d'effets néfastes sur les cellules macrophagiques et les voies respiratoires (Escobar et al. 2020). Toutefois, dès une concentration de 3 % (V/V), la présence de PG dans le milieu de culture cellulaire diminue la croissance cellulaire et modifie le métabolisme du glucose en diminuant l'entrée du glucose dans des cellules épithéliales des voies respiratoires (Woodall et al. 2020). Dans une autre étude sur des cellules épithéliales des voies aériennes inférieures, le PG sous forme liquide appliqué dans le milieu de culture cellulaire a diminué la viabilité cellulaire, a induit des dommages de l'ADN, a conduit à l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1 et a augmenté le nombre de cellules positives à la caspase 3/7 indiquant une mort cellulaire par apoptose (Komura et al. 2022).

2) La glycérine végétale

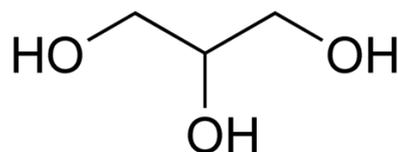


Figure 6 - Formule semi-développée de la glycérine végétale ou glycérol.

a) Propriétés physico-chimiques

La VG ou glycérol (Figure 6), de masse molaire 92,1 g/mol, est un liquide incolore, inodore, au goût sucré et de texture très visqueuse dans les conditions de pression et de température ambiante. Elle est soluble dans l'eau et l'éthanol et est également très hygroscopique.

La VG est largement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique comme solvant, hydratant ou lubrifiant. Dans le domaine pharmaceutique, la VG entre dans la

composition des crèmes à usage topique, des suppositoires, des sirops et des pastilles (Lin 1977). La VG est utilisée également pour ses propriétés hyperosmotiques dans le traitement à court terme de la constipation et dans certaines chirurgies oculaires.

b) Propriétés pharmacocinétiques

Après ingestion, la VG est rapidement absorbée par les muqueuses de l'estomac et de l'intestin. Le temps nécessaire pour atteindre la concentration sérique maximale varie entre 60 à 90 minutes. La VG est métabolisée en glycérol-3-phosphate par la glycérol-kinase principalement dans le foie (80 à 90 % de la VG ingérée). Le glycérol est utilisé dans le métabolisme glucidique permettant la synthèse du glucose et du glycogène (Bortz et al. 1972). La VG peut également se combiner avec des acides gras libres pour former des triglycérides qui seront stockés dans le tissu adipeux (Xue, Chen, and Jiang 2017). Un pourcentage d'environ 10 % de la VG est excrété sous forme inchangée dans les urines.

c) Effets des expositions aiguë et chronique

Comme le PG, la VG est classée comme GRAS par la FDA (Azelee et al. 2019). Toutefois, un faible risque de toxicité de la VG après exposition cutanée ou ingestion existe. Ainsi, une ingestion excessive peut provoquer des vomissements, des diarrhées, des douleurs abdominales, une augmentation de la glycémie et une augmentation des triglycérides dans le sang, cependant cette dernière semble être sexe-dépendante (MacDonald 1970).

Les effets de la VG, à la suite d'une exposition aiguë et chronique par inhalation à des concentrations croissantes dans l'air chez le rat, sont légers et apparaissent uniquement pour les forts niveaux d'exposition (Renne et al. 1992).

Dans les études expérimentales chez l'animal, la DL50, après ingestion orale, varie de 2,53 à 58,4 g/kg chez le rat, de 4,9 à 38 g/kg chez la souris et elle est estimée à 77,5 g/kg chez le

cobaye et à 27 g/kg chez le lapin, alors que chez l'homme, la DL50 est estimée à 1,43 g/kg (Bartsch et al. 1976; Becker et al. 2019).

Chez l'animal, la toxicité par inhalation est faible (Becker et al. 2019). Cependant, il a été mis en évidence que les e-liquides contenant des pourcentages élevés de VG produisent des niveaux élevés de substances toxiques telles que le formaldéhyde, l'acétaldéhyde et l'acroléine. La présence de ces aldéhydes associée à l'irritation des voies respiratoires et/ou à la carcinogénicité restent un point de vigilance (Ooi et al. 2019).

In vitro, des cellules de l'épithélium bronchique exposées à la VG sous forme d'aérosol ont montré une augmentation de l'expression de la protéine Hème oxygénase-1 (HO-1) et de la présence de protéines carbonylées. Tous ces éléments sont des marqueurs liés à une augmentation du stress oxydant cellulaire. Cependant, l'exposition à la forme liquide de la VG, ne modifie pas ces marqueurs de l'inflammation ou du stress oxydant (Escobar et al. 2020). D'autres études montrent que des pourcentages de 2 à 4 % de VG appliqués sous forme liquide sur des cellules épithéliales des voies aériennes inférieures diminuent significativement la viabilité cellulaire, sans pour autant augmenter les marqueurs de l'apoptose (Komura et al. 2022).

3) La nicotine

La nicotine est le principal alcaloïde retrouvé dans plus de la moitié des 75 espèces connues de plantes du genre *Nicotiana*. Elle est la principale molécule responsable de l'addiction au tabac qui conditionne les habitudes de consommation tabagique. Cependant, ses propriétés pharmacologiques sont également utilisées, dans différentes formes galéniques, comme aide au sevrage tabagique. Il est donc important de mieux comprendre les caractéristiques physico-chimiques de cette molécule, de caractériser les facteurs pouvant influencer sa délivrance, sa distribution et son excrétion de l'organisme, ainsi que de discuter de ses effets sur l'organisme.

a) Propriétés physico-chimiques

La 3-(1-méthyl-2-pyrrolidinyl)-pyridine ou nicotine, de formule brute $C_{10}H_{14}N_2$ possède une masse molaire de 162,2 g/mol. La nicotine est une base faible ayant une constante de dissociation (pKa) de 8,02, signifiant, selon l'équation d'Henderson-Hasselbach, que dans une solution aqueuse de pH égal à 8,02, 50 % de la nicotine se trouve sous forme ionisée (Perfetti 1983).

La substance pure se présente sous forme d'un liquide hygroscopique huileux, jaune translucide, ayant une odeur caractéristique et s'oxydant au contact de l'air ou lors de l'exposition à la lumière, en prenant une couleur brunâtre. Miscible dans l'eau et très soluble dans l'éthanol et les solvants organiques ($\log P = 1,2$) la nicotine a une température de fusion de -80°C et un point d'ébullition de 247°C . La forme pharmacologiquement active et très majoritairement présente est la forme (*S*)-nicotine. Moins de 1 % de la nicotine contenue dans les feuilles de tabac est sous forme de (*R*)-nicotine (Armstrong, Wang and Ercal, 1998) (Figure 7), bien que le pourcentage de cet énantiomère (*R*) augmente autour de 10 % dans la fumée de tabac, probablement par racémisation lors du processus de combustion (Hukkanen, Jacob, and Benowitz 2005).

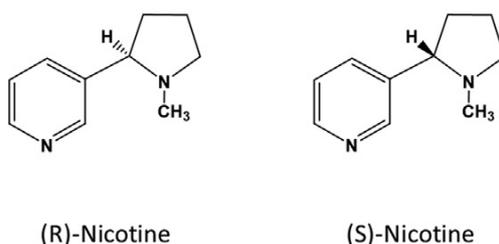


Figure 7 – Représentation des énantiomères R et S de la molécule de nicotine.

b) Réglementation

La nicotine est le principe actif des e-cigarettes. Elle est à l'origine de l'addiction pharmacologique au tabac. Plus généralement, elle est présente dans tous les produits dérivés du tabac qui suivent une réglementation particulière. Pour ce qui concerne les cigarettes

électroniques, il a été constaté que la concentration de nicotine déclarée sur l'étiquette du produit variait dans deux tiers des cas de $\pm 10\%$ par rapport à celle retrouvée réellement dans le e-liquide. De manière plus préoccupante, des quantités non-négligeables de nicotine ont été identifiées dans des e-liquides commercialisés et étiquetés « sans nicotine » (Davis et al. 2015). En conséquence, cette dernière décennie, des règles et des contrôles ont été instaurés au niveau mondial afin de réduire ces manquements. Pour exemple, la réglementation européenne par la directive n° 2014/40/UE et l'ordonnance n° 2016-623 du 19 mai 2016 applicable en France est consultable en ligne sur le site du journal officiel (<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000032547462/>). Ce texte définit les produits de vapotage, ainsi que les règles liées à leur consommation en France. Il précise notamment la limitation des volumes des contenants de e-liquides, la présence obligatoire d'un dispositif de sûreté sur le contenant, des étiquetages spécifiques, les règles encadrant la publicité de ces produits, l'interdiction de la vente aux mineurs et une déclaration préalable à leur mise sur le marché auprès de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Cependant, la réglementation diffère d'un pays à l'autre. Par exemple, la concentration maximale de nicotine dans les e-liquides est fixée à 20 mg/mL au sein de l'UE permettant une délivrance d'environ 1 mg de nicotine en 5 minutes de vapotage (comme une cigarette classique), alors que d'autres pays n'ont pas fixé de limite supérieure, d'où la présence sur des sites de e-commerce de e-liquides contenant des concentrations de nicotine allant jusqu'à 60 mg/mL. Dans d'autres pays comme l'Australie, les e-liquides contenant de la nicotine sont interdits à la vente. En outre, l'âge minimum permettant l'achat de e-liquides varie selon les pays. Il est de 16 ans en Belgique, de 18 ans en France, de 19 ans en Corée du Sud et de 21 ans aux États-Unis. Par ailleurs, sur les sites de e-commerce, l'âge est validé en un clic par l'acheteur sans véritable vérification de l'âge par le vendeur par la suite.

S'il y a autant de débat sur la réglementation des dispositifs délivrant la nicotine, c'est parce que la nicotine contenue dans les e-liquides est à la fois addictive et toxique en cas d'ingestion. En effet, des cas d'intoxication involontaire notamment chez les enfants ou de tentatives d'autolyse ont été rapportés dans la littérature (Maessen et al. 2020). C'est également la raison pour laquelle le règlement UE 2017/776 de la commission du 4 mai 2017 a modifié la classification, l'étiquetage et les mentions de danger devant apparaître sur l'emballage des produits contenant de la nicotine. Ainsi, la nicotine est classée comme mortelle par inhalation (H330), par contact cutané (H310) et en cas d'ingestion (H300). Elle est également classée comme toxique pour les organismes aquatiques et entraînant des effets néfastes à long terme sur l'environnement (H411).

Outre les effets néfastes potentiels de la e-cigarette sur la santé du vapoteur (vapotage actif), le vapotage passif lors de l'exposition à l'aérosol provenant de l'air exhalé du vapoteur peut également avoir un impact sur les non-vapoteurs par des mécanismes d'inhalation et de passage cutané des composants (Czogala et al. 2014; Flouris et al. 2013; Kuga et al. 2020; Schripp et al. 2013). À ce jour, il n'y a toujours pas de consensus sur la dose létale de nicotine. La dose historiquement retrouvée dans la littérature est de 60 mg après une prise orale unique, ce qui équivaut à une concentration de nicotine dans le sang d'environ 180 ng/mL (Mayer 2014). Cependant, des publications récentes ont montré que des adultes survivent à des doses allant jusqu'à 500 mg et les plus faibles concentrations plasmatiques létales de nicotine sont autour de 1600 ng/mL (Maessen et al. 2020).

c) Propriétés pharmacocinétiques

i. Absorption de la nicotine à partir des liquides pour cigarettes électroniques

Il existe une grande variabilité dans les résultats retrouvés dans la littérature concernant la délivrance de la nicotine à partir des cigarettes électroniques. Quelques facteurs pouvant jouer un rôle dans cette variabilité sont mentionnés ci-dessous :

- *Les caractéristiques des systèmes générateurs d'aérosol utilisés*

Un grand nombre de dispositifs électroniques de délivrance de la nicotine sont disponibles. Ils peuvent être facilement classés selon leur aspect visuel, mais également selon leurs caractéristiques de délivrance de la nicotine en quatre générations apparaissant successivement sur le marché (Figure 8).

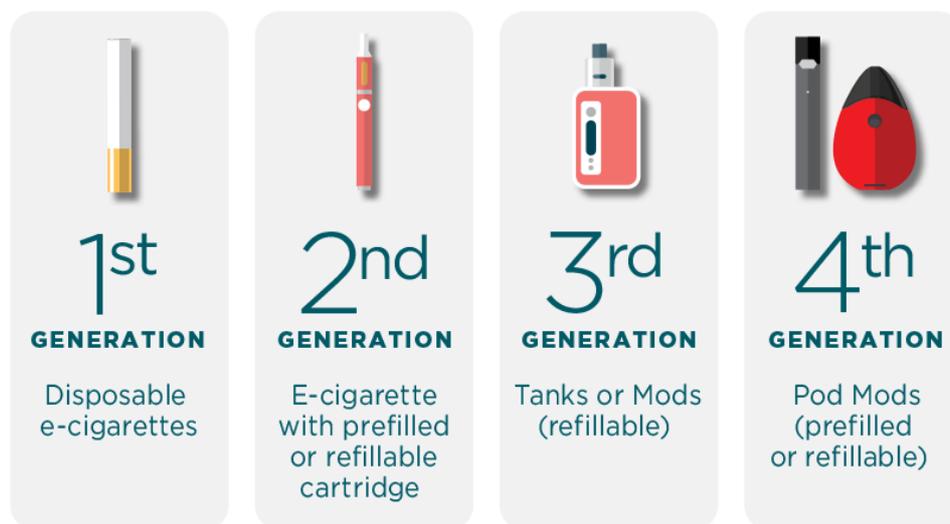


Figure 8 – Évolution de la cigarette électronique et classification en 4 générations successives. Source : site de *Texas department of state health services* consulté le 07/10/2022 (<https://www.dshs.texas.gov/Vaping/WhatIsVaping/>)

- Les cigarettes électroniques de première génération

Les e-cigarettes dites de première génération (« cig-a-likes »), sont majoritairement des systèmes non-rechargeables et possèdent des cartouches de e-liquide jetables. L'inhalation est détectée par le capteur de flux d'air (« airflow »), qui enclenche le réchauffement du e-liquide par capillarité avec la résistance et induit son aérosolisation. Les études pharmacocinétiques montrent que ces dispositifs délivrent rapidement, mais faiblement la nicotine. Par exemple, chez des sujets non-expérimentés à leur utilisation, des concentrations plasmatiques maximales

(C_{\max}) de nicotine ont été mesurées entre 1,3 à 2,5 ng/mL (Bullen et al. 2010; Vansickel et al. 2010) et chez les vapoteurs expérimentées les concentrations sont légèrement plus élevées (C_{\max} de 5,7 à 13,9 ng/mL) (Dawkins and Corcoran 2014; Hajek et al. 2015). Ces systèmes, ne satisfaisant pas les consommateurs, ont été peu utilisés comme substituts nicotiques (Farsalinos, Spyrou, Stefopoulos, et al. 2015). De plus, les cartouches étant majoritairement non-rechargeables, leurs concentrations en nicotine pouvaient être aléatoires, voire inconnues. Toutes ces raisons ont provoqué la disparition presque totale de ces systèmes du marché.

- Les cigarettes électroniques de deuxième génération

Les e-cigarettes de seconde génération (de type « eGo ») possèdent une batterie et une cartouche de e-liquide rechargeables. Elles ont une puissance électrique (batterie) plus importante et délivrent une quantité plus importante d'aérosol et de nicotine (Talih et al. 2015). Les C_{\max} de nicotine varient entre 8,4 et 30,4 ng/mL (Farsalinos, Spyrou, Stefopoulos, et al. 2015; Hajek et al. 2017; Ramôa et al. 2016; St.Helen et al. 2016; Yingst et al. 2019) et ces concentrations dépendent essentiellement de la dose de nicotine dans le e-liquide (Lopez et al. 2016; Ramôa et al. 2016) et de l'habitude à utiliser le dispositif (Farsalinos, Spyrou, Stefopoulos, et al. 2015; Fearon et al. 2017).

- Les cigarettes électroniques de troisième génération

Les cigarettes électroniques de troisième génération sont dotées d'un réservoir rechargeable et d'un atomiseur restructible. Elles donnent la possibilité de paramétrer l'intensité électrique délivrée, soit en termes de tension (voltage variable), soit en termes de puissance (wattage variable). Ces dispositifs délivrent une quantité plus importante de nicotine, qui est comparable à celle absorbée à partir d'une cigarette classique (Hajek et al. 2017; Wagener et al. 2017). En conséquence, ces systèmes doivent *a priori* mieux satisfaire les anciens fumeurs, mais *a contrario*, prolongent ou induisent plus d'addiction que les systèmes des générations

précédentes. Par ailleurs, le réglage de l'intensité par l'utilisateur, lui permet de moduler la délivrance de nicotine selon le type de e-liquide et ses besoins en nicotine.

- Les cigarettes électroniques de quatrième génération

Les systèmes de quatrième génération ont été mis sur le marché à partir de 2015 par la société JUUL Labs® et ils ressemblent davantage à une clé USB qu'à une cigarette électronique. Du fait de leur extrême facilité d'emploi et leur design élégant, les JUUL® sont des produits marketing qui séduisent énormément les adolescents et les jeunes adultes. Par ailleurs, ces dispositifs se distinguent de la cigarette électronique classique par le fait qu'ils contiennent des sels de nicotine à la place de la nicotine libre dans les e-liquides. L'ajout d'acides faibles (acides benzoïque, citrique, pyruvique, salicylique...) qui se volatilisent à la même température que le PG et la VG, stabilise la molécule de nicotine protonée, prolongeant ainsi son activité et empêchant son oxydation. Une fois que les gouttelettes d'aérosol sont déposées dans les alvéoles pulmonaires, la nicotine se dissocie de l'acide et traverse la barrière alvéolo-capillaire. L'absorption de la nicotine est rapide et les concentrations sanguines sont similaires à celles d'une cigarette classique ($C_{\max} = 20,4 \text{ ng/mL}$) (Hajek et al. 2020). Comme attendu, les C_{\max} dépendent de la concentration initiale de sels de nicotine dans le e-liquide (O'Connell et al. 2019). En conséquence, ces systèmes non réglables et séduisant une jeunesse de non-fumeurs sont souvent considérés comme une porte d'entrée vers l'addiction à la nicotine.

- *Les concentrations de nicotine dans le e-liquide*

Quand la concentration de nicotine augmente dans le e-liquide (0, 8, 18 et 36 mg/mL) et que le paramétrage du dispositif reste constant, la quantité de nicotine délivrée et absorbée par le sujet augmente que ce soit chez les sujets fumeurs naïfs face à l'utilisation d'une e-cigarette ou chez les vapoteurs expérimentés (Hiler et al. 2017; Lopez et al. 2016; Ramôa et al. 2016). Toutefois,

les vapoteurs peuvent contrôler la quantité de nicotine qu'ils inhalent en adaptant leurs habitudes de vapotage (Ramôa et al. 2016).

- *La présence d'arômes*

L'impact des arômes sur l'absorption de nicotine a été très peu étudié. Cependant, les arômes pourraient modifier l'absorption de la nicotine par leurs propriétés physico-chimiques en interagissant avec la molécule de nicotine ou en raison de l'appétence d'une saveur du e-liquide chez l'utilisateur. Ainsi, une première étude testant un prototype de cigarette électronique de première génération a montré que l'arôme mentholé diminue faiblement la C_{\max} de la nicotine comparativement au même e-liquide sans arôme (Walele et al. 2016).

Une autre étude portant sur des dispositifs commercialisés de troisième génération n'a montré aucune différence significative d'absorption nicotinique à partir d'un e-liquide contenant un arôme tabac, un autre contenant un arôme fraise et un dernier comprenant l'arôme habituel des sujets participant à l'étude (St.Helen et al. 2017).

Chez des fumeurs exclusifs, une étude testant cinq arômes (cerise, tabac classique, café, menthol et vanille) dans des liquides contenant 24 mg/mL de nicotine, a montré un pic plasmatique de nicotine plus important après vapotage du e-liquide aromatisé à la cerise ($C_{\max} = 21,2$ ng/mL) et moins important après vapotage de celui contenant l'arôme vanille ($C_{\max} = 9,7$ ng/mL), alors que le temps nécessaire pour atteindre la C_{\max} (T_{\max}) a été de 10 minutes pour l'ensemble des arômes testés (Voos et al. 2020) (Figure 9).

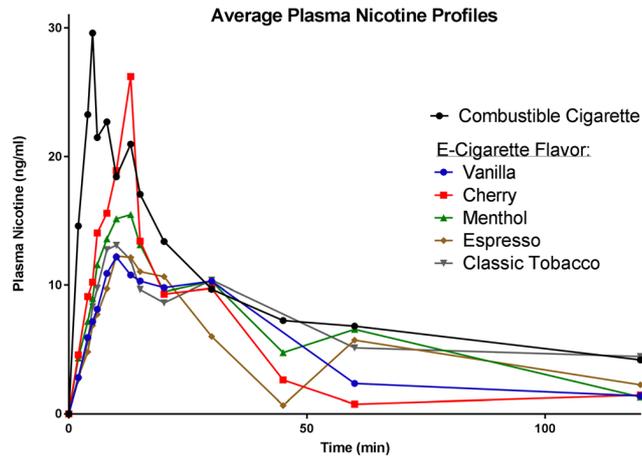


Figure 9 – Profils pharmacocinétiques de la nicotine plasmatique après vapotage de plusieurs e-liquides aromatisés (vanille, cerise, menthol, café, tabac classique) contenant tous 24 mg/mL de nicotine comparés à la cigarette classique (Voos et al. 2020)

- *Le pH des e-liquides*

Le pH des e-liquides varie énormément, entre 4,8 et 9,6, cependant plus de la moitié des e-liquides ont un pH supérieur à 9 (Stepanov and Fujioka 2015). La concentration de nicotine du e-liquide contribue à la valeur du pH, ainsi que d'autres composants comme les arômes (Lisko et al. 2015). DeVito et Krishnan-Sarin suggèrent que le pH des e-liquides pourrait modifier l'absorption de la nicotine en raison de son état d'ionisation (DeVito and Krishnan-Sarin 2018). Cependant, la seule étude clinique qui teste cette hypothèse, dans un de ses objectifs secondaires, ne montre pas de différence sur les paramètres pharmacocinétiques de la nicotine, entre les groupes d'utilisateurs de e-liquide ayant un pH < 9 et un pH > 9 (Voos et al. 2020).

- *Les véhicules de la nicotine*

Le ratio PG/VG influence les caractéristiques de l'aérosol. En ce qui concerne l'absorption de la nicotine de e-liquides contenant des ratios PG/VG différents, une première étude de laboratoire produisant un aérosol de e-cigarette grâce à une machine génératrice d'aérosol a montré que plus la proportion de PG augmente dans le e-liquide, plus la concentration de nicotine augmente dans l'aérosol produit (EL-Hellani et al. 2016). Une étude clinique sur les e-cigarettes de seconde génération montre que l'ajout de PG dans la composition du e-liquide permet l'augmentation de la nicotine absorbée par rapport à un e-liquide contenant de la VG

seule (Yan and D’Ruiz 2015). Cependant, beaucoup d’études mesurant l’absorption de la nicotine à partir des e-cigarettes ne précisent pas le ratio PG/VG utilisé.

- *Comparaison des paramètres pharmacocinétiques de la nicotine délivrée par les e-cigarettes par rapport aux autres dispositifs existant sur le marché*

En plus du mécanisme psycho-comportemental d’addiction au tabac, les modalités de délivrance de la nicotine à partir des différents dispositifs et les concentrations de nicotine sanguine qui en résultent, influencent, en favorisant ou non, le mécanisme d’addiction (Carter et al. 2009; Tomar and Henningfield 1997). Des modalités particulières de délivrance de la nicotine peuvent être utilisées dans la lutte anti-tabac, grâce à des protocoles de substitution nicotinique précis et cliniquement validés. Les données relatives à l’absorption à partir des dispositifs délivrant de la nicotine existant sur le marché sont regroupées dans le tableau suivant (Tableau I).

Tableau I : Tableau résumant les paramètres pharmacocinétiques d’absorption nicotinique à partir de différents dispositifs délivrant de la nicotine. (D’après la source : Sabo, 2021).

Type de dispositif	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (min)	Biodisponibilité (%)	Références
Dispositifs à base de tabac				
Cigarette traditionnelle				
Sang veineux	12 – 50	5 – 8	80 – 90	(Benowitz et al. 1988; Digard et al. 2013; Hajek et al. 2020; Lunell et al. 2000; Rose 1999)
Sang artériel	20 – 60	3 – 5	80 – 90	(Gourlay and Benowitz 1997; Henningfield 1993; Rose 1999)
Tabac à chiquer/à priser	11 – 18	30 – 60	ND	(Benowitz et al. 1988; Digard et al. 2013; Lunell and Curvall 2011)
Système IQOS (ou tabac chauffé)	10 – 15	6 – 8	ND	(Brossard et al. 2017; Picavet et al. 2016)

Substituts nicotiniques				
Gomme	9 - 15	30 – 45	50 – 80	(Digard et al. 2013; Hansson, Rasmussen, and Kraiczi 2017; Lunell and Curvall 2011; Shiffman et al. 2009)
Patch	11 – 23	180 – 720	68 – 100	(Fant et al. 2000; S. Gupta et al. 1993; S. K. Gupta et al. 1993; Prather et al. 1993)
Comprimés à sucer	3 – 11	60 – 66	50 – 79	(Choi et al. 2003; Dautzenberg et al. 2007; Sukhija, Srivastava, and Kaushik 2018)
Spray nasal	5 – 8	10 – 18	60 – 80	(Kraiczi, Hansson, and Perfekt 2011; Schneider et al. 1996; Sutherland et al. 1992)
Inhalateurs	2 – 13	6 – 38	51 – 56	(Caldwell et al. 2009; Molander et al. 1996; Moyses, Hearn, and Redfern 2015; Schneider et al. 2001)
Cigarettes électroniques				
1 ^{ère} génération	1 – 16	5 – 20	100	(Bullen et al. 2010; Dawkins and Corcoran 2014; Farsalinos, Spyrou, Tsimopoulou, et al. 2015; Hajek et al. 2015, 2017; St.Helen et al. 2016; Vansickel et al. 2010; Walele et al. 2016)
2 ^{ème} génération	7 – 30	2 – 12	92	(Farsalinos, Spyrou, Tsimopoulou, et al. 2015, 2015; Hajek et al. 2017; Lopez et al. 2016; Ramôa et al. 2016; St.Helen et al. 2016; Wagener et al. 2017; Yingst et al. 2019)
3 ^{ème} génération	12 – 17	5 – 6	94	(Hajek et al. 2017; Wagener et al. 2017)
Dispositifs à base de sels de nicotine				
Système JUUL®	5 – 20	4 – 8	ND	(Hajek et al. 2020; O’Connell et al. 2019)

C_{max} : concentration maximale dans la matrice étudiée.

T_{max} : temps nécessaire pour atteindre la C_{max} .

ND : non-déterminé.

ii. Distribution de la nicotine

Dans le système sanguin la nicotine se trouve majoritairement sous forme libre, la liaison aux protéines plasmatiques étant inférieure à 5 %. La nicotine est amplement distribuée dans le corps, la molécule ayant une plus forte affinité pour le foie, le rein, la rate et les poumons et une moindre affinité pour le tissu adipeux (Urakawa et al. 1994). Le volume de distribution de la nicotine (V_d) varie entre 104 et 241 L (Hukkanen et al. 2005; Linakis et al. 2017; Marchand et al. 2017).

La vitesse de passage de la nicotine vers les structures cérébrales et les effets pharmacologiques qui en résultent dépendent de la voie d'administration. Après consommation d'une cigarette traditionnelle, la nicotine passe directement par le sang veineux pulmonaire puis dans le ventricule gauche pour ensuite être distribuée dans le cerveau grâce à la circulation artérielle. En utilisant de la [^{11}C]nicotine, Berridge et ses collègues ont montré que la moitié de la nicotine passant au niveau central est répartie de manière homogène dans le cerveau en moins de 15 secondes, ce qui permet au fumeur d'ajuster sa prise de nicotine pour obtenir l'effet recherché (Berridge et al. 2010). De plus, une étude récente a montré des résultats similaires après une bouffée d'aérosol de e-cigarette : après un puff, 27 secondes ont été suffisantes pour obtenir 50 % de la concentration maximale de nicotine dans le cerveau (Solingapuram Sai et al. 2020). Plus étonnant encore, la cinétique d'accumulation de la nicotine dans le cerveau est deux fois plus lente chez les sujets nicotine-dépendants (résultat au test de Fagerström ≥ 5) par rapport aux sujets non-nicotine-dépendants (résultat au test de Fagerström = 0), sûrement à cause d'un relargage plus lent de la nicotine des poumons vers le sang chez les sujets nicotine-dépendants (Rose et al. 2010).

Pour les autres voies d'administration (orale, transdermique ou nasale), la concentration nicotinique cérébrale augmente de façon plus progressive.

iii. Métabolisme de la nicotine

La nicotine est principalement métabolisée dans le foie, mais un faible métabolisme peut s'effectuer dans la muqueuse nasale, les poumons, les reins et le cerveau (Benowitz, Hukkanen, and Jacob 2009; Bloom, Wang, and Kharasch 2019; Gorrod and Jenner 1975; Teitelbaum et al. 2018, 2018; Vähäkangas and Pelkonen 1993). La cotinine est le principal composé issu du métabolisme de la nicotine (70 – 80 %), suivie de la nicotine-N-1'-oxyde issue de la métabolisation par la flavine mono-oxydase 3 (FMO3) (7,6 %), la forme glucuronidée nicotine-N-glucuronide (4 %) et la forme déméthylée nornicotine (0,7 %) (Byrd et al. 1992).

Le métabolisme de la nicotine en cotinine passe par une première étape d'oxydation effectuée par les isoformes du cytochrome P450, le 2A6 (CYP2A6) principalement, qui transforment la nicotine en l'ion nicotine- $\Delta 1'(5')$ -iminium qui est en équilibre avec la 5'-hydroxynicotine, puis une aldéhyde oxydase cytoplasmique (AOX) transforme l'ion nicotiniminium en son dérivé lactame, la cotinine (Hibberd and Gorrod 1983; Murphy 1973). La cotinine est à son tour métabolisée principalement en trans-3'-hydroxycotinine par le CYP2A6 (33 – 40 %) (Benowitz 2009). Le ratio trans-3'-hydroxycotinine/cotinine (ou « *nicotine metabolite ratio* » ou NMR) est utilisé comme marqueur phénotypique pour l'activité du CYP2A6 dont on connaît des variations génétiques.

Les principales voies métaboliques de la nicotine et de la cotinine sont illustrées dans la Figure 10.

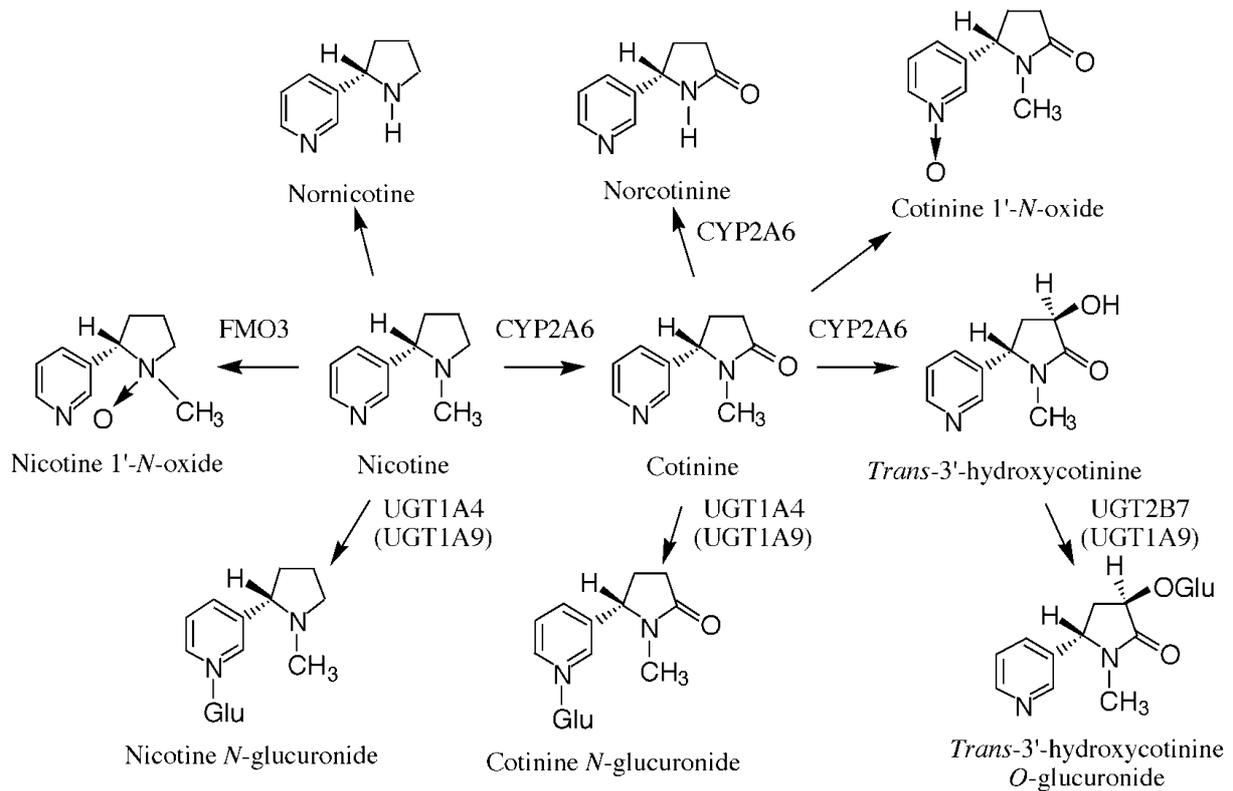


Figure 10 – Principales voies de transformation de la nicotine et de la cotinine chez l’homme avec les enzymes impliquées dans les différentes réactions (Nakajima and Yokoi 2005).

Alors que la demi-vie plasmatique de la nicotine est courte (2 heures), celle de la cotinine est de 16 heures environ, ce qui fait de la cotinine le marqueur plasmatique de choix pour mesurer l’exposition à la nicotine et pour vérifier l’abstinence de consommation nicotinique (Benowitz 2009).

iv. Excrétion

La nicotine est excrétée par le rein par filtration glomérulaire. Un pourcentage de 15 % de la cotinine est excrété sous forme non-modifiée, le pourcentage restant étant métabolisé en trans-3'-hydroxycotinine qui est le métabolite principalement retrouvé dans les urines et sa forme glucuronidée (trans-3'-hydroxycotinine-O-β-D-glucuronide), en cotinine-N-1-β-glucuronide, en cotinine-N-1-oxde et en 5'-hydroxycotinine. La trans-3'-hydroxycotinine est le métabolite urinaire de choix pour vérifier l’abstinence de consommation nicotinique. Les métabolites de la nicotine sont aussi retrouvés dans la salive et les cheveux.

4) Arômes

En 2014, il y avait plus de 7 500 arômes présents dans des e-liquides disponibles sur le marché (Zhu et al. 2014). Ces arômes sont généralement classés en 5 catégories : arômes fruités, arômes sucrés, arômes mentholés, arômes « tabac » et autres (Yingst et al. 2017).

Aux Etats-Unis, les catégories d'arômes pour e-liquides les plus vapotées par les utilisateurs adultes sont les arômes mentholés (37,4 %), les arômes fruités (31,2 %) et les sucrés (16,2 %) (Schneller et al. 2018). En France, les principaux arômes déclarés dans la composition des e-liquides par les fabricants sont les arômes fruités (25 %), l'arôme fruits rouges étant prédominant dans cette catégorie, les arômes sucrés (14 %), suivis de près par les arômes « tabac » (8 %) et les arômes mentholés (5 %) (Figure 11) (site consulté le 07/10/2022, <https://www.anses.fr/en/system/files/CONSO2018SA0189Ra-1.pdf>).

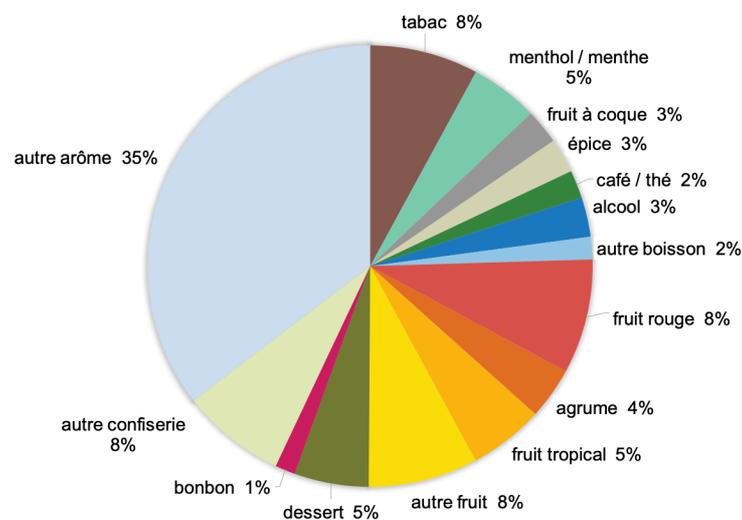


Figure 11 – Répartition de la fréquence des ingrédients déclarés comme arômes par les fabricants en France.
Source : <https://www.anses.fr/en/system/files/CONSO2018SA0189Ra-1.pdf>, site consulté le 07/10/2022.

Selon leur classification chimique, un peu plus d'un tiers des arômes retrouvés dans les e-liquides sont des esters, suivis des terpènes et des cétones qui représentent environ 15 % des molécules (Figure 12) (Omaiye et al. 2019).

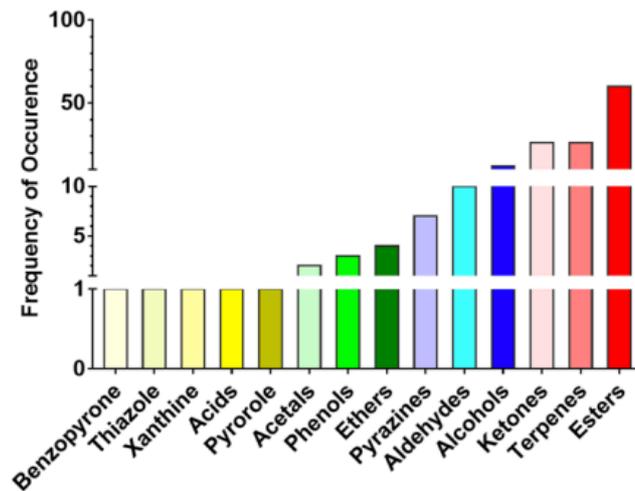


Figure 12 – Classification des arômes, selon leur nature chimique, en fonction de leur fréquence d'apparition dans les liquides pour cigarettes électroniques. *Source : Omaiye et al., 2019*

Les concentrations détectées d'arômes chimiques vont de 0,85 µg/mL à 343 mg/mL. Environ 85 % des e-liquides ont des concentrations totales d'arômes supérieures à 1 mg/mL et environ un tiers de ces dernières sont supérieures à 10 mg/mL (Figure 13) (Omaiye et al. 2019).

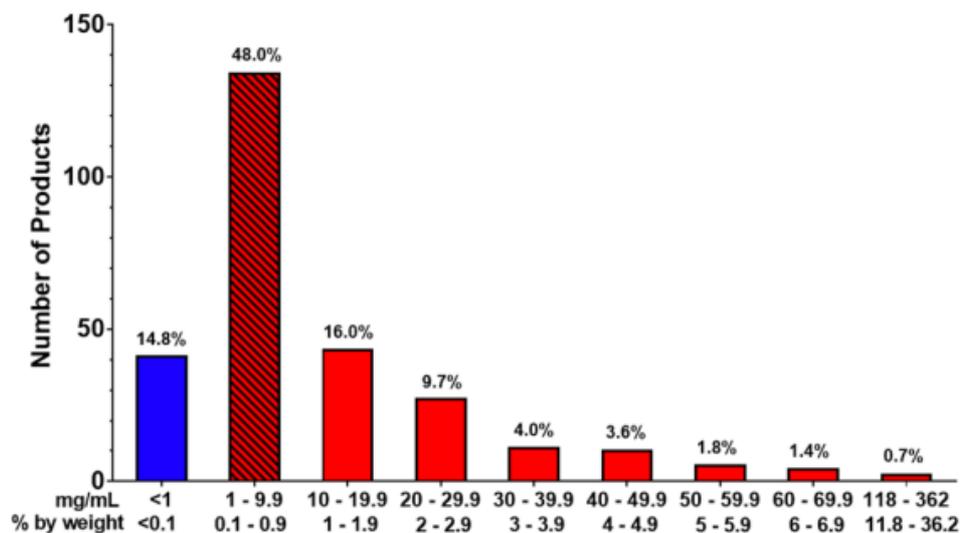


Figure 13 – Concentrations totales d'arômes dans les liquides pour cigarettes électroniques. *Source : Omaiye et al., 2019*

Il existe un risque d'attrait et d'initiation du vapotage chez les adolescents ou d'augmentation de l'utilisation en raison des arômes contenus dans le e-liquides, alors que l'innocuité sur la santé humaine de ces arômes par voie inhalée n'a pas été démontrée. L'organisation responsable de la certification des arômes alimentaires pour la FDA, la *Flavor Extracts Manufacturers Association* (FEMA), a spécifiquement déclaré qu'elle n'évalue pas les arômes pour leur utilisation dans les e-cigarettes ou pour toute exposition autre que l'ingestion (site consulté le

07/10/2022, <https://www.femaflavor.org/node/24344>). De plus, des études qui analysaient les arômes de certains e-liquides ont montré que beaucoup de ces arômes pouvaient générer des aldéhydes lors de leur aérosolisation, avec un potentiel irritant pour les voies aériennes (Farsalinos, Kistler, Gillman, et al. 2015; Gillman et al. 2016). Il en découle l'hypothèse que plus il y a un nombre important d'arômes chimiques et que leur concentration est élevée dans les e-liquides, plus ces derniers seraient toxiques (Hua et al. 2019). *In vitro*, les effets du cinnamaldéhyde (arôme cannelle), de la vanilline (arôme vanille), de l'éthyl-maltol (arôme caramel) et du menthol (arôme menthe) sont les plus étudiés.

a) L'effet des arômes sur le stress oxydant

Dans une étude qui a évalué la production de radicaux libres dans l'aérosol de quarante-neuf e-liquides sans nicotine disponibles dans le commerce, il a été montré que la production de radicaux libres augmente significativement quand la concentration d'éthyl-maltol augmente. De manière plus étonnante, la présence d'éthyl-vanilline a significativement diminué la production de radicaux libres par rapport à un contrôle sans arômes (Bitzer et al. 2018). Des études ont montré que l'éthyl-vanilline et la vanilline possèdent de puissantes propriétés antioxydantes *in vitro* et *in vivo*, ce qui peut expliquer cette inhibition de production de radicaux libres (Tai, Sawano, Yazama, et al. 2011; Tai, Sawano, and Yazama 2011). Cependant, d'autres études montrent que la vanilline et l'éthyl-vanilline réduisent significativement la production d'ATP dans les cellules épithéliales des bronchioles BEAS-2B (Jabba et al. 2020). La diminution des capacités de production d'ATP provoque un stress cellulaire et une possible cytotoxicité. Sur des cellules épithéliales bronchiques humaines, les e-liquides contenant du cinnamaldéhyde perturbent la fonction mitochondriale, inhibent les processus bioénergétiques et réduisent les niveaux d'ATP, induisant ainsi une altération de la motilité ciliaire, ce qui peut augmenter le risque d'infections respiratoires chez les utilisateurs de ces e-liquides (Clapp et al. 2019).

b) L'effet des arômes sur l'inflammation

L'exposition de la lignée des cellules alvéolaires A549 à un e-liquide aromatisé à la cannelle stimule la sécrétion d'IL-8 et de Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) et ce d'autant plus que la concentration de nicotine dans le e-liquide augmente (Bengalli et al. 2017). Un e-liquide « cannelle » est également capable de stimuler de manière significative la sécrétion d'IL-8 par les fibroblastes pulmonaires à des niveaux qui sont comparables à ceux produits par l'exposition à l'extrait de cigarette classique (Lerner et al. 2015). L'IL-8 et le MCP-1 stimulent la migration des neutrophiles et des macrophages à travers l'endothélium et peuvent activer leurs fonctions pro-inflammatoires.

c) L'effet des arômes sur la mort cellulaire

Le cinnamaldéhyde présente un puissant effet cytotoxique, même à faible concentration (0,17 μ M ou 2,2 mg/mL) induisant une perte de croissance et de motilité des cellules souches embryonnaires, mais également en déclenchant des mécanismes apoptotiques et des dommages de l'ADN (Behar et al. 2016). Ainsi, dans une étude, parmi 35 e-liquides testés sur trois types cellulaires différents (cellules souches embryonnaires humaines, cellules souches neurales de souris et fibroblastes pulmonaires humains), le e-liquide « Cannelle de Ceylan » était le seul à produire des effets cytotoxiques importants sur les trois types cellulaires analysés, avec des IC_{50} sur la viabilité cellulaire qui étaient inférieures à des concentrations de 0,1 % (Bahl et al. 2012).

Sur les cellules souches neurales de souris et les cellules épithéliales des bronchioles BEAS-2B, Hua et ses collaborateurs ont découvert que la vanilline, l'éthyl-vanilline et l'éthyl-maltol étaient les molécules les plus toxiques des e-liquides (comparaison des valeurs des IC_{50}) (Hua et al. 2019). Sur la lignée des cellules alvéolaires A549, l'éthyl-maltol et la vanilline ont induit une diminution de la viabilité cellulaire mesurée par le test au MTT (Behar et al. 2018).

Par ailleurs, sur la lignée hépatocytaire HepG2, une étude a montré que la vanilline et l'éthylmaltol diminuaient la viabilité cellulaire. De plus, une exposition répétée a été plus hépatotoxique comparée à une exposition unique, conduisant à l'hypothèse qu'un vapotage chronique pourrait entraîner une hépatotoxicité. Plus intéressant, le cinnamaldéhyde n'a pas produit de toxicité sur les cellules HepG2, une innocuité pouvant s'expliquer par l'absence de récepteurs du cinnamaldéhyde (transient receptor potential ankyrin 1 ou TRPA1) dans la lignée HepG2 (Rickard et al. 2021).

Dans la suite de ce chapitre, nous discuterons plus en détail les effets du menthol.

d) Exemple d'un des arômes le plus étudié : le menthol

Depuis le 20 mai 2020, les cigarettes mentholées ne peuvent plus être commercialisées dans l'UE. Cependant, pour les adeptes du menthol, l'alternative de la e-cigarette est encore possible. Le choix de e-liquides mentholés est pléthorique puisque les produits existants sur le marché déclinent tous les types de fraîcheur allant de la menthe glaciale aux arrangements menthe fruitée.

Les concentrations de menthol trouvées dans les e-liquides commercialisés sont similaires à celles trouvées dans les cigarettes classiques, allant de 3,7 à 14,7 mg/g de produit. De faibles concentrations de menthol ont également été identifiées dans 40 % des e-liquides contenant l'arôme tabac, mais prétendument sans menthol (Lisko et al. 2015).

i. Propriétés physico-chimiques

Le menthol, ou 5-méthyl-2-(1-méthylethyl)cyclohexanol est un monoterpène naturel de la famille des alcools secondaires, extrait de l'huile essentielle des plantes du genre *Mentha* ou produit par synthèse chimique. Le menthol est connu depuis l'antiquité et il représente l'arôme le plus répandu après les arômes vanille et citron.

La molécule présente trois carbones asymétriques et il existe 4 paires d'isomères optiques du menthol. La forme naturelle ayant des propriétés sensorielles et pharmacologiques est le (-)-menthol (ou L-menthol) et le mélange racémique (+/-)-menthol obtenu de manière synthétique présente également des propriétés actives (Figure 14).

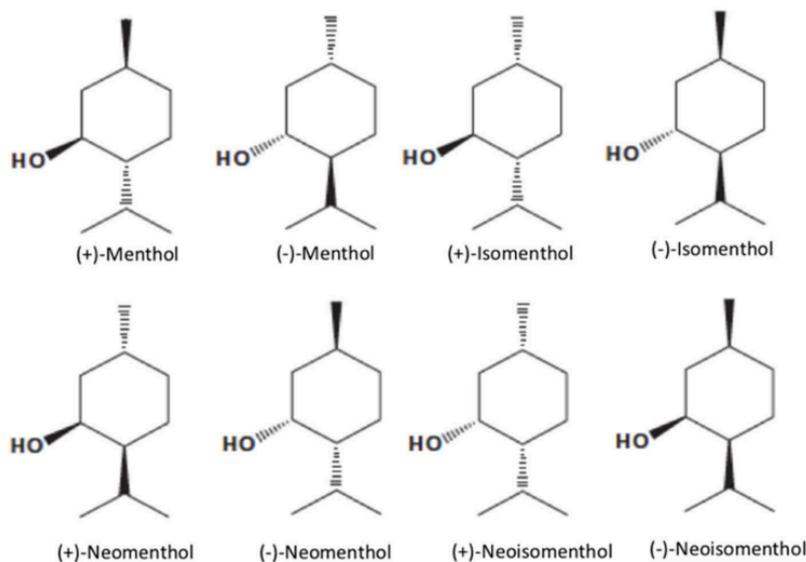


Figure 14 – Structure des isomères du menthol.

Le menthol se présente sous forme de cristaux incolores ou blancs en forme d'aiguille, ayant une odeur caractéristique de menthe et une température de fusion de 41-44°C.

Le menthol est un composé lipophile, son $\text{Log}_{\text{octanol/eau}}$ étant de 3,4 (Turina et al. 2006). Il est soluble dans l'éthanol et le chloroforme, et très faiblement soluble dans l'eau.

Le menthol possède une toxicité relativement faible après ingestion orale, la DL50 chez le rat étant de 1,58 g/kg.

ii. Rôle du menthol dans l'addiction nicotinique

De nombreux effets du menthol ont été décrits dans la littérature. Premièrement, le menthol contenu dans les cigarettes classiques réduit l'intensité des sensations désagréables dans la bouche, la gorge et le nez. En conséquence, les fumeurs perçoivent les cigarettes au menthol comme moins nocives (Ahijevych and Garrett n.d.; Lee and Glantz 2011). De plus, ces mêmes

propriétés sensorielles sont de puissants déclencheurs de l'envie de fumer. Ainsi, le menthol facilite l'inhalation et peut faciliter l'initiation du tabac chez les jeunes (Kreslake, Wayne, and Connolly 2008). Troisièmement, le menthol renforce l'addiction au tabac. Les fumeurs de cigarettes mentholées ne possèdent pas de résultats différents au test de Fagerström pour la dépendance à la nicotine par rapport aux fumeurs de cigarettes non-mentholées. Cependant, des études ont trouvé un temps plus court entre le réveil et la première cigarette chez les fumeurs de cigarettes au menthol, ce qui indique des niveaux plus élevés de dépendance (Hoffman and Simmons 2011). Enfin, le menthol peut également agir centralement sur les récepteurs nicotiques dans l'aire tegmentale ventrale et avoir un impact sur les effets aigus et les propriétés de renforcement central de la nicotine (Hans, Wilhelm, and Swandulla 2012; Wickham 2015).

iii. Propriétés cellulaires et moléculaires du menthol

Les propriétés rafraichissantes du menthol sont dues à l'activation de récepteurs canaux de la superfamille des Transient Receptor Potential (TRP). Les canaux TRP ont des structures tétramériques formées par 6 sous-unités transmembranaires et des pores cations-sélectifs avec une forte perméabilité pour le Ca^{2+} . Ces canaux sont activés par des stimuli physiques tels que l'étirement, la pression osmotique ou la température, ainsi que des stimuli chimiques comme les acides gras et des lipides membranaires (Bradshaw, Raboune, and Hollis 2013).

Le menthol stimule plus spécifiquement les récepteurs TRPM8 (TRP melastatin member 8) à des concentrations allant de 10 μM à 1 mM. L'activation de ces récepteurs stimule l'influx du Ca^{2+} dans la cellule. L'action du menthol sur les cellules présente de fortes similitudes avec celle induite par le froid (McKemy, Neuhausser, and Julius 2002; Peier et al. 2002). Ainsi, pour induire ces effets, le menthol ne semble pas se fixer sur les récepteurs, mais plutôt modifier les caractéristiques physico-chimiques des bicouches lipidiques par ses propriétés lipophiles, ce

qui induit des altérations dans le fonctionnement des récepteurs. Les récepteurs TRPM8 ne sont pas les seules cibles moléculaires du menthol car d'autres effets ont été décrits dans la littérature notamment des effets passant par d'autres familles de récepteurs de type protéine-canal ou encore des canaux voltage-dépendants (Oz et al. 2017).

Dans la littérature, les e-liquides contenant du menthol sont à l'origine d'une augmentation du Ca^{2+} cytoplasmique des cellules épithéliales bronchiques humaines primaires et de la lignée cellulaire de cancer de poumon humain Calu-3 (Rowell et al. 2020). Par ailleurs, le Ca^{2+} cellulaire exerce un rôle important dans l'homéostasie pulmonaire, mais aussi dans la régulation de l'activation des cellules immunitaires et le contrôle de l'initiation et de la persistance de l'inflammation (Immler, Simon, and Sperandio 2018). Sur un modèle d'embryons de poisson zèbre, le e-liquide « Mint » a induit une réponse pro-inflammatoire, entraînant la migration des polynucléaires neutrophiles à partir de la niche vasculaire du tissu hématopoïétique caudal sur une surface tissulaire plus grande que les embryons témoins qui possédaient des polynucléaires neutrophiles regroupés et au stade de repos (Onyenwoke et al. 2022). En plus de l'effet pro-inflammatoire des e-liquides contenant du menthol, Lamb et ses collègues ont constaté que l'exposition des cellules épithéliales bronchiques à des e-cigarettes aromatisées au menthol provoquait un dysfonctionnement mitochondrial, modifiant l'activité de la chaîne de respiration mitochondriale basale et maximale et affectant par conséquent le stress oxydant mitochondrial (Lamb, Muthumalage, and Rahman 2020). La présence de (+/-)-menthol a également été associée à une diminution de la viabilité cellulaire et à une augmentation des dommages à l'ADN, même à de faibles niveaux dans les cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 et les cellules ovariennes de hamster chinois (Al-Saleh et al. 2020). Enfin, l'apparition de processus apoptotiques identifiés par l'augmentation du ratio bax/bcl-2 et de la caspase-3 et de processus autophagiques suivis par l'augmentation du marqueur LC3-II, ont été décrits après exposition

des cellules épithéliales humaines de l'oreille moyenne aux e-liquides mentholés (Go et al. 2020).

5) Additifs

En plus des 4 composants majoritairement retrouvés dans les e-liquides (PG, VG, nicotine et/ou arômes), d'autres composants peuvent être présents comme des colorants, des alcools ou encore de l'eau. Tous ces éléments additifs peuvent être à un moment ou un autre à l'origine d'effets cellulaires qui ne sont que peu étudiés à l'heure actuelle.

IV. Les aérosols de cigarette électronique

Quand un utilisateur tire une bouffée sur une e-cigarette, le e-liquide est chauffé, mis en aérosol, et inhalé. Si les différents composants d'un e-liquide sont bien caractérisés et ont pu être décrits plus haut, la composition de l'aérosol inhalé est beaucoup plus complexe car en fonction du e-liquide et du dispositif utilisés, une pléthore de produits chimiques peut être présente. Pour exemple peuvent être mentionnés des composés liés à la matrice de la résistance, des impuretés liées à la nicotine et à son éventuelle extraction à partir du tabac, des arômes, des métaux ou encore des composés liés à la dégradation thermique du liquide ou du dispositif utilisé. La variabilité et la possibilité de personnalisation de ces dispositifs complexifient l'analyse de l'aérosol émis, et peuvent dissimuler des substances dangereuses qui peuvent être délivrées à l'utilisateur ou à son environnement.

Premièrement, comme décrit dans le chapitre précédent, il a été démontré que le PG et la VG se décomposent à des températures élevées en générant des composés organiques volatils comme le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, le glyoxal ou le méthylglyoxal avec des propriétés toxiques potentielles (Kosmider et al. 2014; Ooi et al. 2019; Son, Weisel, et al. 2020). Leur formation est directement liée à la température du dispositif de e-cigarette pendant la formation de l'aérosol. Certains dispositifs rechargeables à haute puissance paramétrés avec une résistance inférieure à 1 Ω) peuvent produire des niveaux de composés organiques bien supérieurs à ceux des cigarettes classiques (Talih et al. 2017). La présence de benzène et de toluène attire également l'intérêt des scientifiques, même si la concentration de ces polluants cancérigènes dans l'air expiré des vapoteurs s'est avérée inférieure à celle des fumeurs (Marco and Grimalt 2015). Des concentrations nettement plus faibles de pesticides et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques ont également été mesurées dans les aérosols de cigarette électronique par rapport à la fumée de cigarette classique (Beauval et al. 2017; Dusautoir et al. 2021).

Deuxièmement, l'utilisation de nicotine extraite du tabac augmente le risque de présence de nombreux dérivés et impuretés de la nicotine comme l'anabasine, la myosmine ou encore les nitrosamines. Ces dernières sont formées principalement lors de la réaction de nitrosation d'une amine des précurseurs alcaloïdes (nicotine, nornicotine, anabasine et anatabine) pendant les étapes de séchage, fermentation et vieillissement du tabac. Deux membres de cette famille, la N-nitrosornicotine (NNN) et la 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ont été classés comme cancérogènes connus pour l'Homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Des études ont montré la présence de nitrosamines et d'impuretés liées à la nicotine dans les liquides pour cigarette électronique et les aérosols produits à des niveaux faibles et largement inférieurs à ceux contenus dans la fumée de cigarette classique (Goniewicz et al. 2014; Han et al. 2016; Margham et al. 2016).

Troisièmement, l'utilisation d'arômes dans les liquides pour cigarette électronique comme le diacétyl, la 2,3-pentanedione, l'acétoïne (arômes « beurre » ou « crème »), le cinnamaldéhyde (arôme « cannelle »), le benzaldéhyde (arôme « cerise ») a été remise en question, surtout après que le diacétyl associé à la bronchiolite oblitérante ou maladie du « poumon de pop-corn » a été retrouvé dans 39 des 51 des liquides analysés par Allen et ses collaborateurs (Allen et al. 2016). Des équipes de recherche ont également observé que d'autres substances chimiques peuvent être néoformées à partir de ces arômes par réaction avec les véhicules (PG ou VG) à température ambiante ou lors de l'aérosolisation du liquide. Dans des études *in vitro*, les molécules néoformées étaient plus nocives que les arômes initiaux (Erythropel et al. 2019; Jabba et al. 2020; Kerber and Peyton 2022).

Divers métaux lourds comme l'aluminium, le nickel, le cuivre, le chrome, le plomb ou le zinc, probablement émis par la résistance lors de son chauffage ou lors de sa dégradation, ont également été identifiés dans l'aérosol de e-cigarette, principalement lors d'un vapotage intensif (Olmedo et al. n.d.; Rastian, Wilbur, and Curtis 2022; Zhao et al. 2022).

V. Les problématiques posées par la e-cigarette

La cigarette électronique est de plus en plus prisée par les utilisateurs de tabac en tant que nouveau dispositif délivrant de la nicotine. En 2019, une première étude clinique randomisée et contrôlée ayant pour critère principal de jugement l'abstinence tabagique à 52 semaines a montré la supériorité de la cigarette électronique par rapport aux substituts nicotiques classiques présents sur le marché (Hajek et al. 2019). En 2020, une méta-analyse a montré que l'utilisation de la e-cigarette contenant de la nicotine aide les fumeurs à quitter le tabac par rapport aux e-cigarettes sans nicotine et par rapport aux substituts nicotiques (Hartmann-Boyce et al. 2020). Toutefois, en 2021, une autre méta-analyse indiquait qu'il n'y a pas de preuves irréfutables d'une différence d'effet entre les e-cigarettes contenant de la nicotine et les traitements substitutifs nicotiques sur l'incidence de l'arrêt du tabac à 24-26 semaines (Quigley et al. 2021). Tous ces éléments laissent planer une incertitude concernant l'efficacité réelle des e-cigarettes dans le sevrage tabagique (Annexe 1). Par ailleurs, si les premières générations de e-cigarettes délivraient des quantités insuffisantes de nicotine et ne satisfaisaient pas les utilisateurs, l'évolution rapide des systèmes électroniques de délivrance de la nicotine et notamment les e-cigarettes de 3^{ème} génération, a permis l'apparition de dispositifs plus efficaces permettant des apports en nicotine proches de ceux d'une cigarette classique. De plus, en modifiant les paramètres pharmacocinétiques de la nicotine selon le paramétrage de ces systèmes et selon le e-liquide utilisé, le risque de maintenir voire d'induire une addiction à la nicotine n'est plus négligeable. Ainsi, une étude de laboratoire a montré que le ratio des composants PG/VG dans le e-liquide peut moduler la présence de nicotine dans l'aérosol produit. Toutefois, aucune étude clinique de pharmacocinétique n'a évalué l'absorption de nicotine en comparant deux e-liquides qui varient par leur composition en PG et en VG.

A ce jour, il est bien établi que la fumée de tabac engendre des effets graves sur la santé des utilisateurs par des mécanismes qui font intervenir des médiateurs du stress oxydant et de

l'inflammation sur de nombreux organes (poumon, cœur, vaisseaux...). Les e-cigarettes, quant à elles, sont commercialisées comme étant sans danger ou moins dangereuses que le tabac, leurs défenseurs affirment le bénéfice net de ces systèmes dans la réduction du tabagisme et, par conséquent, des maladies liées au tabagisme. Cependant, de plus en plus de travaux mettent en évidence la cytotoxicité des e-cigarettes. Par ailleurs, le marché très dynamique de la « vape » et la grande variabilité dans la composition des e-liquides complexifient les recherches scientifiques sur ce sujet. En effet, les e-liquides contiennent une variété abondante d'arômes (naturels ou obtenus par synthèse) présents dans différents ratios PG/VG, sans ou avec de la nicotine présente à différentes concentrations.

Au regard de tous ces éléments, la question des effets des principaux composants des liquides des e-cigarettes chez l'Homme, *in vivo* et *in vitro*, reste essentielle et totalement ouverte.

VI. Objectifs des travaux de thèse

Pour apporter des éléments de réponse aux problématiques développées dans le paragraphe précédent, mes travaux de thèse ont eu pour principaux objectifs :

- 1) **Chez l'Homme** : dans l'étude clinique VAPexp'AIR, l'objectif était de comparer la pharmacocinétique de la nicotine et la formation d'espèces pro-oxydantes après vapotage de deux e-liquides qui diffèrent par leur ratio PG/VG chez des sujets adultes sains qui maîtrisent l'acte de vapotage.
- 2) **Chez la souris** : l'objectif était de valider un modèle murin sensible à l'exposition chronique à la cigarette classique en développant une inflammation chronique des voies respiratoires, ce modèle devant ensuite être utilisé comme contrôle positif (tabagique) en comparaison à des groupes de souris exposés aux e-cigarettes.
- 3) **In vitro dans un modèle cellulaire de barrière alvéolo-capillaire** : l'objectif était de comparer les effets pulmonaires des principaux composants des e-liquides (véhicules, nicotine) et de cinq e-liquides commercialisés, aromatisés avec et sans nicotine, sur un nouveau modèle cellulaire robuste de barrière alvéolo-capillaire. Un focus a été fait sur les modifications de l'intégrité membranaire, du stress oxydant, de l'inflammation et de la viabilité cellulaire induites par les composants et les 5 e-liquides commercialisés.

1^{ère} partie : Pharmacocinétique de la nicotine et
formation de radicaux libres de l'oxygène chez
l'Homme : étude clinique VAPexp' AIR

I. VAPexp’Air : Objectifs de la recherche

L’objectif principal de cette étude est d’évaluer les profils pharmacocinétiques nicotiques obtenus après vapotage de deux e-liquides qui diffèrent par leur composition en PG/VG chez des sujets adultes sains qui maîtrisent l’acte de vapotage.

Les objectifs secondaires sont de :

- Modéliser, par une étude de population, la pharmacocinétique de la nicotine.
- Identifier les molécules absorbées et/ou modifiées par l’organisme lors du vapotage pour 2 e-liquides dont la composition en excipients change.
- Mesurer la cinétique d’absorption d’autres molécules (s’il en existe) dans le compartiment systémique.
- Mesurer la cinétique de production de radicaux libres de l’oxygène (RLO) dans le compartiment systémique.

Le critère principal de jugement s’appuie sur l’étude pharmacocinétique de la nicotine par la mesure de la nicotine plasmatique après vapotage des deux liquides à différents temps de prélèvement (T₀, T₁₀, T₂₀, T₄₀, T₈₀ minutes après le début du vapotage).

Ici, seront abordés deux de ces objectifs, c’est-à-dire comparer la pharmacocinétique de la nicotine et la formation de RLO après vapotage de deux e-liquides qui diffèrent par leur ratio en PG/VG.

II. Autorisations légales et financement de l’essai clinique

1) Autorisations légales

L’essai clinique VapEexp’Air promu par les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) (PRI 2016 – HUS n°6911) est un essai clinique de catégorie 2 de la Loi Jardé (RIPH2) c’est-à-dire classé comme recherche interventionnelle à risques et contraintes minimales (avis favorable du

Comité de Protection des Personnes du 24/04/2018). L'ensemble des sujets participant à l'étude ont donné au préalable leur consentement libre et éclairé. Les résultats présentés ici concernent les 19 premiers individus inclus dans l'étude.

2) Financement

Cette recherche a fait l'objet d'un financement par la société GAÏATREND SARL (10 Route de Strasbourg, F-57410 Rohrbach-lès-Bitche).

III. Plan expérimental

Cette étude est monocentrique, randomisée en cross-over, en simple-insu et se compose de deux bras d'étude. Le bras A reçoit le e-liquide 1 (EL1) à la première visite et le e-liquide 2 (EL2) à la deuxième, alors que le bras B reçoit le EL2 à la première visite et le EL1 à la deuxième. Le schéma de l'étude est le suivant (Figure 15) :

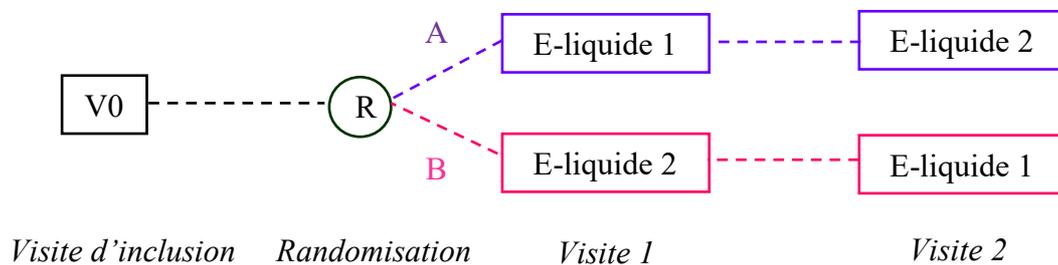


Figure 15 – Schéma expérimental de l'étude VAPexp'AIR.

IV. Population de l'étude

1) Calcul du nombre de sujets nécessaires

Au moment de la construction de l'essai clinique VAPexp'AIR, dans la mesure où très peu d'études pharmacocinétiques des produits de vapotage existaient, il était difficile d'anticiper les valeurs attendues. De ce fait, un nombre de sujets nécessaire a été obtenu de manière très empirique de la façon suivante : en normant l'aire sous la courbe de sorte que l'AUC moyenne

soit de 1 avec un écart-type de 0,1, un échantillon de 50 sujets permettra d'avoir une largeur d'intervalle de confiance de l'AUC sur une mesure de pharmacocinétique qui soit comprise dans un intervalle d'une précision de 0,062 (intervalle de confiance à 95 %) avec une probabilité de l'ordre de 83,4 %. Avec ce même effectif, la précision de l'intervalle est de 0,064 dans environ 90 % des intervalles. Nous considérons donc que cet effectif est suffisant dans le contexte présent.

2) Recrutement et critères d'inclusion/non-inclusion

Le recrutement des sujets s'effectue via une affiche postée sur le site intranet des HUS, sur les plateformes de communication avec les étudiants en études de santé (facultés de médecine et de pharmacie, école d'orthophonie et instituts de formation des soins infirmiers), ainsi que par transmission de l'information de personne à personne. Des sujets sains, âgés de 18 à 35 ans (femmes et hommes) maîtrisant l'acte de vapotage, utilisant habituellement un e-liquide dont la concentration en nicotine est supérieure à 6 mg/mL, étant des vapoteurs exclusifs ou utilisateurs de cigarettes classique et électronique (« *dual users* ») peuvent être inclus. Les sujets recrutés doivent être aptes à comprendre les objectifs et les risques liés à la recherche et à donner leur consentement pour participer à l'étude. Ils ne doivent souffrir d'aucune pathologie chronique, ni avoir de dépendance à l'alcool ou à des stupéfiants. L'ensemble des critères d'inclusion et de non-inclusion sont listés dans l'Annexe 2.

V. Déroulement de l'essai clinique

1) Visite de pré-sélection

La pré-sélection des sujets est réalisée par contact téléphonique par l'équipe du centre d'investigation clinique (CIC) du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg (NHC). Ce contact téléphonique a pour objectif de présenter l'essai, de juger de la motivation des sujets à participer

et à se conformer au calendrier de l'étude, d'informer les sujets des critères d'exclusion et de leur envoyer la notice d'information concernant l'étude.

Ce contact téléphonique est effectué entre 1 semaine et 1 mois avant la visite d'inclusion. Pour les sujets potentiellement éligibles, un premier délai de réflexion leur est ainsi laissé.

2) Visite d'inclusion V0

La visite d'inclusion V0 est réalisée au CIC avant tout examen lié à la recherche. L'investigateur recueille le consentement libre, éclairé et écrit du volontaire. La date à laquelle le sujet a accepté de participer à la recherche est notée dans le dossier médical. Le cas échéant, la date éventuelle d'opposition à sa participation y est également notée.

Les examens/actes suivants sont réalisés, afin de confirmer l'éligibilité du sujet et la poursuite de sa participation à l'étude :

- Recueil des antécédents médicaux et chirurgicaux.
- Examen physique : poids, taille, signes vitaux (fréquence cardiaque, pression artérielle, fréquence respiratoire, saturation en oxygène), examen médical.
- Prélèvement sanguin pour l'analyse des paramètres de sécurité : urée, glycémie, créatinine, ionogramme, ASAT, ALAT, bilirubine totale, GGT, NFS, CRP, β -HCG chez la femme.
- Bilan spirométrique : le sujet est assis au repos au moins 5 minutes avant la réalisation de l'examen. Les valeurs mesurées sont le volume courant, la fréquence respiratoire et la ventilation minute. Un bilan spirométrique anormal fait l'objet d'une non-inclusion du sujet.

Les résultats de cette visite médicale et les résultats des paramètres biologiques mesurés permettent de confirmer l'éligibilité des volontaires. Si tel est le cas, un rendez-vous leur est fixé par téléphone pour la poursuite du protocole.

3) Randomisation

La randomisation s'effectue après la visite d'inclusion et la vérification que tous les critères d'éligibilité sont conformes. La randomisation est effectuée via l'eCRF CleanWeb par le technicien de recherche clinique du CIC. Pour cette étude en cross-over, l'ordre d'attribution des 2 produits est ainsi fonction de la randomisation.

4) Déroulement de la visite de suivi V1

Cette visite est réalisée dans le Service des Épreuves Fonctionnelles Respiratoires (EFR) du NHC. Les volontaires doivent être à jeun (hors eau) depuis au moins 1 heure avant l'heure de rendez-vous. La consommation de tabac et/ou de e-cigarette, d'alcool, de bonbons ou sprays aromatisés est proscrite 1 heure avant l'expérimentation. La pratique d'un sport intensif la veille et le jour de l'expérimentation est interdite.

Le jour de l'évaluation, le volontaire est accueilli dans le service. A son arrivée, le déroulement de l'expérimentation lui est présenté (Annexe 3), ainsi que le système de prélèvement de l'air expiré. Les signes vitaux (fréquence cardiaque, pression artérielle, fréquence respiratoire, saturation en oxygène) sont vérifiés. Avant tout vapotage, les analyses en conditions de base sont réalisées : prélèvement d'air ambiant de la pièce, analyse de la capacité respiratoire du sujet par spirométrie (volume courant, fréquence respiratoire et ventilation minute), prélèvement d'air expiré du sujet.

Un cathéter veineux périphérique est inséré dans une veine de l'avant-bras pour les prélèvements sanguins de pharmacocinétique et d'étude du stress oxydant.

Un premier prélèvement sanguin est réalisé avant l'étape de vapotage (T_0).

Le vapotage se fait selon une méthodologie standardisée grâce à une vidéo incluant un chronomètre et des alarmes de rappel pour les différentes étapes. Une inhalation de 3 secondes suivie d'une pause de 30 secondes sont répétées 20 fois. L'angle entre la e-cigarette et le sujet est d'environ 45° pendant le vapotage et lors des 30 secondes d'interruption le système de vapotage est maintenu verticalement de manière que le e-liquide soit constamment en contact avec la résistance. L'étape de vapotage dure 11 minutes au total.

D'autres prélèvements sanguins sont effectués à 10 minutes (T_{10}), 20 minutes (T_{20}), 40 minutes (T_{40}) et à 80 minutes (T_{80}) après le début du vapotage. Deux prélèvements d'air expiré sont réalisés à 5 minutes et 1 heure après la fin du vapotage.

Le sujet complète un questionnaire détaillé sur les habitudes alimentaires et de vie et sur sa consommation nicotinique (Annexe 4). De plus, le test de Fagerström en 6 questions en lien avec l'addiction nicotinique est à compléter par le sujet (Annexe 5).

Avant la fin de la visite, l'air ambiant de la pièce est à nouveau prélevé et l'analyse de la capacité respiratoire du sujet par spirométrie est effectuée (volume courant, fréquence respiratoire et ventilation minute). Pour finir, un prélèvement urinaire est effectué pour la recherche de métabolites de la nicotine.

L'évaluation de la tolérance et de la survenue d'effets indésirables en lien avec l'expérimentation (nausées, vomissements, sueurs, vertiges, somnolence, hallucinations, bouche sèche, malaise) est réalisée tout le long de la visite.

Une période de wash-out de minimum 2 jours doit être respectée entre les deux visites de l'étude.

5) Déroulement de la visite de suivi V2 et fin de l'étude

Le déroulement de la visite V2 reproduit celui de la première visite, à l'exception du fait que le e-liquide vapoté change en fonction du groupe de randomisation du sujet et que le questionnaire à compléter est construit de manière à identifier les changements survenus depuis la visite V1 (Annexe 6).

Un document de fin d'étude est complété et le sujet est indemnisé pour sa participation à l'étude par la Direction de la Recherche Clinique et des Innovations (DRCI) des HUS.

Le schéma suivant résume le déroulement des visites V1 et V2 (Figure 16).

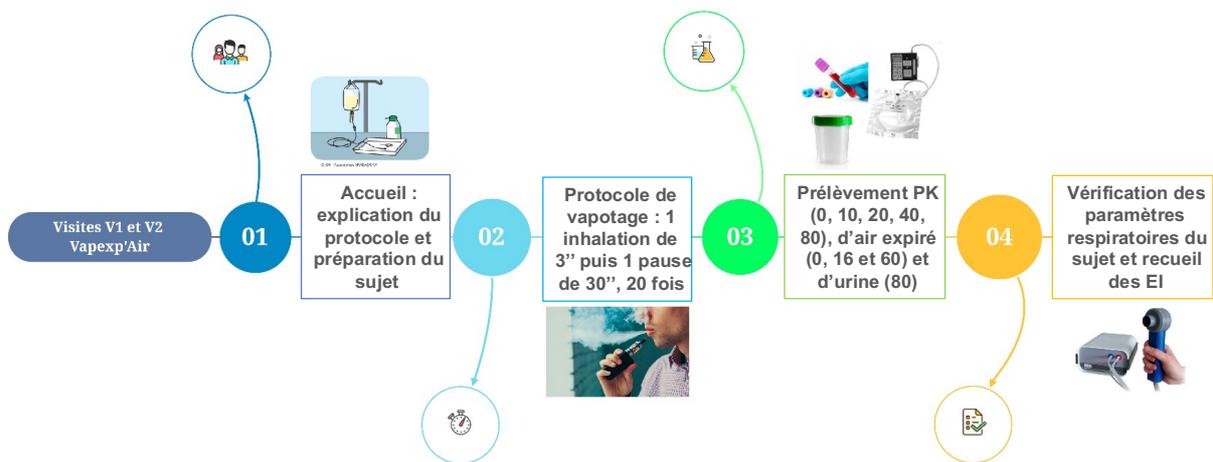


Figure 16 – Figure résumant le déroulement des visites de suivi V1 et V2 de l'étude VAPexp'AIR.

VI. Les systèmes de délivrance de la nicotine utilisés lors de l'étude

1) Dispositif de délivrance de la nicotine

Le générateur d'aérosol utilisé est composé d'une batterie de capacité de 1050 mAh de type iStick mini™ (20W) (Eleaf, Chine) et d'un clearomiseur GS Air-M™ (Eleaf, Chine). Il a été fourni par la société Gaiatrend SARL (Rohrbach-lès-Bitche, France). L'écran LED situé sur le haut de la batterie permet de vérifier le niveau de chargement de la batterie, la valeur de la

résistance (de 1,00 à 5,00 Ω), de la puissance (8,0 à 20,0 W) et du voltage (3,0 à 5,5 V). Pour l'ensemble des sujets, les paramètres de puissance et de voltage ont été sélectionnés par défaut à 8,5 W et à 3,3 V, respectivement. Le clearomiseur est changé à chaque nouvelle visite.

2) E-liquides

Il s'agit de 2 liquides aromatisés à l'arôme « tabac blond » pour cigarette électronique contenant chacun 6 mg/mL de nicotine. Ces 2 produits sont commercialisés sous le nom de « Alfaliquid – 6 mg/mL, PG/VG 50/50 ou 76/24 » et sont fournis par la société Gaiatrend SARL (Rohrbach-lès-Bitche, France) conditionnés dans des flacons de 10 mL. La densité du e-liquide 1 est de 1,14, alors que la densité du liquide 2 est de 1,08.

La composition des e-liquides 1 et 2 est détaillée dans le tableau suivant, selon les données du fournisseur (Tableau II) :

Tableau II – Composition des e-liquides 1 et 2 selon les données du fournisseur.

Nom des composants	E-liquide 1	E-liquide 2
Glycérine végétale	50,0 %	24,0 %
Propylène glycol	40,2 %	[60,0-71,2] %
Éthanol	non-applicable	2,0 %
Arômes	9,3 %	[2,3-13,5] %
Nicotine	0,5 %	0,5 %

Lors de chaque visite, la masse de e-liquide consommée est mesurée par la pesée du dispositif juste avant et juste après la visite. La masse de nicotine vaporisée est calculée en prenant en compte la concentration en nicotine, la masse volumique du e-liquide et la masse de e-liquide consommée :

$$\text{Masse}_{\text{nicotine vaporisée}} (\text{mg}) = \text{concentration}_{\text{nicotine}} (\text{mg/mL}) \times \frac{\Delta \text{masse}_{\text{e-liquide}} (\text{mg})}{\text{Masse volumique}_{\text{e-liquide}} (\text{mg/mL})}$$

VII. Méthodes analytiques

1) Dosage de la nicotine et de la cotinine par LC-MS²

Le sang est prélevé sur tube hépariné et à la fin de chaque visite les prélèvements sont acheminés au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire (LBBM), puis centrifugés, décantés et congelés à -20°C jusqu'à analyse.

La quantification de la nicotine et de la cotinine, son principal métabolite dans le plasma, est effectuée par une méthode de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS) au LBBM. Pour décrire succinctement la méthode, à 100 µL d'échantillons (patient, gamme d'étalonnage, contrôles internes) sont ajoutés 20 µL d'une solution de standards internes à 1 µg/mL. Les standards internes utilisés sont deutérés (nicotine-D4 et cotinine-D3). Une première étape de déprotéinisation est réalisée grâce à un mélange de NaOH 10 N et de sulfate de zinc 5 %, puis une seconde étape d'extraction liquide-liquide est opérée avec du dichlorométhane pur. Après centrifugation, un volume de 700 µL de la phase organique inférieure est récupéré et 5 µL de HCl pur (37 %) y sont ajoutés pour éviter l'évaporation de la nicotine lors de l'étape d'évaporation sous flux d'azote. L'extrait sec est récupéré avec 100 µL de phase mobile composée d'un mélange de méthanol absolu/formiate d'ammonium 10 mM (70:30, V/V, pH = 6,2). Après transfert du mélange dans les flacons adaptés à la LC-MS (Sciex, France), 30 µL sont injectés dans le système analytique. La colonne de chromatographie utilisée est une colonne Kinetex[®] C18 50 x 2,1 mm. La transition m/z 163,0 → 130,0 a été choisie pour la quantification de la nicotine, alors que celle de la cotinine a été 176,9 → 98,2 (Tableau III). La limite de quantification de cette méthode est de 2 ng/mL, alors que la limite supérieure de linéarité est de 100 ng/mL. Afin d'assurer des résultats dans l'intervalle de linéarité de cette méthode, les échantillons plasmatiques sont d'emblée analysés purs et dilués au 1/5^{ème}.

Tableau III – Transitions et paramètres analytiques de la LC/MS² (triple quadripôle Sciex 5500®).

	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Time (msec)	ID	DP (volts)	CE (volts)
1	163.030	117.000	45.0	Nicotine-1	86.000	36.000
2	167.713	121.000	45.0	Nicotine D4	70.000	37.660
3	148.900	117.000	50.0	Nornicotine	70.000	33.840
4	176.931	80.100	45.0	Cotinine-1	95.000	32.000
5	176.931	98.200	45.0	Cotinine-2	90.000	28.210
6	180.300	80.000	45.0	Cotinine D3-1	110.000	39.060
7	180.300	101.100	45.0	Cotinine D3-2	100.000	30.780
8	163.030	130.000	45.0	Nicotine-2	86.000	47.000
9						

2) Mesure de la production du stress oxydant

Le sang est prélevé dans un tube hépariné en même temps que les prélèvements de pharmacocinétique (avant le début du vapotage, à 10, 20, 40 et 80 minutes après le début du vapotage). Les échantillons sanguins sont conservés dans de la glace durant le transport et l'analyse est faite dans l'heure qui suit le prélèvement dans le Laboratoire UR 3072 Mitochondrie, stress oxydant et protection musculaire au Centre de Recherche en Biologie de Strasbourg (CRBS).

La détection des RLO se fait grâce à l'identification des rayonnements électromagnétiques des électrons non appariés lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique par Résonance Paramagnétique Électronique (RPE). Le protocole a été adapté d'après le protocole de Mrakic-Sposta et ses collaborateurs et se déroule comme décrit ci-dessous (Mrakic-Sposta et al. 2012).

Un volume de 25 μL de sang est ajouté à 25 μL d'une solution de 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tetraméthylpyrrolidine (CMH) à 400 μM . Immédiatement après, 40 μL de la solution obtenue sont introduits dans un capillaire. Le capillaire est fermé avec de la pâte à scellement et placé dans un porte-capillaire qui est lui-même positionné à l'intérieur du spectromètre e-Scan (Brucker, Allemagne) qui permet l'acquisition des données. La température des échantillons est stabilisée à 37°C grâce à l'appareil Temperature & Gas Controller BIO III (Noxygen, Allemagne).

La durée d'acquisition des données est de l'ordre de 8 à 10 minutes. Le signal RPE est proportionnel au nombre d'électrons non appariés et donc aux RLO produits, et il est exprimé en $\mu\text{mol}/\text{min}$.

VIII. Analyse des données

1) Analyse pharmacocinétique

L'analyse pharmacocinétique des résultats a été effectuée par une méthode non-compartimentale pour déterminer l'aire sous la courbe (AUC), la C_{max} et le temps nécessaire pour atteindre cette concentration maximale (T_{max}) (GraphPad Prism[®], version 9.4.1).

Les concentrations plasmatiques en fonction du temps ont été évaluées par une approche non-compartimentale. Les C_{max} ont été obtenues par l'analyse graphique. L'aire sous la courbe entre le premier et le dernier temps de prélèvement ($\text{AUC}_{0-80\text{min}}$) a été déterminée par la méthode des trapèzes à l'aide du logiciel GraphPad Prism[®]. L'extrapolation de l'AUC à l'infini (AUC_{inf}) a été calculée comme la somme de $\text{AUC}_{0-80\text{min}} + C_{80\text{min}}/\lambda_z$ où $C_{80\text{min}}$ correspond à la dernière concentration plasmatique quantifiée après la fin du vapotage et λ_z est la constante d'élimination apparente. Cette dernière a été calculée à partir de la régression linéaire du logarithme népérien des concentrations sur la partie terminale de la courbe en fonction du temps. Si le pourcentage d'extrapolation est supérieur à 20 % par rapport à l' AUC_{inf} , cette dernière est beaucoup trop variable et cela indique qu'un nombre de prélèvements plus important serait nécessaire sur la partie terminale de l'élimination pour une estimation plus précise de la constante de vitesse d'élimination et de l' AUC_{inf} observées.

2) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été conduites grâce au logiciel GraphPad Prism[®]. Les moyennes entre deux groupes ont été comparées grâce à un test de Student avec $\alpha = 0,05 \%$. Les

différences entre les groupes (quand plus de deux groupes) ont été analysées à l'aide de tests ANOVA à 1 ou 2 facteurs suivis d'un test de comparaison multiple. Une valeur p inférieure à 0,05 était requise pour considérer la significativité statistique. Les données sont rapportées sous forme de moyenne \pm écart-type, sauf indication contraire.

IX. Résultats

1) Caractéristiques de la population de l'étude

a) Données démographiques et habitudes de vie

Entre le 11/01/2019 et le 28/02/2020, 19 sujets ont été inclus dans l'étude et 17 sujets ont été randomisés. Les 2 patients non-inclus présentaient des spirométries s'écartant des valeurs de référence à la visite d'inclusion. L'ensemble des sujets randomisés présentait des paramètres respiratoires normaux et aucun syndrome obstructif des voies aériennes n'a été mis en évidence (indice de Tiffeneau > 70 %). Le sex-ratio (H/F) a été de 1,8 avec 6 femmes (35,3 %). L'âge moyen de la population a été de $27,8 \pm 4,3$ ans (20,8-34,8) et l'IMC moyen de $22,5 \pm 3,7$ kg/m² (17,4-29,2). Un pourcentage de 52,9 % avait une activité sportive régulière et 64,7 % un rythme de sommeil régulier. La totalité des sujets randomisés avait initié leur consommation nicotinique avec la cigarette traditionnelle. Une différence statistiquement significative pour le poids et le nombre moyen d'heures de sommeil par nuit a été trouvée entre le bras A et le bras B. Les données démographiques des patients randomisés, les paramètres respiratoires à la visite d'inclusion, ainsi que leurs habitudes de vie sont résumés dans le Tableau IV.

Tableau IV - Données démographiques, fonction respiratoire et habitudes de vie des patients randomisés.

Variables				<i>p</i> - value*
	Total	Bras A (N = 9)	Bras B (N = 8)	
Démographie				
Sexe, % (n)				
Féminin	35,3 (6)	44,4 (4)	25,0 (2)	
Masculin	64,7 (11)	55,6 (5)	75,0 (6)	
Age, moyenne ± écart-type (ans)	27,8 ± 4,3	29,1 ± 4,7	26,3 ± 3,3	0,1846
Poids, moyenne ± écart-type (kg)	68,9 ± 14,9	62,2 ± 8,1	76,4 ± 17,6	0,0455
Taille, moyenne ± écart-type (cm)	174,4 ± 9,7	170,8 ± 8,2	178,4 ± 10,1	0,1068
IMC, moyenne ± écart-type (kg/m ²)	22,5 ± 3,7	21,4 ± 3,4	23,8 ± 3,9	0,1958
Paramètres respiratoires à l'inclusion, moyenne ± écart-type				
Volume courant (L)	1,0 ± 0,4	0,9 ± 0,4	1,1 ± 0,2	0,2900
Fréquence respiratoire (/min)	14,1 ± 3,7	14,1 ± 3,4	14,1 ± 4,4	0,9972
Ventilation minute (L/min)	13,6 ± 4,0	12,2 ± 3,9	15,2 ± 3,8	0,1360
Rapport de Tiffeneau (%)	82,6 ± 5,2	83,0 ± 6,4	82,3 ± 3,8	0,7855
Habitudes de vie, % (n)				
Activité sportive régulière, % (n)	52,9 (9)	55,6 (5)	50,0 (4)	
Régime alimentaire, % (n)				
Omnivore	88,2 (15)	78,8 (7)	100 (8)	
Végétarien	11,8 (2)	22,2 (2)	0 (0)	
Sommeil				
Rythme régulier, % (n)	64,7 (11)	66,7 (6)	62,5 (5)	
Heures par nuit, moyenne ± écart-type (nombre)	7,2 ± 0,8	7,7 ± 0,7	6,6 ± 0,5	0,0038
Tabagisme, % (n)				
« Dual users »	70,6 (12)	56,6 (5)	87,5 (7)	
Antécédent de tabagisme	100 % (17)	100 % (9)	100 % (8)	

* Les moyennes des variables démographiques continues ont été comparées grâce à un test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$ %.

b) Consommation nicotinique

i. Habitudes de consommation et dépendance nicotinique

Un pourcentage de 29,4 % (N = 5) de la population randomisée était des vapoteurs exclusifs, le pourcentage restant représentant les utilisateurs de cigarette électronique et de cigarette classique (« *dual users* »). La moitié des sujets consommait habituellement des e-liquides avec une concentration de nicotine comprise entre 6 et 10 mg/mL, alors que seulement un quart consommait des e-liquides avec plus de 10 mg/mL de nicotine. Concernant la dépendance à la nicotine mesurée à l'aide du questionnaire de Fagerström en 6 questions, un tiers des sujets avait une dépendance moyenne (29,4 %, N = 5), un tiers des sujets avait une dépendance faible (35,3 %, N = 6) et le tiers restant ne présentait pas de dépendance (35,3 %, N = 6). Aucun patient n'était fortement ou très fortement dépendant à la nicotine. La masse de nicotine estimée comme étant inhalée est de $1,20 \pm 0,44$ mg pour l'ensemble de la population étudiée. Le tableau suivant résume les données relatives à la consommation nicotinique habituelle et à la dépendance nicotinique des sujets, ainsi que la consommation nicotinique à partir de chaque e-liquide pendant les visites de l'essai clinique (Tableau V).

Tableau V – Résumé des données relatives à la consommation nicotinique habituelle, les antécédents de sevrage nicotinique et la prise de nicotine à partir des e-liquides 1 et 2 (EL1 et EL2) lors du protocole de vapotage aux visites 1 et 2 de l'essai clinique VAPexp'AIR.

Variables		<i>p</i> -value*	
		<i>Bras A</i> (N = 9) V1 : EL1 V2 : EL2	<i>Bras B</i> (N = 8) V1 : EL2 V2 : EL1
Type de consommation nicotinique, % (n)			
Vapotage exclusif	29,4 (5)	44,4 (4)	12,5 (1)
Cigarette classique et électronique (« <i>dual users</i> »)	70,6 (12)	55,6 (5)	87,5 (7)
Fumeurs quotidiens, % (n)	29,4 (5)	0 (0)	62,5 (5)
Fumeurs irréguliers, % (n)	41,2 (7)	55,6 (5)	25,0 (2)

Autres (cigare, tabac à chiquer...)	5,9 (1)	0 (0)	12,5 (1)	
Age du début de consommation tabagique, moyenne \pm écart-type (ans)	18,3 \pm 3,9	19,2 \pm 5,3	17,6 \pm 2,9	0,5059
Concentration habituelle de nicotine dans le liquide de cigarette électronique, % (n)				
< 6 mg/mL	29,4 (5)	44,4 (4)	12,5 (1)	
\geq 6 et \leq 10 mg/mL	47,1 (8)	33,3 (3)	62,5 (5)	
> 10 mg/mL	23,5 (4)	22,2 (2)	25,0 (2)	
Cigarettes fumées par les fumeurs quotidiens, moyenne \pm écart-type (nombre)	5,6 \pm 2,7	0 \pm 0	5,6 \pm 2,7	NA
Cigarettes fumées par semaine par les fumeurs irréguliers, moyenne \pm écart-type (nombre)	3,6 \pm 4,1	3,6 \pm 4,7	3,5 \pm 3,5	0,9799
Nombre total d'utilisateurs réguliers de tabac au sein du foyer, moyenne \pm écart-type (nombre)	1,0 \pm 1,1	1,1 \pm 1,3	0,9 \pm 0,8	0,6616
Score de Fagerström sur l'addiction nicotinique, % (n)				
Pas de dépendance : score de 0 à 2	35,3 (6)	33,3 (3)	37,5 (3)	
Dépendance faible : score de 3 à 4	35,3 (6)	33,3 (3)	37,5 (3)	
Dépendance moyenne : score de 5 à 6	29,4 (5)	33,3 (3)	25,0 (2)	
Dépendance forte ou très forte : score de 7 à 10	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Tentatives de sevrage tabagique dans les deux précédentes années, moyenne \pm écart-type (nombre)	1,2 \pm 1,3	1,3 \pm 1,7	1,1 \pm 0,8	0,7616
Quantité estimée de nicotine inhalée lors du protocole de l'essai, moyenne \pm écart-type (mg)				
Visite 1	1,097 \pm 0,404	0,876 \pm 0,238	1,345 \pm 0,419	0,0115
Visite 2	1,311 \pm 0,457	1,276 \pm 0,449	1,352 \pm 0,491	0,7423

* Les moyennes des variables démographiques continues ont été comparées grâce à un test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$ %. NA : non-applicable en raison d'absence de fumeurs quotidiens dans le bras A.

ii. Impact des covariables suivies sur la masse de nicotine inhalée

- *Impact des paramètres démographiques sur la prise de nicotine*

Aucune différence n'a été mise en évidence sur la prise de nicotine entre les hommes et les femmes ($p = 0,0616$), ni aucune corrélation significative entre la prise de nicotine et le poids ($R^2 = 0,3296$) ou l'IMC ($R^2 = 0,2470$) (Figure 17).

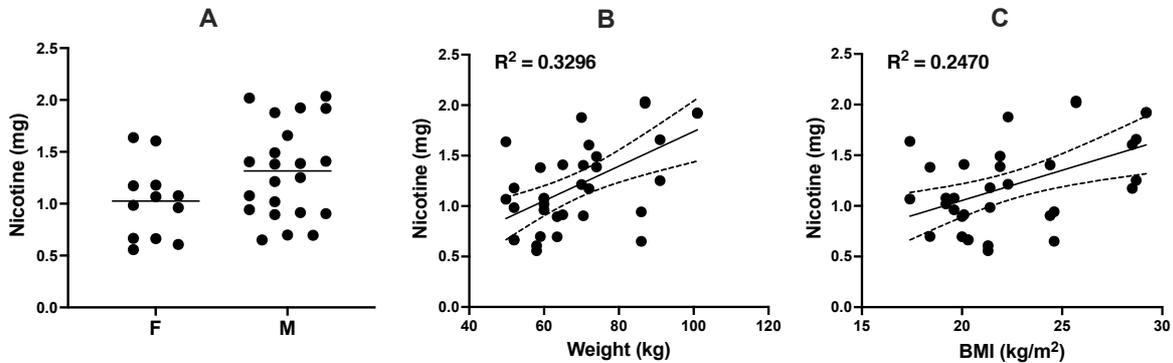


Figure 17 – Influence des facteurs démographiques (A) sexe, (B) poids et (C) IMC sur la prise de nicotine. Aucune différence n'a été mise en évidence pour ces trois paramètres. Analyses statistiques : (A) comparaison des moyennes par un test de Student avec $\alpha = 0,05$, (B) et (C) régression linéaire simple et intervalle de confiance à 95%.

- *Les habitudes de consommation nicotinique*

Malgré une tendance à l'augmentation de la masse de nicotine consommée lors de l'étude chez les vapoteurs exclusifs, aucun effet significatif n'a été mis en évidence ($p = 0,1349$) (Figure 18(A)). De même, aucune différence n'a été démontrée sur la prise de nicotine en fonction de la concentration en nicotine habituelle dans le e-liquide habituellement consommé par les individus participant à l'étude (Figure 18(B)). En revanche, il a été mis en évidence que les sujets n'ayant pas de dépendance à la nicotine (score de Fagerström entre 0 et 2) avait une prise de nicotine statistiquement plus réduite que les sujets faiblement dépendants (score de Fagerström de 3 ou 4) ($p = 0,0221$), cependant aucune différence statistiquement significative n'a été avec le groupe des individus moyennement dépendants ($p = 0,4005$) (Figure 18(C)).

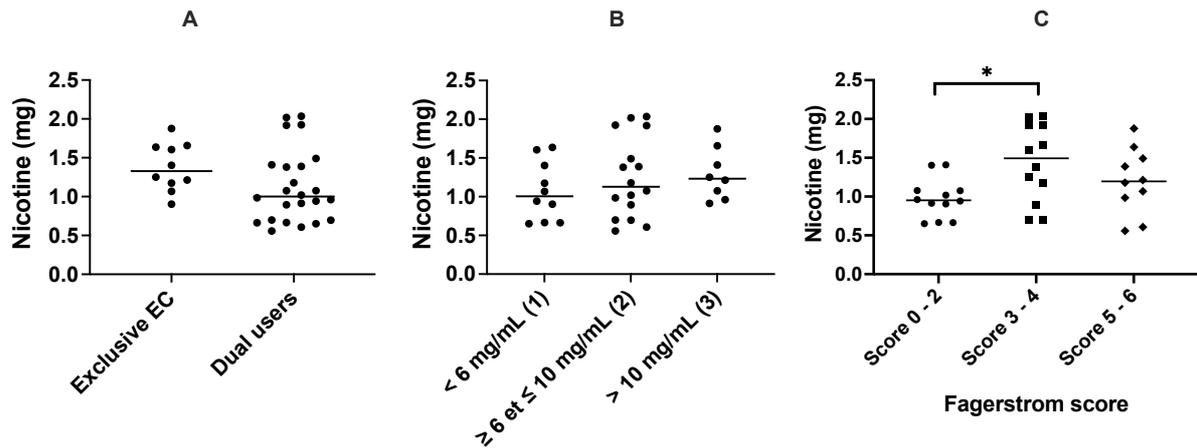


Figure 18 – Graphiques illustrant l’analyse des covariables de consommation nicotinique comme (A) la consommation exclusive de e-cigarette ou la consommation concomitante de tabac et de e-cigarette, (B) la concentration de nicotine habituelle dans le e-liquide et (C) la dépendance à la nicotine selon le questionnaire de Fagerström en 6 questions. Analyses statistiques : (A) comparaison des moyennes avec un test de Student, (B) et (C) les comparaisons entre les différents groupes ont été réalisées à l’aide d’un test ANOVA à 1 facteur ($\alpha = 0,05$) suivi d’un test de comparaison multiple de Dunnett. * : $p = 0,0221$.

- *Impact de la composition du e-liquide inhalé lors de la visite*

Les sujets volontaires sains participant à l’étude ont consommé plus de nicotine lors du vapotage du e-liquide 2 (ratio PG/VG = 76/24, masse de nicotine = $1,31 \pm 0,42$ mg) en comparaison du e-liquide 1 (ratio PG/VG = 50/50, masse de nicotine = $1,10 \pm 0,44$ mg). Cette différence a été statistiquement significative ($p = 0,0137$) (Figure 19).

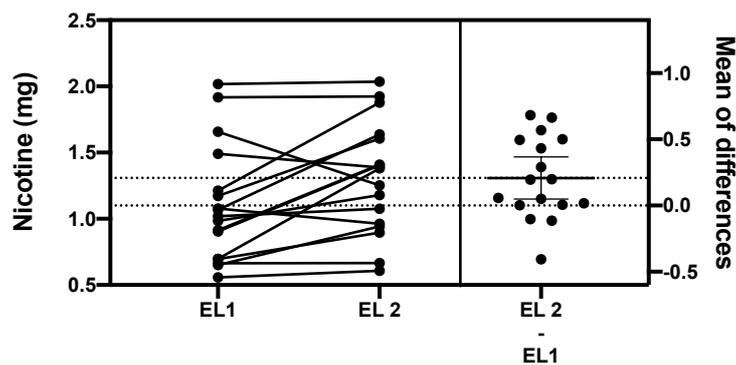


Figure 19 – Masse de nicotine inhalée estimée à partir de la masse de e-liquide consommée (cadre de gauche) et la moyenne des différences entre le e-liquide 2 et le e-liquide 1 (cadre de droite). La différence de masse de nicotine entre les deux e-liquides a été statistiquement significative, $p = 0,0137$. Analyse statistique paramétrique pour des échantillons appariés (test de Student, $\alpha = 0,05$).

L’étude d’impact de chaque covariable sur la prise de nicotine en fonction du groupe de e-liquide (EL1 et EL2) n’a pas mis en évidence une (ou des) covariable(s) ayant un effet statistiquement significatif (Figure 20).

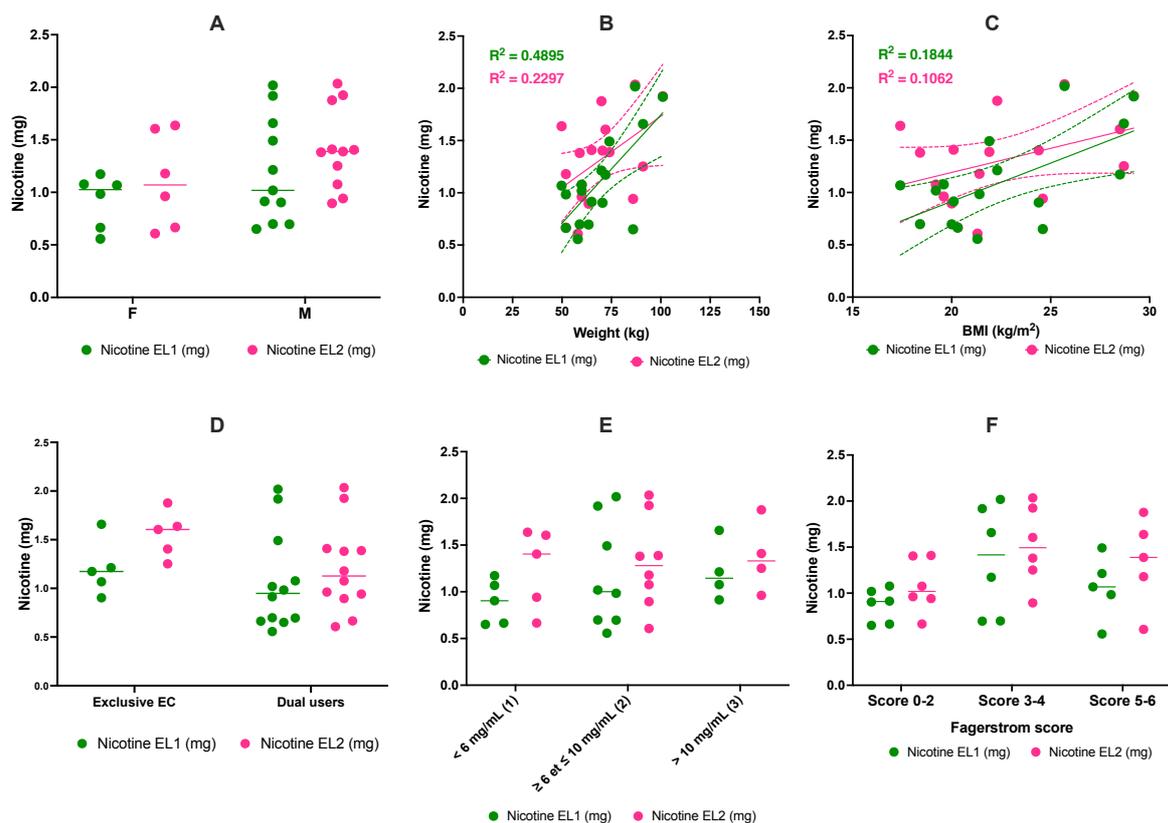


Figure 20 – Graphiques illustrant l’analyse des effets des covariables : démographiques (A) sexe, (B) poids et (C) IMC, (D) des habitudes de consommation nicotinique du sujet, (E) de la concentration de nicotine habituelle dans le e-liquide et (F) de la dépendance à la nicotine mesurée selon le questionnaire de Fagerström, sur la prise de nicotine dans les groupes du e-liquide 1 (vert) et du e-liquide 2 (rose). Aucun effet de ces covariables n’a été mis en évidence sur la prise de nicotine que ce soit pour le groupe du e-liquide 1 ou du e-liquide 2. Analyses statistiques : (A), (D) – (F) les comparaisons entre les différents groupes ont été réalisées à l’aide d’un test ANOVA à 2 facteurs ($\alpha = 0,05$) suivi d’un test de comparaisons multiples de Šidák ; (B) et (C) régression linéaire simple avec intervalle de confiance à 95%.

2) Cinétiques

a) Analyse pharmacocinétique de la nicotine dans le plasma

i. Paramètres pharmacocinétiques

Seuls 16 patients ont été inclus dans l’analyse pharmacocinétique à cause d’une absence de données pharmacocinétique chez un des patients randomisés dans le bras A. Une analyse non-compartimentale a été réalisée pour chaque individu. Le profil des concentrations moyennes de nicotine par e-liquide en fonction du temps est présenté dans la figure 21. La C_{max} moyenne de nicotine plasmatique est de $16,6 \pm 12,4$ ng/mL, le T_{max} moyen est de $14,4 \pm 6,7$ min et l’ $AUC_{0-80 \text{ min}}$ moyenne est de $916,0 \pm 656,9$ ng.min/mL.

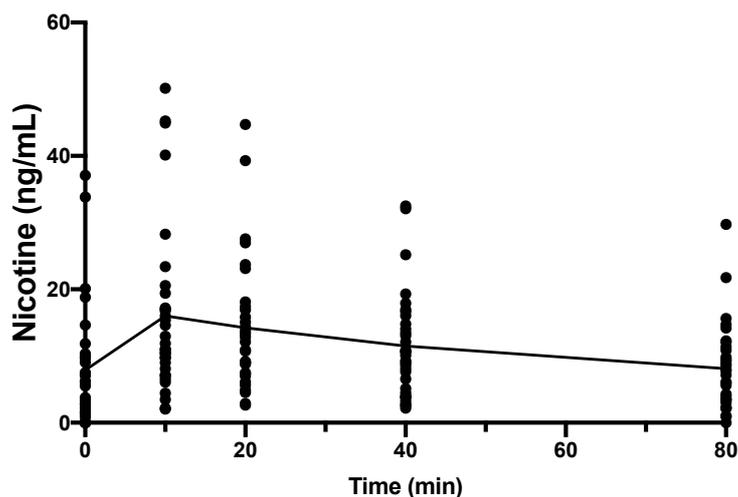


Figure 21 – Profils pharmacocinétiques obtenus pour la nicotine plasmatique dans l'ensemble de la population étudiée. La ligne continue représente la moyenne des concentrations à un temps donné.

Comme le montre la figure 22, la masse de nicotine consommée par l'ensemble des sujets et pour les deux e-liquides est faiblement corrélée à la C_{max} ($R^2 = 0,4021$) et à l' AUC_{0-80} ($R^2 = 0,3205$). En revanche, il existe une excellente corrélation entre les résultats de C_{max} et d' AUC_{0-80} ($R^2 = 0,8665$).

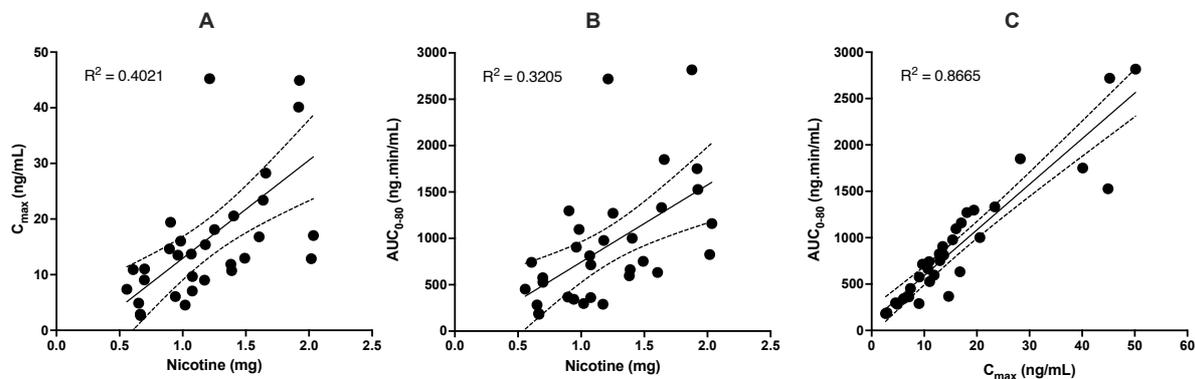


Figure 22 – Corrélations entre la masse de nicotine consommée et les paramètres pharmacocinétiques (A) concentrations maximales dans le plasma (C_{max}) ($R^2 = 0,4021$) et (B) aires sous la courbe (AUC_{0-80}) ($R^2 = 0,3205$). (C) Corrélation entre les C_{max} et les AUC_{0-80} ($R^2 = 0,8665$) mesurées. Analyse statistique : régression linéaire simple avec intervalle de confiance à 95%.

Des profils de corrélation similaires ont été obtenus dans chaque groupe de e-liquides (EL1 et EL2) (Figure 23).

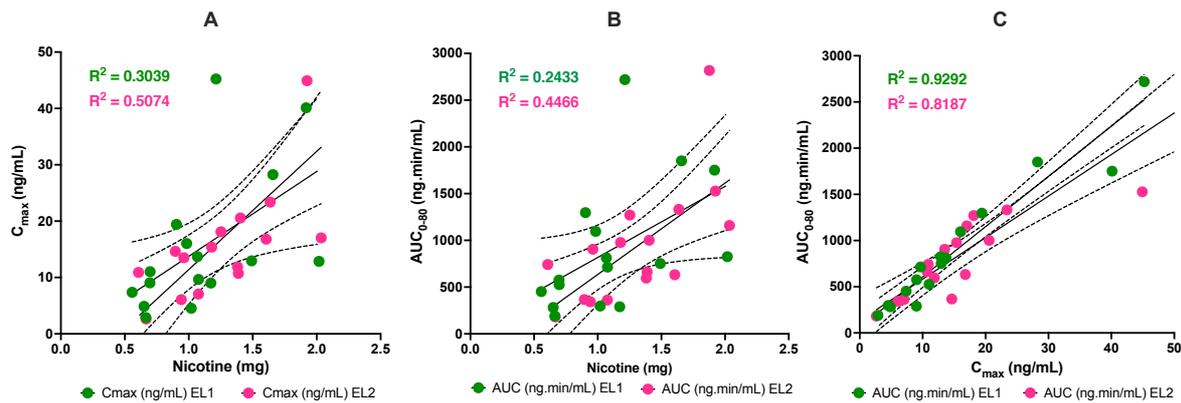


Figure 23 – (A) Corrélations entre la masse de nicotine consommée et les concentrations maximales de nicotine dans le plasma (C_{\max}) pour le e-liquide 1 (vert, $R^2 = 0,3039$) et le e-liquide 2 (rose, $R^2 = 0,5074$) et (B) entre la masse de nicotine consommée et les aires sous la courbe (AUC_{0-80}) pour le e-liquide 1 (vert, $R^2 = 0,2433$) et le e-liquide 2 (rose, $R^2 = 0,4466$). (C) Corrélations entre les C_{\max} et les AUC_{0-80} pour le e-liquide 1 (vert, $R^2 = 0,9292$) et le e-liquide 2 (rose, $R^2 = 0,8187$). Analyse statistique : régression linéaire simple avec intervalle de confiance à 95%.

ii. Influence des covariables sur les paramètres pharmacocinétiques de la nicotine

- *Influence des paramètres démographiques*

Malgré une tendance à l'augmentation des C_{\max} et AUC_{0-80} chez les hommes, aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence par rapport aux C_{\max} et AUC_{0-80} observées chez les femmes ($p = 0,0902$ et $p = 0,1412$, respectivement). L'ajout de données pharmacocinétiques supplémentaires est nécessaire. Par ailleurs, aucune influence du poids ($R^2 = 0,1917$) ou de l'IMC ($R^2 = 0,1537$) n'a été identifiée sur la C_{\max} , ni du poids ($R^2 = 0,1119$) et de l'IMC ($R^2 = 0,08714$) sur l' AUC_{0-80} .

- *Les habitudes de consommation nicotinique*

Le fait d'utiliser exclusivement la e-cigarette augmente significativement la C_{\max} ($p = 0,0131$) et l'exposition à la nicotine (AUC_{0-80}) ($p = 0,0031$) par rapport aux sujets ayant une utilisation concomitante de e-cigarette et de cigarettes classiques (Figure 24(A) et (D)).

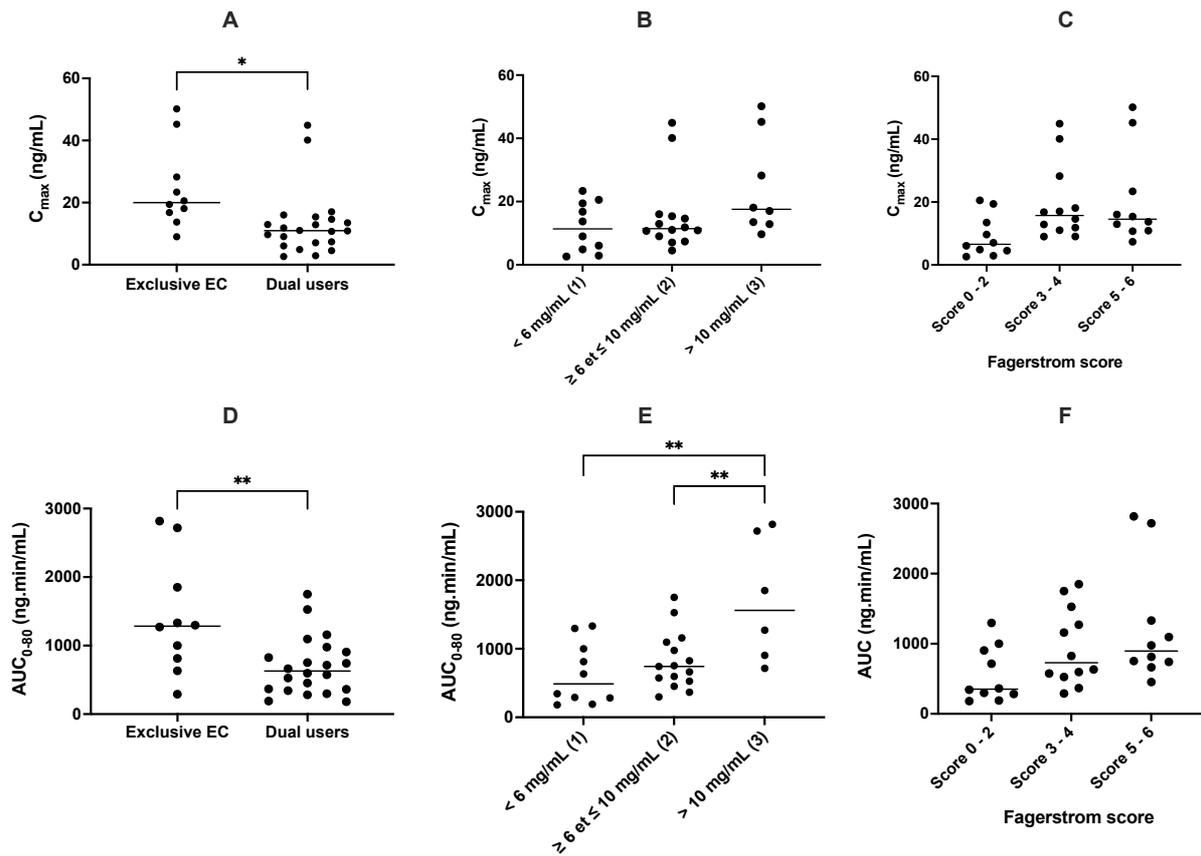


Figure 24 – Graphiques illustrant l’effet des covariables caractérisant la consommation nicotinique sur la C_{max} et l’ AUC_{0-80} . La consommation exclusive de e-cigarette a montré un effet significativement différent par rapport à la consommation concomitante de tabac et de e-cigarette sur (A) la C_{max} ($p = 0,0131$) et (D) l’ AUC ($p = 0,0031$). (E) Le groupe des individus ayant une concentration de nicotine habituelle dans leurs e-liquides > 10 mg/mL possèdent une AUC_{0-80} supérieure comparée aux individus ayant une concentration de nicotine habituelle dans leurs e-liquides < 6 mg/mL ($p = 0,0019$) ou compris entre 6 et 10 mg/mL ($p = 0,0058$), mais (B) aucun impact n’a été identifié sur la C_{max} . Malgré une tendance à l’augmentation de (C) la C_{max} et (F) l’ AUC en fonction du score de Fagerström, aucune différence significative n’a été démontrée. Analyses statistiques : (A) et (D) comparaison des moyennes avec un test de Student ; (B), (C), (E) et (F) analyses des variances ANOVA à un facteur ($\alpha = 0,05$) suivi d’un test de comparaison multiple de Dunnett.

Malgré une tendance à l’augmentation de la C_{max} chez les sujets utilisant habituellement une concentration de nicotine élevée (> 10 mg/mL) par rapport aux deux autres groupes de sujets, aucune différence significative n’a pu être mise en évidence (Figure 24(B)). En revanche, des différences significatives ont été démontrées sur l’ AUC_{0-80} selon la concentration en nicotine des e-liquides habituellement consommés par les sujets participant à l’étude. Ainsi, des AUC_{0-80} plus élevées sont plus souvent retrouvées chez les sujets utilisant des e-liquides contenant une concentration de nicotine élevée (> 10 mg/mL) en comparaison aux sujets utilisant de faibles concentrations de nicotine (< 6 mg/mL) ($p = 0,0019$) ou des concentrations moyennes (≥ 6 et ≤ 10 mg/mL) ($p = 0,0058$) dans leurs e-liquides habituels (Figure 24(E)).

En ce qui concerne la dépendance à la nicotine évaluée par le score de Fagerström, aucune différence n'a été retrouvée entre le niveau de dépendance et l'AUC₀₋₈₀ ou la C_{max} (Figure 24(C) et (F)).

- *Influence de la composition du e-liquide vapoté lors de la visite*

Les paramètres pharmacocinétiques sont résumés, pour chaque e-liquide (EL1 et EL2) dans le tableau VI. Une forte tendance à l'augmentation de la C_{max} après vapotage du e-liquide 2 par rapport au e-liquide 1 a été observée ($p = 0,0624$), mais l'ajout de données supplémentaires est nécessaire avant de pouvoir conclure par rapport à un éventuel effet de la composition en e-liquide sur les paramètres pharmacocinétiques de la nicotine.

Tableau VI – Résumé des paramètres pharmacocinétiques obtenus pour la nicotine après vapotage du e-liquide 1 (EL1) et du e-liquide 2 (EL2).

Paramètre pharmacocinétique	Total (N = 32)	E-liquide 1 (N = 16)	E-liquide 2 (N = 16)	EL1 vs. EL2* (p-value)
Concentration maximale (C _{max}) en ng/mL	16,6 ± 12,4	15,4 ± 12,3	17,7 ± 12,8	0,0624
Aire sous la courbe 0 – 80 min (AUC ₀₋₈₀) en ng.min/mL	916,0 ± 656,9	910,7 ± 695,9	929,8 ± 638,0	0,6968
Temps pour atteindre la C _{max} (T _{max}) en min	14,4 ± 6,7	14,4 ± 5,1	14,4 ± 8,1	> 0,9999

*Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. * Test statistique : analyse paramétrique pour échantillons appariés par un test de Student, $\alpha = 0,05$.*

En raison d'un pourcentage d'AUC extrapolée par rapport à l'AUC_{inf} largement supérieur à 20 % (moyenne ± écart-type = 167,0 ± 151,9 %, minimum = 1,2 %, maximum = 557,6 %), l'AUC_{inf} moyenne n'a pas pu être estimée de manière fiable.

En analysant l'impact de chaque covariable préalablement testée sur la C_{max} dans le groupe du e-liquide 1 et celui du e-liquide 2, aucun résultat statistiquement significatif n'est mis en évidence (Figure 25).

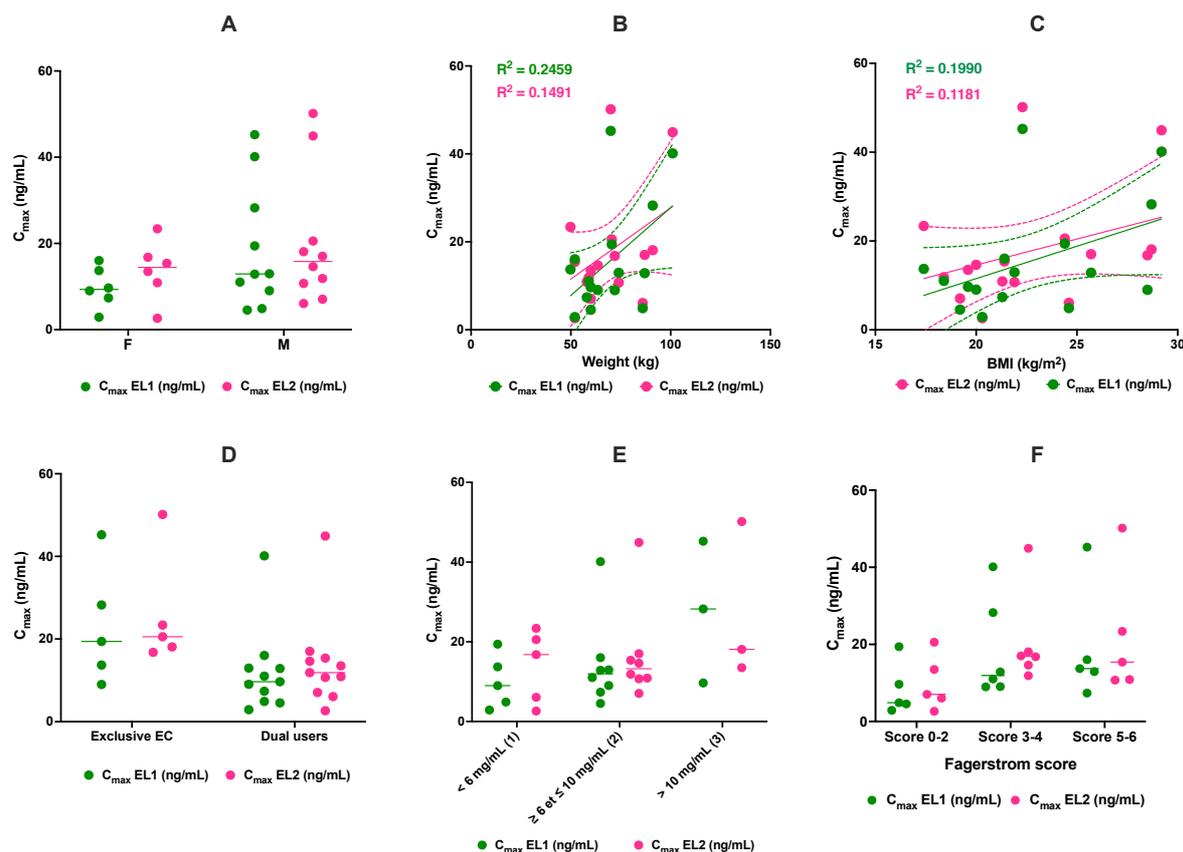


Figure 25 – Graphiques illustrant l’influence des covariables sur la C_{max} dans les groupes des e-liquides (EL1 et EL2). Les covariables sont (A) le sexe, (B) le poids et (C) l’IMC, mais aussi (D) la consommation exclusive de e-cigarette ou la consommation concomitante de tabac et e-cigarette, (E) la concentration de nicotine dans les e-liquides habituellement consommés par les sujets et (F) le score de Fagerström calculé pour le sujet. Aucune de ces covariables n’a montré une influence sur la C_{max} de la nicotine. Analyses statistiques : (A), (D), (E) et (F) analyses des variances ANOVA à deux facteurs suivies d’un test de comparaisons multiples de Šidák, $\alpha = 0,05$; (B) et (C) régression linéaire simple avec intervalle de confiance à 95%.

La recherche d’impact de chaque covariable, préalablement testée sur l’ensemble des individus, a démontré une influence de la concentration en nicotine consommée habituellement par le sujet sur l’ AUC_{0-80} dans le groupe du e-liquide 1. En effet, des AUC_{0-80} plus élevées ont été identifiées chez les sujets utilisant habituellement une concentration de nicotine élevée (> 10 mg/mL) par rapport aux sujets utilisant habituellement une faible concentration de nicotine (< 6 mg/mL) ($p = 0,0225$) ou une concentration moyenne comprise entre 6 et 10 mg/mL ($p = 0,0459$) (Figure 26 (E)). Les autres covariables n’ont pas montré d’influence statistiquement significative sur les expositions à la nicotine (AUC_{0-80}) (Figure 26).

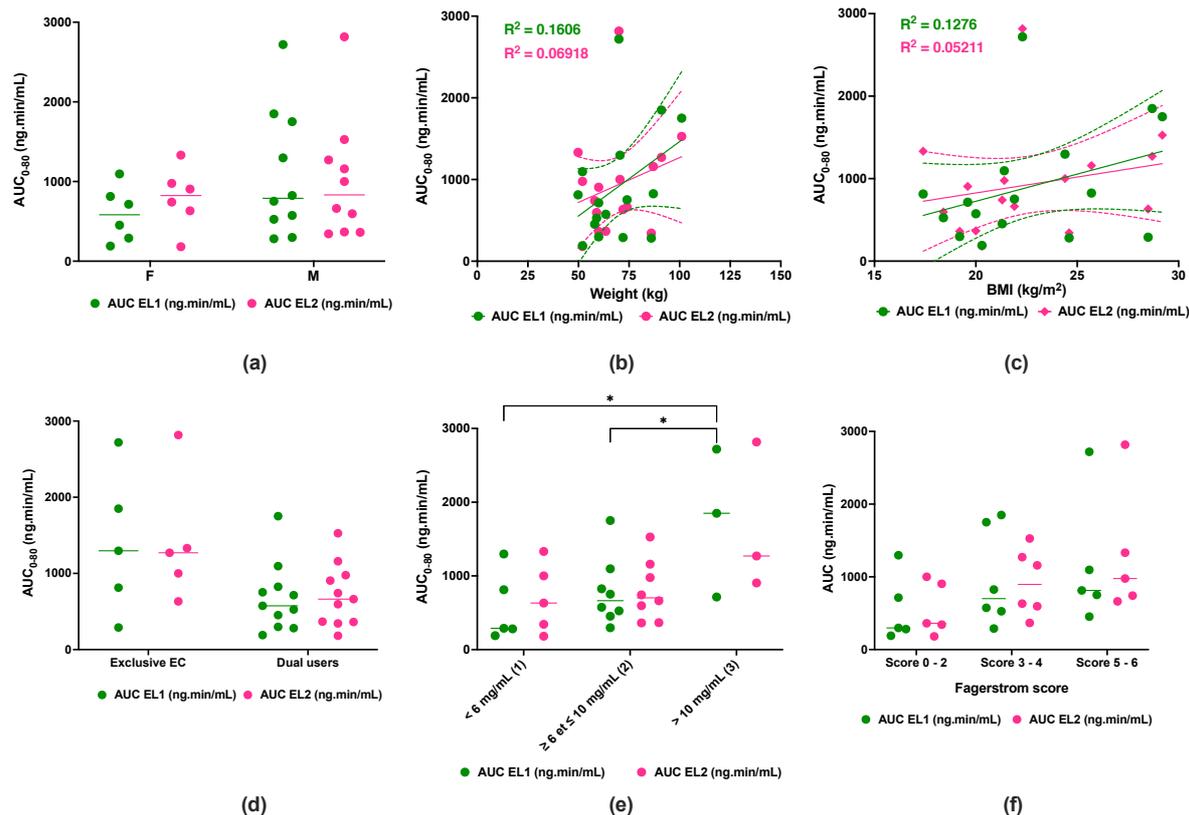


Figure 26 – Graphiques illustrant l’effet des covariables sur l’AUC₀₋₈₀ dans le groupe des e-liquides à l’étude (EL1 en vert et EL2 en rose). Les covariables sont (A-C) démographiques et (D-F) liées à la consommation nicotinique. (E) Dans le groupe du e-liquide 1, les individus ayant une concentration de nicotine habituelle dans leurs e-liquides > 10 mg/mL possèdent une AUC₀₋₈₀ supérieure à celle des individus ayant une concentration de nicotine habituelle dans leurs e-liquides < 6 mg/mL ($p = 0,0225$) ou comprise entre 6 et 10 mg/mL ($p = 0,0459$), cependant cet effet n’a pas été identifié dans le groupe du e-liquide 2. Aucune autre covariable n’a montré d’impact sur l’exposition à la nicotine. Analyses statistiques : (A), (D), (E) et (F) analyse des variances ANOVA à deux facteurs suivie d’un test de comparaisons multiples de Šidák, $\alpha = 0,05$; (B) et (C) régression linéaire simple avec intervalle de confiance à 95%. * : $p < 0,05$.

b) Cinétique de la cotinine dans le plasma

Une analyse pharmacocinétique non-compartmentale de la cotinine a été réalisée après vapotage pour chaque individu. Le profil des concentrations de cotinine en fonction du temps obtenu est présenté dans la Figure 27. La C_{\max} moyenne pour la cotinine plasmatique est de $240,2 \pm 147,7$ ng/mL, le T_{\max} moyen est de $35,6 \pm 27,4$ min et l’AUC_{0-80 min} moyenne est de 16638 ± 10752 ng.min/mL.

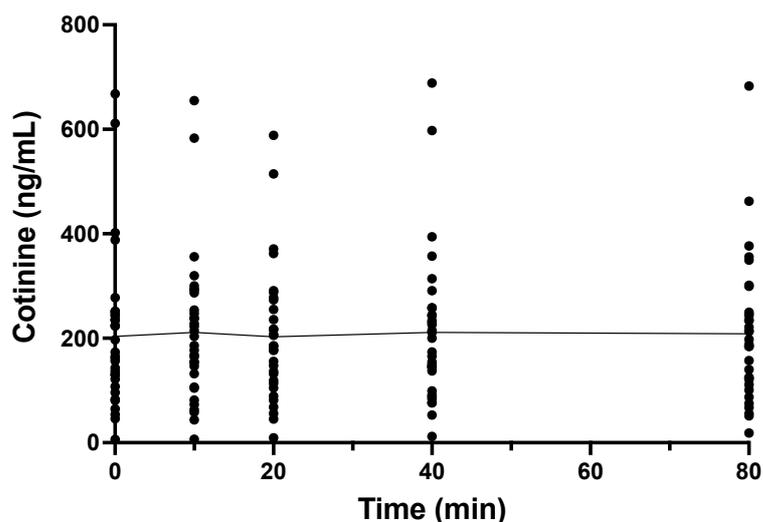


Figure 27 – Profils pharmacocinétiques obtenus pour la cotinine plasmatique dans l'ensemble de la population étudiée. La ligne continue représente la moyenne des concentrations obtenues.

Les paramètres pharmacocinétiques moyens obtenus pour la cotinine après vapotage des e-liquides (EL1 et EL2) sont résumés dans le tableau VII. Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence pour ces paramètres ($p > 0,05$).

Tableau VII – Résumé des paramètres pharmacocinétiques obtenus pour la cotinine plasmatique après vapotage du e-liquide 1 (EL1) et du e-liquide 2 (EL2).

Paramètres pharmacocinétiques de la cotinine	Total (N = 32)	E-liquide 1 (N = 16)	E-liquide 2 (N = 16)	Comparaison
				EL1 et EL2* (p-value)
Concentration maximale (C_{max}), en ng/mL	240,2 ± 147,4	251,2 ± 157,7	229,2 ± 140,7	0,1783
Aire sous la courbe 0-80 min (AUC_{0-80}) en ng.min/mL	16638 ± 10752	16770 ± 11426	16506 ± 10407	0,7793
Temps pour atteindre la C_{max} (T_{max}), en min	35,6 ± 27,4	30,6 ± 22,9	40,6 ± 31,1	0,2532

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. *Test statistique paramétrique pour l'analyse d'échantillons appariés (test de Student, $\alpha = 0,05$).

c) **Analyse de la production de radicaux libres de l'oxygène dans le sang veineux des sujets**

i. **Cinétique de la production de radicaux libres dans le sang veineux des sujets**

La mesure des RLO produits dans le sang total après vapotage a permis de mettre en évidence une production maximale au temps de prélèvement T_{20} (T_{\max} RLO), correspondant au premier temps de prélèvement après la fin du protocole de vapotage. De même, les T_{\max} RLO pour le e-liquide 1 et le e-liquide 2 ont été de 20 minutes et aucune différence n'a été démontrée entre les deux e-liquides ($p = 0,855$). La production maximale de RLO (RLO à T_{\max}) a été de $0,851 \mu\text{mol}/\text{min}$ ($0,849 \mu\text{mol}/\text{min}$ pour le e-liquide 1 et $0,853 \mu\text{mol}/\text{min}$ pour le e-liquide 2, $p = 0,773$). L'AUC pour la formation de RLO (AUC_{0-80} RLO) a été de $57,50 \text{ min} \cdot \mu\text{mol}/\text{min}$ ($58,84 \text{ min} \cdot \mu\text{mol}/\text{min}$ pour le e-liquide 1 et $56,07 \text{ min} \cdot \mu\text{mol}/\text{min}$ pour le e-liquide 2, $p = 0,3596$).

Si aucune différence significative n'a été mise en évidence entre la formation de RLO à T_{20} et le temps de prélèvement précédant le début du vapotage (T_0), une différence existe entre les RLO formées à T_{20} par rapport à T_{80} , ce dernier représentant le point de prélèvement le plus tardif du protocole ($p < 0,05$) (Figure 28(A)). Cependant, ce résultat n'a pas été significatif dans les deux sous-groupes de e-liquides (Figure 28(B), (C)) et l'ajout de données supplémentaires est nécessaire pour conforter ces observations.

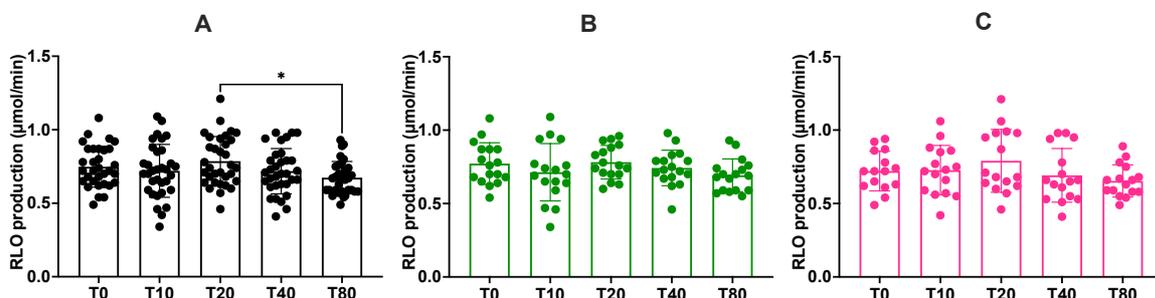


Figure 28 – Formation de radicaux libres de l'oxygène (RLO) dans le sang au cours du temps pour (A) les deux e-liquides, (B) le e-liquide 1 et (C) le e-liquide 2. Analyse statistique : Comparaison des moyennes avec un test de Student avec $\alpha = 0,05$. * : $p = 0,0256$.

ii. Corrélation entre les paramètres pharmacocinétiques de la nicotine et la production de stress oxydant

Aucune corrélation n'a été identifiée entre les paramètres pharmacocinétiques de la nicotine et la formation de RLO pour les deux e-liquides administrés (Tableau VIII), ni pour le e-liquide 1 ou le e-liquide 2 séparément.

Tableau VIII – Tableau récapitulatif des analyses de corrélation entre les paramètres pharmacocinétiques de la nicotine plasmatique et les paramètres de production de radicaux libres de l'oxygène (RLO) dans le sang total après vapotage.

Paramètres PK nicotine	Formation de radicaux libres de l'oxygène (RLO)				
	<i>RLO à T_0</i>	<i>RLO à T_{20}</i>	<i>RLO à T_{max}</i>	<i>AUC₀₋₈₀ RLO</i>	<i>T_{max} RLO</i>
C_0	$R^2 = 0,000652$	$R^2 = 0,00883$	$R^2 = 0,0337$	$R^2 = 0,0417$	$R^2 = 0,0454$
C_{max}	$R^2 = 0,00248$	$R^2 = 0,00179$	$R^2 = 0,0106$	$R^2 = 0,0253$	$R^2 = 0,0384$
AUC ₀₋₈₀	$R^2 = 0,00020$	$R^2 = 0,0128$	$R^2 = 0,0336$	$R^2 = 0,0347$	$R^2 = 0,0212$
T_{max}	$R^2 = 0,0199$	$R^2 = 0,00414$	$R^2 = 0,004204$	$R^2 = 0,02302$	$R^2 = 0,0483$

C_0 : concentration résiduelle de nicotine ; C_{max} : Concentration maximale (ng/mL) ; AUC₀₋₈₀ : aire sous la courbe 0-80 min (ng.min/mL) ; T_{max} : temps nécessaire pour atteindre la C_{max} (min).

X. Discussion

L'étude VAPexp' AIR est la première étude clinique randomisée, chez des sujets adultes sains maîtrisant l'acte de vapotage, visant à comparer directement la délivrance de nicotine après vapotage de deux e-liquides qui diffèrent par leur ratio en PG/VG. Les 2 liquides contiennent une concentration de nicotine à 6 mg/mL et un arôme « tabac blond », qui est habituellement choisi par les sujets vapoteurs, soit anciens fumeurs, qui ont complètement arrêté la consommation de cigarettes classiques, soit « *dual users* » qui utilisent concomitamment la cigarette classique et la e-cigarette. Majoritairement, ces sujets veulent retrouver les mêmes sensations que celles de la cigarette classique lorsqu'ils vapotent. Les résultats préliminaires de VAPexp' AIR montrent que la masse de nicotine inhalée lors du vapotage de e-liquide ayant un ratio PG/VG de 76/24 est supérieure à celle inhalée lors du vapotage du e-liquide avec un ratio

PG/VG de 50/50. Après analyse pharmacocinétique par la méthode non-compartimentale, la C_{\max} de nicotine dans le plasma présentait une forte tendance à être supérieure après vapotage du e-liquide le plus riche en PG par rapport au e-liquide ayant une proportion équivalente de PG/VG, mais cette différence reste statistiquement non significative au regard du faible nombre de sujets inclus. Par ailleurs, aucune différence statistique n'a été mise en évidence entre les deux e-liquides que ce soit pour le T_{\max} ou pour l' AUC_{0-80} .

Les cigarettes électroniques ou dispositifs électroniques de délivrance de la nicotine de 3^{ème} et 4^{ème} génération, sont les seules à posséder des caractéristiques qui ressemblent à celles des cigarettes classiques tant en termes de gestuelle, de comportement du consommateur et de profil pharmacocinétique de délivrance de la nicotine. La nicotine est la molécule responsable de l'addiction tabagique. La très large majorité des vapoteurs étant d'anciens fumeurs ou des « *dual users* », ils consomment des e-liquides contenant de la nicotine et dont la concentration moyenne se situe autour de 6 mg/mL. Cette concentration est par ailleurs la plus vendue et la plus souvent déclarée par les fabricants comme entrant dans la composition des e-liquides. Elle est suivie de près par les e-liquides contenant des concentrations de 3 et 12 mg/mL de nicotine, alors que des e-liquides ayant des concentrations en nicotine de 11, 16, 18 ou 20 mg/mL sont fabriqués en moindre quantité sur la période 2016 – 2020 en France (<https://www.anses.fr/en/system/files/CONSO2018SA0189Ra-1.pdf>, site consulté le 7 octobre 2022). Il est aussi à noter que les vapoteurs débutant la e-cigarette en ayant pour objectif l'abstinence à la nicotine, vont souvent débiter la phase de sevrage par des e-liquides très concentrés (16 ou 18 mg/mL) pour progressivement diminuer palier par palier le dosage en nicotine. Chaque étape et chaque consommateur a sa vitesse de progression qui peut s'étaler sur quelques mois à plusieurs années.

Dans l'étude VAPexp'AIR, un dispositif de 3^{ème} génération a été utilisé. Ces dispositifs délivrent une quantité de nicotine semblable à celle délivrée à partir d'une cigarette classique

(0,9 à 2,1 mg) (Digard et al. 2013). Dans notre étude, la quantité moyenne de nicotine inhalée a été estimée à 1,2 mg par séance de vapotage (concentration de nicotine dans le liquide à 6 mg/mL, 20 puffs de 3 secondes), confortant les études préexistantes sur les systèmes récents de vapotage (Hajek et al. 2017; Wagener et al. 2017; Yingst et al. 2019).

Ces dispositifs ouverts permettent aux utilisateurs de choisir la composition des e-liquides en fonction de leurs préférences, certaines personnes fabriquant même leur e-liquide « maison » à partir de PG, VG, d'arômes et de nicotine vendus séparément, qu'elles assemblent selon leurs envies et goûts. Ainsi, les utilisateurs souhaitant une sensation dans la gorge ou « *hit* » similaire à celle obtenue lors de la consommation d'une cigarette classique vont choisir des liquides ayant une concentration plus élevée en PG, alors que les utilisateurs souhaitant générer un aérosol plus visible (nuage ou « *cloud* ») vont choisir un liquide riche en VG. Les ratios de PG/VG 50/50 et 76/24 sont les plus couramment commercialisés par les fabricants de liquides pour cigarette électronique et c'est la raison pour laquelle ils ont été choisis dans le protocole de l'étude VAPexp'AIR. Si la modification des proportions en PG et VG, servant de véhicule à la molécule de nicotine, peut avoir un impact sur l'aérosolisation de la nicotine, elle peut aussi avoir un impact sur son absorption pulmonaire. Cela expliquerait la forte tendance à l'augmentation de la C_{max} observée pour le e-liquide enrichi en PG, par rapport au e-liquide ayant une proportion égale de PG et de VG. Si une première étude de laboratoire a montré que la quantité de nicotine présente dans l'aérosol augmentait quand le pourcentage de PG augmentait (EL-Hellani et al. 2016), les premiers résultats de l'étude clinique VAPexp'AIR évoquent que l'absorption de la nicotine par l'organisme dépend du pourcentage de PG dans le véhicule.

L'étude VAPexp'AIR a été construite sur un modèle de type cross-over et cela permet d'augmenter la puissance statistique de l'étude puisque chaque sujet est son propre témoin. Un nombre important de sujets sera inclus ($N = 50$), ce qui n'est pas toujours le cas pour les études

de pharmacocinétique. La présente analyse des résultats a inclus une faible proportion de sujets ($N = 17$) par rapport au nombre de sujets prévus dans l'étude ($N = 50$ sujets). La période d'inclusion des sujets s'est étendue du 11/01/2019 au 28/02/2020 et a dû être suspendue à cause de la crise sanitaire provoquée par le virus SARS-CoV-2. En effet, le vapotage et le prélèvement d'air expiré dans un espace clos ne permettent pas le respect des règles sanitaires de distanciation et le port du masque imposés à l'hôpital. Ces gestes présentent un risque d'exposer les personnes présentes à une contamination aéroportée. Une reprise des inclusions est prévue dès amélioration de la situation sanitaire.

Les sujets inclus dans l'étude VAPexp'AIR sont soit des vapoteurs exclusifs, soit des utilisateurs concomitants de e-cigarette et de cigarette classique. Des études ont montré que les vapoteurs expérimentés inhalent plus de nicotine et ont ainsi des concentrations systémiques de nicotine plus élevées que les sujets naïfs à l'utilisation de la e-cigarette (Farsalinos, Spyrou, Stefopoulos, et al. 2015; Fearon et al. 2017). Dans l'étude VAPexp'AIR, bien que l'ensemble des sujets maîtrise l'acte de vapotage et que le protocole de vapotage soit standardisé, une tendance à l'augmentation de la masse de nicotine inhalée ($p = 0,1349$) et une augmentation significative de la C_{\max} ($p = 0,0131$) et de l' AUC_{0-80} ($p = 0,0031$) ont été démontrées chez les vapoteurs exclusifs par rapport aux « *dual users* ». Cet effet pourrait s'expliquer par des habitudes d'inhalation différentes entre les vapoteurs et les fumeurs, avec notamment une inhalation plus profonde ou intense lors de l'utilisation des e-cigarettes par rapport à l'inhalation à partir des cigarettes classiques. Ainsi, si les fumeurs gardaient la même topographie pour vapoter que pour fumer, la nicotine absorbée et ses paramètres pharmacocinétiques (C_{\max} , AUC) seraient certainement diminués. Pour éviter ce biais, le protocole de vapotage s'est basé sur une session standardisée alternant un puff de 3 secondes et une pause de 30 secondes répétés 20 fois avec un rythme donné par une vidéo que le sujet devait suivre. Cependant, le protocole n'a pas été filmé et analysé *a posteriori* pour vérifier la durée et l'intensité réelles d'inhalation,

comme réalisé dans d'autres études (Behar, Hua, and Talbot 2015; Evans and Hoffman 2014; Norton, June, and O'Connor 2014). Le but premier de ces études était l'analyse typographique du vapotage, alors que l'étude VAPexp' AIR analyse premièrement la délivrance de la nicotine et sa pharmacocinétique.

Les paramètres pharmacocinétiques après analyse non-compartimentale ont montré que la nicotine était rapidement absorbée ($T_{\max} = 14,4$ min) et que la moyenne des concentrations plasmatiques maximales était élevée ($C_{\max} = 16,6$ ng/mL) après vapotage. L' AUC_{0-80} moyenne est de 916,0 min.ng/mL soit 15,3 h.ng/mL. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de la littérature pour les paramètres pharmacocinétiques de la nicotine après une cigarette classique ($T_{\max} = 5$ à 8 min, $C_{\max} = 12$ à 50 ng/mL, $AUC = 14,8$ h.ng/mL soit 888 ng.min/mL) et ceux après vapotage à l'aide de dispositifs de délivrance de la nicotine récents ($T_{\max} = 2$ à 12 min, $C_{\max} = 7$ à 30 ng/mL, $AUC = 843$ min.ng/mL ou 14,05 h.ng/mL) (Digard et al. 2013; Jacobson et al. 2021; St.Helen et al. 2016; Wagener et al. 2017). Cependant, les paramètres pharmacocinétiques C_{\max} et AUC_{0-80} ont été estimés selon les concentrations réellement quantifiées chez les sujets, sans prendre en compte la variabilité de la concentration de nicotine avant vapotage ($C_0 = 7,9 \pm 9,1$ ng/mL, CV = 115,2 %). Le protocole de l'étude VAPexp' AIR prévoyait un arrêt de la prise de nicotine sous toutes ses formes une heure avant les visites de suivi. Cependant, les sujets n'ont pas toujours été prévenus lors de la visite d'inclusion ou n'ont pas respecté cette consigne et ont, par conséquent, consommé de la nicotine juste avant le début du protocole de vapotage. Ainsi, certaines concentrations à T_0 ont été très élevées chez certains sujets ($C_0 = 7,9 \pm 9,1$ ng/mL, min $C_0 = 0$ ng/mL et max $C_0 = 37,1$ ng/mL) et en conséquence, les concentrations et l' AUC de nicotine post-vapotage ont été majorées. De plus, les valeurs de l' AUC extrapolée ont aussi été augmentées, rendant impossible le calcul de l' AUC_{inf} .

Un premier objectif secondaire de cette étude est l'analyse de l'air expiré immédiatement après vapotage. A l'aide d'un embout buccal, l'air expiré est concentré dans un sac de type Tedlar[®]

puis extrait à l'aide d'une pompe péristaltique. A la sortie de la pompe péristaltique, les molécules de l'air expiré sont fixées sur une cartouche de type Tenax[®]. Les molécules fixées sur la cartouche sont ensuite extraites par une méthode de thermodésorption, puis analysées par chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (TD-GC-MS). Un prélèvement d'air ayant été fait également avant le protocole de vapotage, cette méthode permettra d'identifier les molécules apparues ou modifiées dans l'air expiré lors du vapotage.

Un autre objectif secondaire de l'étude VAPexp'AIR concerne l'analyse par LC-MS des urines prélevées à la fin de la visite avec notamment dosage de la 3-hydroxycotinine, principal métabolite urinaire de la nicotine. Son dosage urinaire, nous permettra d'estimer le ratio 3-hydroxycotinine/cotinine (NMR). De plus, dans les urines, l'analyse de la présence des nitrosamines sera effectuée. Les nitrosamines sont des composants naturellement présents dans le tabac mis en cause dans le développement de certains cancers induits par la consommation tabagique (Hecht 2006). Il sera alors intéressant de voir si la concentration en nitrosamines change entre les vapoteurs exclusifs et les vapoteurs consommateurs réguliers de cigarette classique.

Il a été montré que l'aérosol des e-cigarettes pouvait déclencher du stress oxydant, suivi d'autres processus pathologiques comme l'endommagement des protéines, des lipides et de l'ADN, puis de la mise en place d'un processus pro-inflammatoire observé *in vitro* et *in vivo* (Merecz-Sadowska et al. 2020). Le stress oxydant provoqué par le vapotage a été mesuré dans le sang total aux mêmes temps de prélèvement que pour l'étude pharmacocinétique (avant le début du vapotage, à 10, 20, 40 et 80 minutes après le début du vapotage). Les RLO sont des molécules hautement réactives possédant des électrons non appariés dans la couche externe. Dans l'étude VAPexp'AIR, la détection des RLO a été effectuée grâce à l'identification des rayonnements électromagnétiques des électrons non appariés lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique par RPE (Mrakic-Sposta et al. 2012). La production maximale de RLO a été identifiée à 20

minutes après le début du vapotage, ce qui correspond également au premier temps de prélèvement après la fin du protocole de vapotage. Aucune différence n'a été observée pour la production de RLO entre les deux e-liquides (C_{\max} , T_{\max} ou AUC_{0-80} de RLO). De plus, aucune différence n'a été mise en évidence entre la production de RLO au temps de prélèvement pré-vapotage (T_0) et le T_{20} . Le non-respect du délai de d'abstinence tabagique initialement demandé par le protocole de l'étude peut également expliquer ce résultat puisque les taux de production de RLO ont pu être anormalement élevés chez certains patients. Par ailleurs, il a été remarqué une réduction entre la présence de RLO à 80 minutes par rapport à celle à 20 minutes pour l'analyse groupée des deux e-liquides. Ce résultat peut s'expliquer par l'élimination des RLO produits par le vapotage par les systèmes antioxydants de l'organisme. En effet, après le protocole de vapotage, les sujets restent sans fumer ou vapoter jusqu'à la fin de la visite et il existe dans l'organisme des systèmes de défense qui ont pour fonction de dégrader les RLO comme les superoxydes dismutases (SOD), qui catalysent la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène. La quantité de peroxyde d'hydrogène, elle-même pro-oxydante, est régulée par d'autres enzymes (l'enzyme héminique catalase ou la glutathion peroxydase) qui possèdent une forte capacité réductrice.

En raison de l'évolution constante des dispositifs délivrant de la nicotine et de leur présentation comme étant sans risques, l'urgence de générer rapidement des résultats décrivant les effets réels de ces dispositifs est nécessaire pour des raisons de santé publique mais surtout garantir la protection des vapoteurs. Cet immense manque d'information a conduit notre équipe à mettre en place un projet qui s'intéresse aux effets pro-inflammatoires et pro-oxydants des nouveaux systèmes de vapotages *in vivo* chez la souris et *in vitro* grâce à un modèle de co-culture mimant la barrière alvéolo-capillaire.

2^{ème} partie : Validation d'un modèle murin
d'inflammation chronique post-exposition à la cigarette
classique

I. Contexte du projet *in vivo*

Les nouveaux systèmes de délivrance de nicotine sont commercialisés comme étant des « produits non ou moins nocifs » que le tabac et leurs défenseurs invoquent le bénéfice de ces systèmes pour permettre la réduction du tabagisme et, en conséquence, la diminution des pathologies qui lui sont liées (Public Health England, site consulté le 07/10/2022, <https://www.gov.uk/government/news/phe-health-harms-campaign-encourages-smokers-to-quit>). Cependant, les premières études scientifiques sur ces dispositifs évoquent des produits dangereux du fait de la présence de nicotine et d'arômes pouvant être pro-inflammatoires et pro-oxydants (Garcia-Arcos et al. 2016; Lerner et al. 2015; Schaal et al. 2018). D'autres études montrent peu de toxicité après une exposition aiguë, mais les effets d'une exposition chronique restent peu connus (Li 2016; Phillips et al. 2015).

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une limitation persistante du flux d'air dans les voies aériennes, généralement progressive et associée à une réponse inflammatoire chronique des voies respiratoires et des alvéoles pulmonaires (<https://goldcopd.org>) (Figure 28).

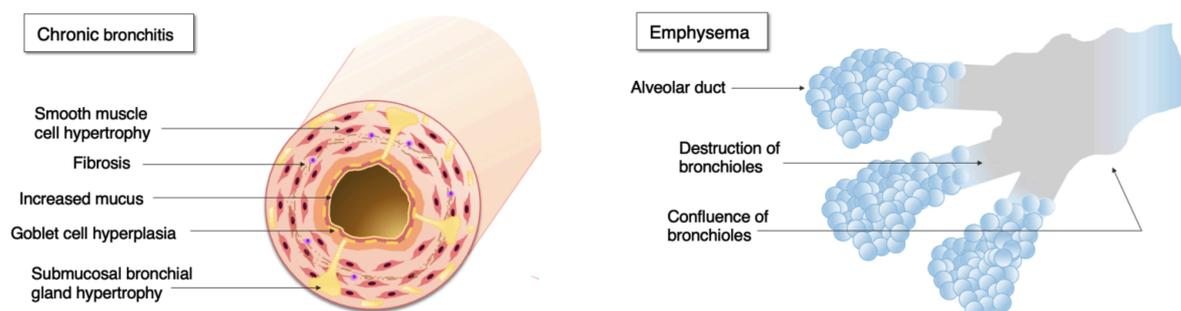


Figure 29 – Illustration de la pathophysiologie de la bronchopneumopathie chronique obstructive (Scarlatà et al. 2020).

La bronchite chronique est causée par une augmentation exagérée de la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes en voie de différenciation. Elle se traduit par une couche de mucus plus épaisse dans les voies respiratoires (Turner et al. 2011). L'emphysème a pour origine la

destruction des espaces aériens situés au-delà des bronchioles terminales et donc des surfaces d'échanges gazeux du poumon, et peut exister concomitamment avec la bronchite chronique.

L'évolution de ces pathologies entraîne une diminution de la fonction pulmonaire et de la qualité de vie des patients. Selon le rapport de 2022 de la *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD), la sévérité de la BPCO est déterminée par le degré du trouble ventilatoire obstructif persistant, qui est mesuré par spirométrie. Un rapport Volume Expiratoire Maximal à la première Seconde (VEMS)/Capacité Vitale Forcée (CVF) < 70 % après un bronchodilatateur pose le diagnostic de BPCO (Tableau IX). Toutefois, une approche globale tenant compte de plusieurs facteurs comme l'état nutritionnel, le nombre d'exacerbations, les comorbidités associées, est nécessaire pour évaluer la sévérité de la maladie.

Tableau IX – Classification de la sévérité de la BPCO selon la GOLD 2022. La valeur prédite est définie par des abaques, prenant en compte l'âge, le sexe, la taille et l'origine ethnique.

Volume expiratoire maximal par seconde (VEMS)/capacité vitale forcée (CVF) < 70 %		
GOLD I	Léger	VEMS \geq 80 % valeur prédite
GOLD II	Modéré	50 % \leq VEMS < 80 % valeur prédite
GOLD III	Sévère	30 % \leq VEMS < 50 % valeur prédite
GOLD IV	Très sévère	VEMS < 30 % valeur prédite ou VEMS < 50 % valeur prédite avec insuffisance respiratoire chronique grave

L'exposition chronique à la fumée de cigarette est le facteur de risque principal contribuant à la pathogénèse de la BPCO. En effet, environ 90 % des patients diagnostiqués BPCO sont des anciens fumeurs ou des fumeurs actuels (Kamal, Srivastava, and Kesavachandran 2015).

Dans la deuxième partie de ce projet, une étude *in vivo* concernant les effets de l'exposition des souris femelles C57bl/6 à la fumée de cigarette classique a été réalisée. Ce travail a consisté à mettre en place un modèle de BPCO induit par la fumée de cigarette chez la souris de manière à l'utiliser pour la suite de nos recherches comme contrôle positif dans des expérimentations

exposant des souris à l'aérosol de e-cigarette, dans les mêmes conditions d'exposition nicotinique.

Cette partie du projet a été réalisée en collaboration avec la plateforme d'analyse des fonctions cardiovasculaires et pulmonaires de l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch-Graffenstaden). L'ICS est une infrastructure d'excellence pour la recherche translationnelle et la génomique fonctionnelle. L'ICS développe de nombreuses méthodes pour des études pré-cliniques, dont la validation de cibles thérapeutiques ou des études pharmacologiques et toxicologiques chez la souris.

II. Pistes physiopathologiques de la BPCO

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif et la prise en charge de la BPCO reste symptomatique. Le traitement passe principalement par l'arrêt du tabac et l'administration de bronchodilatateurs par voie inhalée selon le stade de la maladie et le nombre d'exacerbations annuelles. Les objectifs de la recherche scientifique fondamentale sont de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques dans la BPCO à travers la compréhension des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans cette pathologie.

1) Rôle du déséquilibre entre les espèces oxydantes et antioxydantes

Le stress oxydant peut être un mécanisme déclencheur et amplificateur important dans la BPCO. La charge oxydante dans les poumons due aux substances toxiques de la fumée de cigarette est renforcée par la libération d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species* ou ROS) par les macrophages et les neutrophiles présents en réponse à la signalisation des chémokines. Par exemple, une seule bouffée de cigarette contient 10^{15} molécules oxydantes et un gramme de goudron contient 10^{17} radicaux détectables (Cantin 2010). Il a été démontré que le H_2O_2 et le 8-isoprostane, qui est un marqueur de la peroxydation lipidique, sont augmentés dans la circulation systémique des patients atteints de BPCO (Kostikas et al. 2003).

Dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de fumeurs, l'alpha 1-antitrypsine a été retrouvée sous forme oxydée et des concentrations élevées de 8-hydroxydésoxyguanosine, un indicateur de l'ADN oxydé, ont également été observées et corrélées avec le nombre de cigarettes fumées par jour (Asami et al. 1997; Gadek, Fells, and Crystal 1979). Ainsi, dans la BPCO, les ROS, qu'elles soient radicalaires (RLO) ou non, entraînent une variété de mécanismes moléculaires et cellulaires délétères sur le parenchyme pulmonaire allant de la peroxydation des lipides et la carbonylation des protéines à la mort cellulaire par nécrose cellulaire, apoptose et autophagie. D'autres réponses comme une réponse inflammatoire exagérée, le remodelage de la matrice extracellulaire et des vaisseaux sanguins, une inactivation des antiprotéases, l'hypersécrétion de mucus et l'altération des systèmes de réparation tissulaire sont également engendrés par les ROS (Yao and Rahman 2011) (Figure 30).

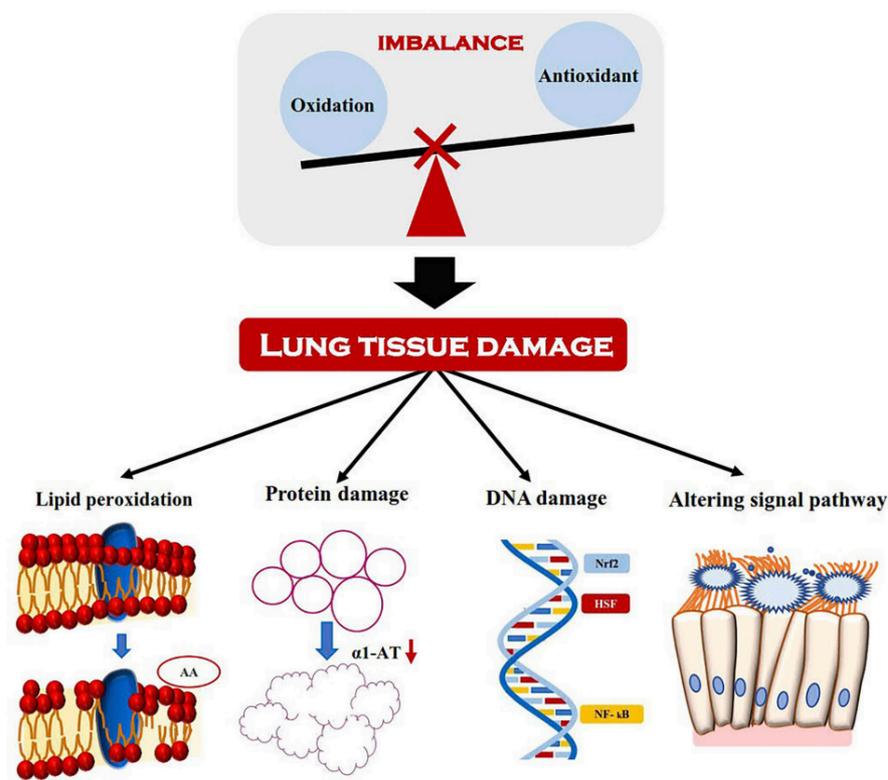


Figure 30 – Mécanismes de développement de la BPCO induits par le stress oxydant (He et al. 2020).

L'équilibre oxydants/antioxydants est davantage perturbé par consommation des antioxydants endogènes. Ainsi, le facteur de transcription Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2) régule de nombreux gènes codant pour des protéines ayant des activités antioxydantes (HO-1, NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 ou NQO1) (Cui et al. 2018). De ce fait, les molécules activatrices de Nrf2 sont des options thérapeutiques prometteuses et très étudiées dans la BPCO (Estornut et al. 2019).

2) Rôle de l'excès de protéases

Dans la BPCO, un déséquilibre entre les protéases qui dégradent la matrice extracellulaire du tissu conjonctif et les antiprotéases qui contrent cette action a été identifié. Des niveaux augmentés de plusieurs protéases, sécrétées par des cellules inflammatoires et des cellules épithéliales, ont également été observés chez les patients atteints de BPCO. De tout cela découle que l'accumulation de collagène et d'élastine résultant de la destruction du tissu conjonctif par les protéases est considérée comme une caractéristique importante de l'emphysème pulmonaire. En outre, ces produits de décomposition favorisent la migration des cellules inflammatoires et induisent une inflammation persistante du système respiratoire chez les patients atteints de BPCO, pouvant conduire à une inflammation systémique corrélée à un mauvais pronostic (Agustí et al. 2012).

Par ailleurs, 1 à 5 % des cas de BPCO ont une composante génétique sous-jacente causée par un déficit en alpha 1-antitrypsine. Cette protéine est la principale antiprotéase à sérine responsable de la protection du parenchyme pulmonaire contre l'action des protéases pro-inflammatoires, notamment l'élastase libérée par les polynucléaires neutrophiles lors de l'inflammation.

La régulation du déséquilibre entre les protéases et leurs inhibiteurs a également été proposée en tant que cible thérapeutique dans la BPCO (Dahl et al. 2012; Kuna et al. 2012; Wang et al. 2020).

3) Rôle de l'inflammation

La BPCO se caractérise par une augmentation du nombre de macrophages dans les voies aériennes distales et le parenchyme pulmonaire, ainsi que par une augmentation des neutrophiles activés et des lymphocytes (Di Stefano et al. 1998; Selby et al. 1991; Stănescu et al. 1996). Le nombre de polynucléaires éosinophiles peut également être augmenté chez certains patients (Mulvanny et al. 2022). Ces cellules inflammatoires, ainsi que les cellules épithéliales des voies aériennes agressées libèrent de multiples médiateurs inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8, le leucotriène B4 (LTB4), le MCP-1 et le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α). Ces facteurs chimiotactiques amplifient le processus inflammatoire et induisent des changements structurels. Les concentrations de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires sont augmentées à la fois localement dans les voies aériennes, mais aussi dans le plasma des patients atteints de BPCO (de Boer et al. 2000; Lea et al. 2018; Mulvanny et al. 2022; Tanabe et al. 2015; Traves 2002). L'hypoxie retrouvée dans les cas de BPCO sévères provoque également une sécrétion d'IL-8 par les macrophages alvéolaires (Hirani et al. 2001).

De nombreux facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation des marqueurs de l'inflammation dans la BPCO, parmi lesquels le NF- κ B possède un rôle crucial puisque les gènes codant pour les médiateurs pro-inflammatoires, notamment IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 et TNF- α , sont tous régulés par NF- κ B. Chez les fumeurs et les patients atteints de BPCO, le nombre de cellules épithéliales et de macrophages présentant une augmentation de NF- κ B ainsi que l'expression nucléaire de ce dernier étaient augmentés (Di Stefano et al. 2002; Rajendrasozhan et al. 2010; Yagi, Aoshiba, and Nagai 2006). C'est pourquoi, le développement d'inhibiteurs des récepteurs de cytokines et de chémokines pourrait également représenter une

piste thérapeutique dans la BPCO. Certains médicaments ont déjà montré une efficacité thérapeutique lors d'études *in vivo*, d'autres ont présenté des effets secondaires importants lors des essais cliniques, tandis que d'autres encore sont toujours au stade d'hypothèse dans la prise en charge de la BPCO (Wang et al. 2020).

Actuellement, les mécanismes de cette inflammation exagérée ne sont que partiellement compris. Le déséquilibre des espèces oxydantes/antioxydantes et celui des protéases/antiprotéases est susceptible d'amplifier la signalisation des voies inflammatoires. Ainsi, le mécanisme physiopathologique plurifactoriel de la BPCO rend la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques difficile car l'action sur une seule voie de signalisation cellulaire donne des résultats cliniques insuffisants.

Ainsi, en raison du chevauchement des fonctions des signaux inflammatoires moléculaires dans la BPCO, il est important de proposer une cible thérapeutique impliquée dans plusieurs mécanismes aboutissant à l'apparition de la BPCO.

4) L'hypothèse de la sérotonine

Dans notre laboratoire, nous travaillons sur le rôle de la sérotonine dans diverses pathologies du système cardiovasculaire et du système nerveux central (Ayme-Dietrich et al. 2019; Becker et al. 2021). La sérotonine est une monoamine impliquée dans de nombreux processus biologiques, la complexité de ses activités pharmacologiques étant due à l'existence de 7 classes de récepteurs identifiés (5-HT_R) qui sont couplés à des signalisations intracellulaires différentes (Figure 31).

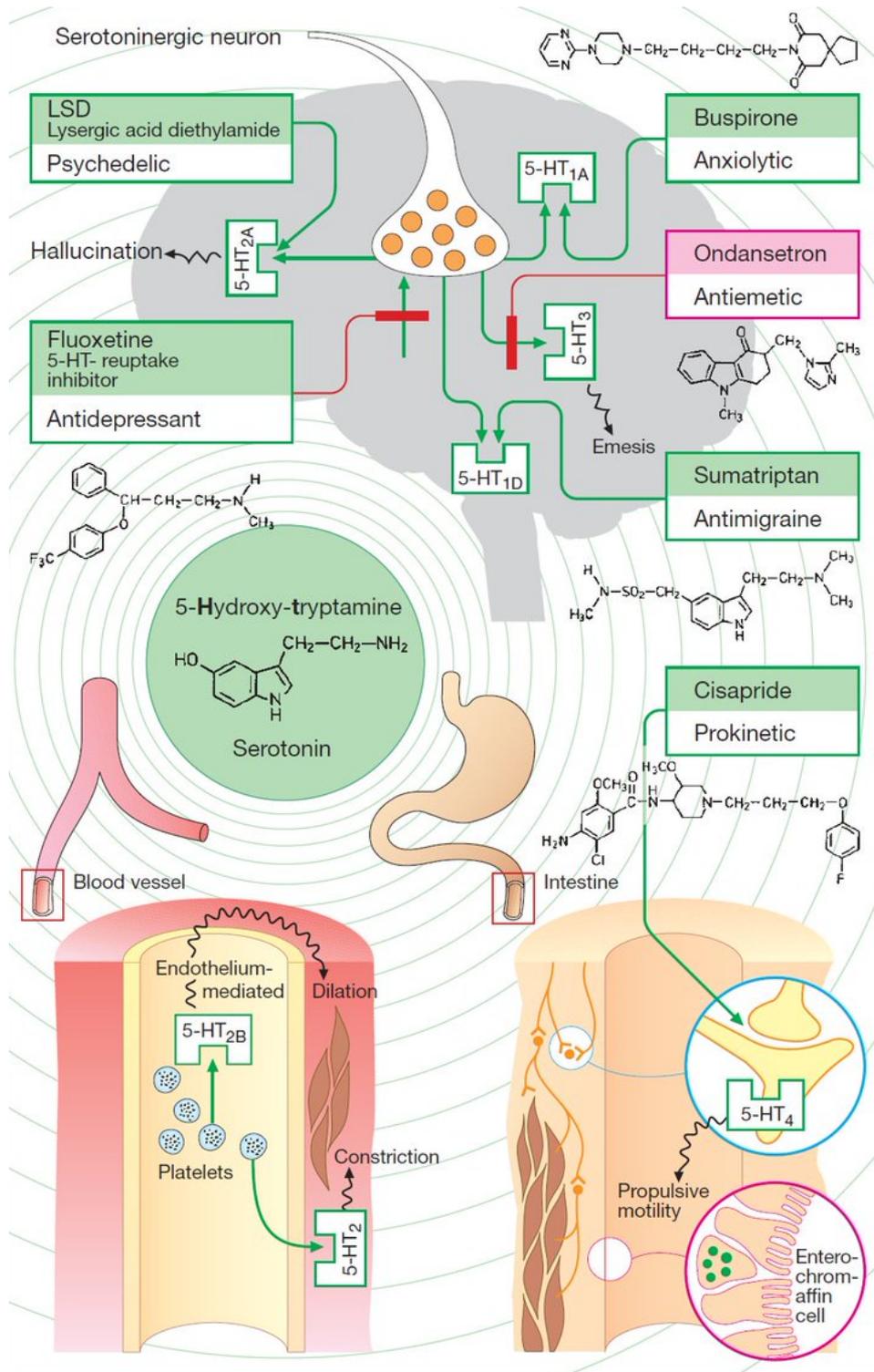


Figure 31 – Récepteurs et actions de la sérotonine. Source : site consulté le 07/10/2022, <https://manualofmedicine.com/>

Entre autres, la sérotonine joue un rôle important dans les fonctions pulmonaires comme le rythme respiratoire ou la vasoconstriction pulmonaire (Hilaire et al. 2010; Morecroft et al. 2005). Par ailleurs, la sérotonine est connue pour être un puissant modulateur immunitaire (Wu

et al. 2019). Les concentrations plasmatiques en sérotonine sont physiologiquement basses en raison de la recapture de la sérotonine plasmatique par les plaquettes (Mercado and Kilic 2010). Cependant, lors d'une agression pulmonaire, le niveau local en sérotonine va augmenter et la sérotonine va réguler la production de cytokines *via* ses récepteurs ou son transporteur SERT (Hart and Block 1989; Lowery, Woulfe, and Kilic 2019; Mann and Oakley 2013). Ainsi, l'altération de la réponse sérotoninergique par ses récepteurs localisés sur diverses cellules immunitaires, peut induire des conditions inflammatoires comme dans certaines maladies inflammatoires de l'intestin ou l'arthrite rhumatoïde (Banskota, Ghia, and Khan 2019; Shajib and Khan 2015). Concernant la BPCO, les concentrations plasmatiques de sérotonine étaient significativement plus élevées chez les patients atteints de BPCO (96,6 ng/mL) que chez les non-fumeurs sains (32,4 ng/mL) ou les anciens fumeurs (41,4 ng/mL) (W. K. W. Lau et al. 2012). Enfin, une morbi-mortalité respiratoire plus importante a été retrouvée chez les patients BPCO traités par des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (Vozoris et al. 2018) et l'hypothèse d'une augmentation de la synthèse et/ou de l'activité de la sérotonine a été évoquée comme piste pouvant expliquer l'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie (Chan and Loscalzo 2008). Néanmoins, aucune preuve moléculaire du rôle physiopathologique de la sérotonine dans la BPCO n'a pu être apportée jusqu'à présent.

Devant les mécanismes inflammatoires et hypoxiques induits par l'exposition à la fumée de cigarette et devant la possibilité de faire un ciblage pharmacologique, la question de l'implication de la sérotonine comme médiateur de la réponse inflammatoire dans la BPCO et dans les pathologies induites par la BPCO est une piste intéressante à explorer. L'exploration de cette piste pourrait révéler de nouveaux marqueurs diagnostiques ou pronostiques et/ou de nouveaux médicaments capables de prévenir ou de ralentir le long processus de dégradation des voies respiratoires dans la BPCO.

III. Objectifs du projet *in vivo*

Les objectifs de ce travail *in vivo* étaient de :

- Valider un modèle murin sensible à l'exposition chronique à la cigarette classique et qui développe une inflammation chronique des voies respiratoires.
- Identifier les conséquences pulmonaires macroscopiques, microscopiques et moléculaires induites par l'exposition à la cigarette classique, avec un focus sur les acteurs du système sérotoninergique.
- Utiliser ce modèle comme contrôle positif pour le comparer à une exposition aux nouveaux ENDS de manière à évaluer les différences d'impacts sur les poumons entre les ENDS et la cigarette classique pour une même exposition à la nicotine.

IV. Choix du modèle animal

Les modèles animaux ont été d'une utilité exceptionnelle pour investiguer les mécanismes de développement de la BPCO lors de l'exposition à la fumée de cigarette puisqu'ils reproduisent fidèlement les caractéristiques critiques de la maladie humaine dans un délai court. Le défi de l'exploration chez l'animal consiste à sélectionner le modèle animal adéquat pour l'induction de la BPCO, l'utilisation d'un appareil correct avec une exposition à la fumée de cigarette validée selon le nombre de cigarettes et la durée de l'exposition.

Généralement, les animaux sont exposés à la fumée de cigarette dans une machine génératrice de fumée selon une des deux modalités suivantes : l'exposition « nose-only » mime le tabagisme actif, alors que l'exposition « whole-body » correspond davantage au tabagisme passif.

Selon la configuration de l'appareillage et les cigarettes utilisées, la fumée de cigarette peut être filtrée en amont de l'exposition des animaux. En règle générale, des cigarettes de qualité

recherche sont utilisées, ce qui permet de normaliser leur contenu en nicotine et en goudrons. Les cigarettes normalisées proviennent le plus souvent de l'Université de Kentucky (<http://www.ca.uky.edu/refcig/>, site consulté le 07/10/2022).

Une étape cruciale représente le choix du modèle animal puisque les différentes espèces animales ont des sensibilités variables à la fumée de cigarette, et ces sensibilités peuvent même être particulières à chaque souche au sein d'une même espèce. Dans la littérature, de nombreuses espèces ont été utilisées, notamment les rongeurs, les cobayes, les chiens, les singes et les moutons (Abraham 2008; Chapman 2008; Heck et al. 2002; Wang et al. 2008; Wright and Churg 1990). Cependant, devant la grande variété de lignées existantes, la possibilité de modification génétique, l'abondance de réactifs moléculaires et immunologiques, ainsi que les coûts d'entretien relativement faibles, le modèle murin a été le plus choisi pour étudier la physiopathologie de la BPCO.

L'ensemble des procédures *in vivo* ont été réalisées sur des souris C57bl/6, cette lignée murine apparaît sensible à la fumée de tabac et est la plus utilisée, dans la littérature, comme modèle de BPCO et d'emphysème induit par le tabagisme (Leberl, Kratzer, and Taraseviciene-Stewart 2013). Différentes caractéristiques décrites dans la BPCO ont été retrouvées après exposition de ces souris au tabac, comme l'inflammation pulmonaire chronique, l'infiltration de cellules inflammatoires dans le parenchyme pulmonaire, l'augmentation des marqueurs de l'inflammation, le remodelage des voies respiratoires et l'élargissement des espaces alvéolaires traduisant la présence d'emphysème (D'hulst et al. 2005; Leberl et al. 2013; K. M. Lee et al. 2018).

V. Étude pilote : Exposition des souris à la fumée de cigarette classique selon un régime « normal » d'exposition en vue d'obtenir une inflammation pulmonaire chronique

1) Schéma expérimental de l'étude

Lors de l'étude pilote, 24 souris (femelles C57bl/6, âgées de 8 semaines au début de l'expérimentation) ont été randomisées en 2 groupes : un groupe exposé à la cigarette classique (12 souris) et un groupe exposé à l'air ambiant qui sert de groupe contrôle (12 souris). Le protocole d'exposition repose sur une durée d'exposition de 4 semaines suivi du sacrifice de la totalité des animaux à la fin de cette période.

2) Le protocole d'exposition

L'exposition s'est faite de manière progressive, afin d'habituer les souris à la fumée de cigarette (Figure 32) :

- La première semaine : le premier jour, les souris ont été exposées pendant 10 min et chaque jour ont été ajoutées 10 minutes supplémentaires d'exposition à la fumée de cigarette classique avec 10 min de ventilation entre chaque séquence d'exposition à la fumée, pendant 5 jours successifs.
- La deuxième semaine : les souris ont été exposées 2 x 40 minutes avec 40 minutes de ventilation entre les 2 séquences et ceci 5 jours sur la semaine.
- La troisième et la quatrième semaine : les souris ont été exposées 2 x 60 minutes avec 60 minutes de ventilation entre les 2 séquences et ceci 5 jours par semaine.

<i>Jour 1</i>		≈ 1 cigarette/jour						
<i>Jour 2</i>			≈ 2 cigarettes/jour					
<i>Jour 3</i>				≈ 3 cigarettes/jour				
<i>Jour 4</i>					≈ 4 cigarettes/jour			
<i>Jour 5</i>						≈ 5 cigarettes/jour		
<i>Jour 6</i>							≈ 6 cigarettes/jour	
<i>Jour 7</i>								≈ 7 cigarettes/jour
<i>Semaine 2</i>			40 min				≈ 8 cigarettes/jour	
<i>Semaines 3 et 4</i>			60 min				≈ 14 cigarettes/jour	

Figure 32 – Protocole d'exposition progressif des souris à la fumée de cigarette dans l'étude pilote incluant 24 souris réparties dans 2 bras expérimentaux (12 souris exposées à la fumée de cigarette classique et 12 souris exposées à l'air ambiant)

Les souris du groupe expérimental « cigarette classique » ont été exposées à la fumée par une méthode dite « nose-only », en respectant le protocole WHO de régime d'exposition « normal » selon les recommandations ISO (ISO 3308:2012). Dans ce régime d'exposition, des inhalations de 2 secondes et d'un volume de 35 mL sont effectuées toutes les 60 secondes, sans modification préalable du filtre de la cigarette. Les souris du groupe contrôle ont été exposées par la même méthode « nose-only » à l'air ambiant ventilé sur une tour d'exposition jamais utilisée avec de la fumée. Les cigarettes de référence pour la recherche (3R4F, Kentucky) ont été utilisées. La machine génératrice de fumée (InExpose system, EMKA technologies) permet une inhalation uniquement par le museau de la souris et une exposition simultanée et identique de 12 souris par groupe (Figure 33). Une tour d'exposition différente est réservée pour chaque groupe expérimental de manière à éviter les contaminations.



Figure 33 – Machine d'exposition InExpose system (EMKA technologies) permettant une exposition à la fumée de cigarette classique en mode « nose-only ». Les flèches indiquent l'emplacement des souris. Des filets de contention pour souris sont fixés sur une tour avec des orifices individuels permettant la distribution équivalente de la fumée à chaque souris exposée.

3) Résultats de l'étude pilote

a) Suivi de l'état général et du poids des souris

L'état de santé général des souris a été suivi tout au long des semaines. Il a consisté à suivre le poids (lundi et vendredi de chaque semaine), la vie en groupe, la présence de blessures par morsure ou d'autres lésions externes. La mortalité et la morbidité dans chaque groupe ont été relevées tous les jours. La Figure 34 illustre la variation du poids des 2 groupes expérimentaux pendant le mois d'expérimentation (Figure 34). Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence sur le mois d'exposition. Une souris du groupe contrôle est morte à J5 à cause d'une dislocation cervicale dans l'appareil d'exposition.

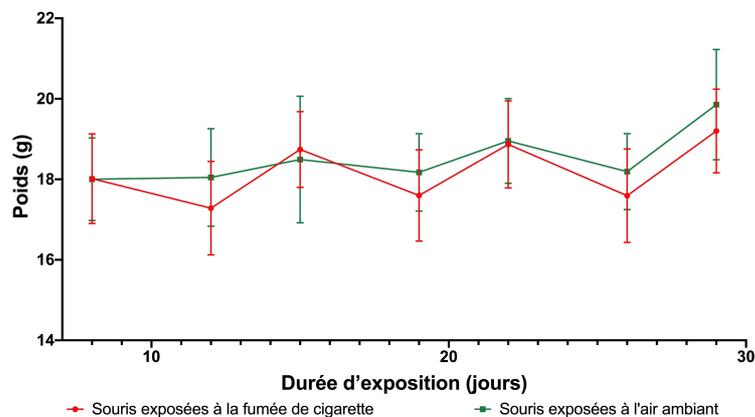


Figure 34 – Variation du poids au cours du mois d'exposition par groupe expérimental (n = 12 souris par groupe en début d'expérimentation).

b) Résultats de l'exploration fonctionnelle respiratoire en fin d'expérimentation

L'exploration fonctionnelle respiratoire a été faite par pléthysmographie non-invasive sur souris conscientes, en respiration spontanée (Flexivent system, Scireq) après provocation des bronches à des concentrations croissantes de méthacholine. La méthacholine est un analogue β -méthylé de l'acétylcholine qui agit comme agoniste non sélectif des récepteurs muscariniques et mime les effets du système nerveux parasympathique. Le muscle lisse bronchique contient une importante innervation cholinergique avec présence des récepteurs M2 et M3.

Parmi les paramètres mesurés par la pléthysmographie non-invasive, le PENH (« *enhanced pause* » ou pause améliorée) est un indicateur de la résistance bronchique associée à la bronchoconstriction (Lomask 2006). Plus les concentrations de méthacholine augmentent, plus elle se fixe sur ses récepteurs, plus la bronchoconstriction est importante et plus le PENH augmente. Les souris du groupe contrôle répondent à la méthacholine pour des concentrations basses, l'effet maximal est atteint après 0,2 M de méthacholine, puis il y a un plateau et une diminution de la réponse (Figure 35 (A)). Cette courbe s'explique par une fixation rapide de la méthacholine sur ses récepteurs, puis leur saturation et pour finir, leur désensibilisation pour les concentrations les plus fortes de méthacholine. En revanche, dans le groupe expérimental exposé à la fumée de cigarette, les récepteurs de la méthacholine semblent être moins présents ou moins disponibles à la fixation de la méthacholine ou leur voie de couplage modifiée, entraînant un effet décalé vers la droite et une hyperréactivité bronchique plus importante après nébulisation de 0,4 M de méthacholine ($p < 0,05$). La figure 35(B) illustre les variations du PENH à 4 minutes post-nébulisation de sérum physiologique (0 mol/L) et de concentrations croissantes de méthacoline (0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 mol/L). L'analyse par RT-qPCR des récepteurs de la méthacholine dans les deux groupes apportera des informations supplémentaires sur une possible modification de leur expression génique.

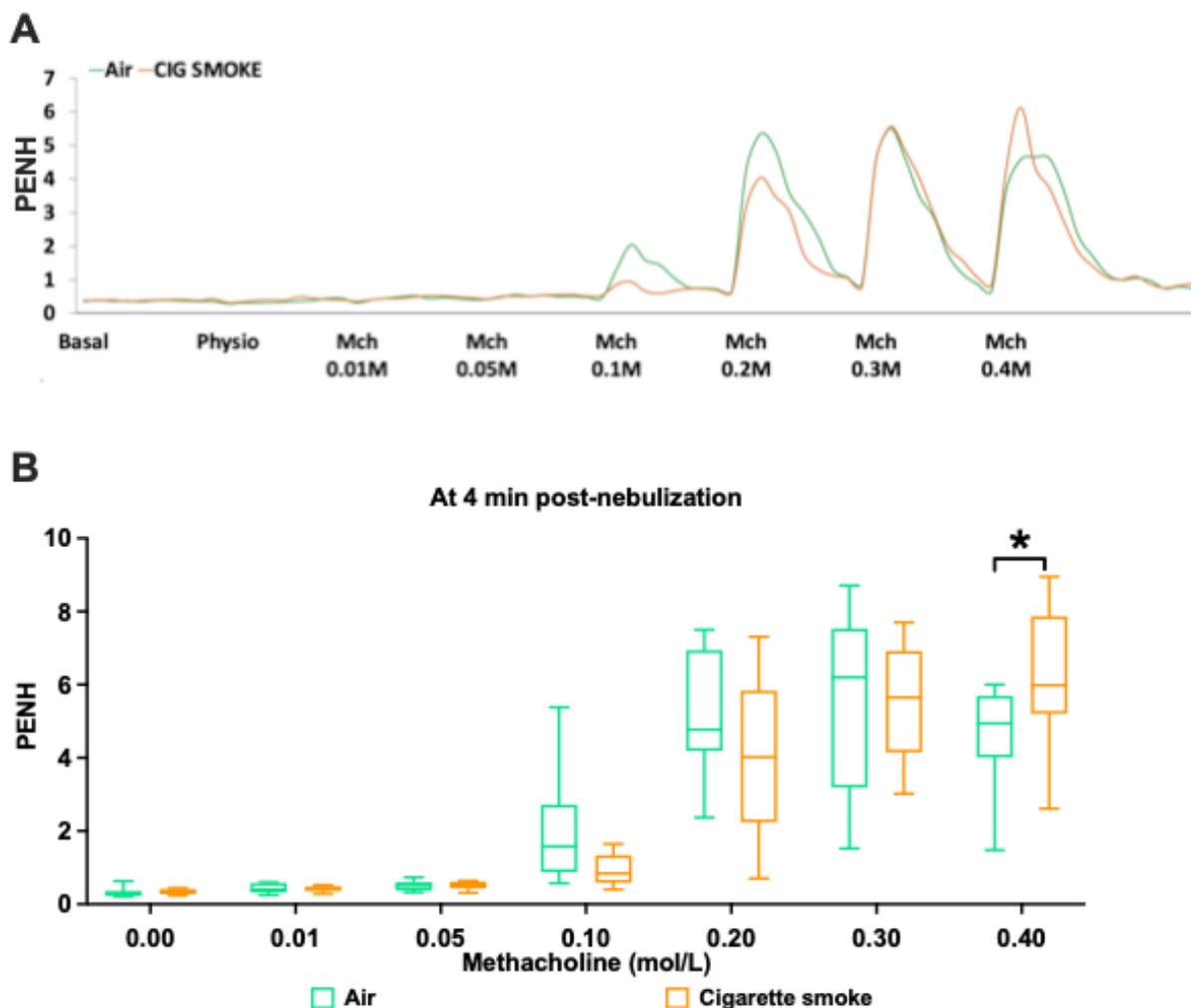


Figure 35 – (A) Évolution du PENH au cours du temps après nébulisation de solutions de méthacholine à des concentrations croissantes (0,01 à 0,4 M). (B) Effet des différentes concentrations de méthacholine sur le PENH à 4 minutes post-nébulisation. Analyse statistique : comparaison des moyennes de PENH obtenues dans les 2 groupes après chaque nébulisation par test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05\%$; $n_{\text{groupe contrôle}} = 11$; $n_{\text{groupe fumée}} = 12$. * $p < 0,05$.

c) Résultats des études moléculaires et tissulaires

i. Dosage de la sérotonine sanguine

Le sang total a été prélevé sur tube hépariné après ponction intra-cardiaque. Afin d'éviter l'oxydation de la sérotonine, le sang est rapidement transféré dans des tubes contenant de l'acide ascorbique, puis conservé à -20°C jusqu'à analyse par chromatographie liquide de haute performance couplée à une détection spectrofluorimétrique. La figure 36 montre les concentrations de sérotonine obtenues dans le sang total pour les deux groupes expérimentaux. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les deux groupes après un mois d'exposition.

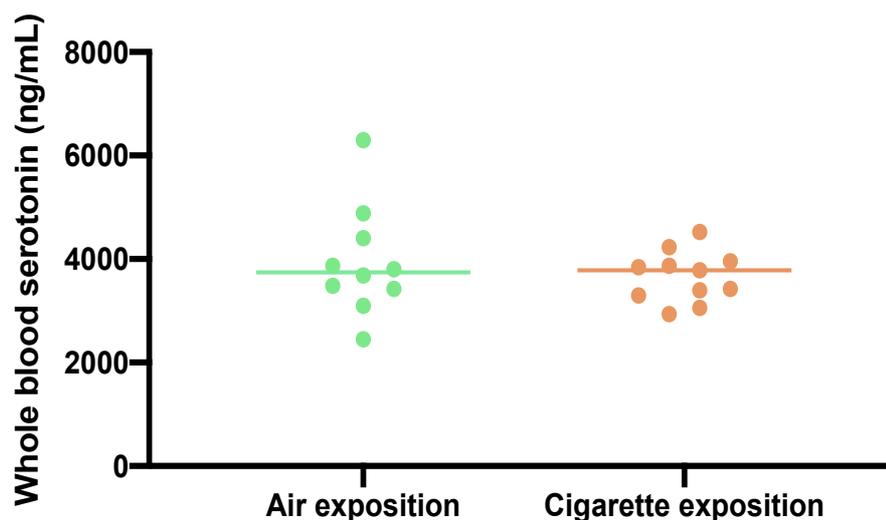


Figure 36 – Concentration de sérotonine sanguine dans les deux groupes expérimentaux. Les résultats obtenus par chromatographie liquide de haute performance couplée à une détection spectrofluorimétrique n'ont pas montré de différence entre les 2 groupes de souris. Analyse statistique : test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$; $n_{\text{groupe contrôle}} = 11$; $n_{\text{groupe fumée}} = 12$.

ii. Comptage des cellules immunitaires dans le liquide broncho-alvéolaire

Le comptage des globules blancs totaux (GBT) dans le liquide broncho-alvéolaire (LBA) a été réalisé grâce à un analyseur d'hématologie (Advia 120, Siemens). Malgré une tendance à l'augmentation du nombre de GBT dans le groupe de souris exposé à la cigarette classique, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les deux groupes expérimentaux ($p = 0,1182$). L'analyse des populations cellulaires par cytométrie de flux (BD Biosciences LSRII) n'a également pas montré de différence significative entre les deux groupes expérimentaux, que ce soit pour les macrophages ($p = 0,7294$), les polynucléaires neutrophiles ($p = 0,3037$), les lymphocytes totaux ($p = 0,8394$), les lymphocytes T ($p = 0,2396$) ou les lymphocytes B ($p = 0,8810$) (Figure 37).

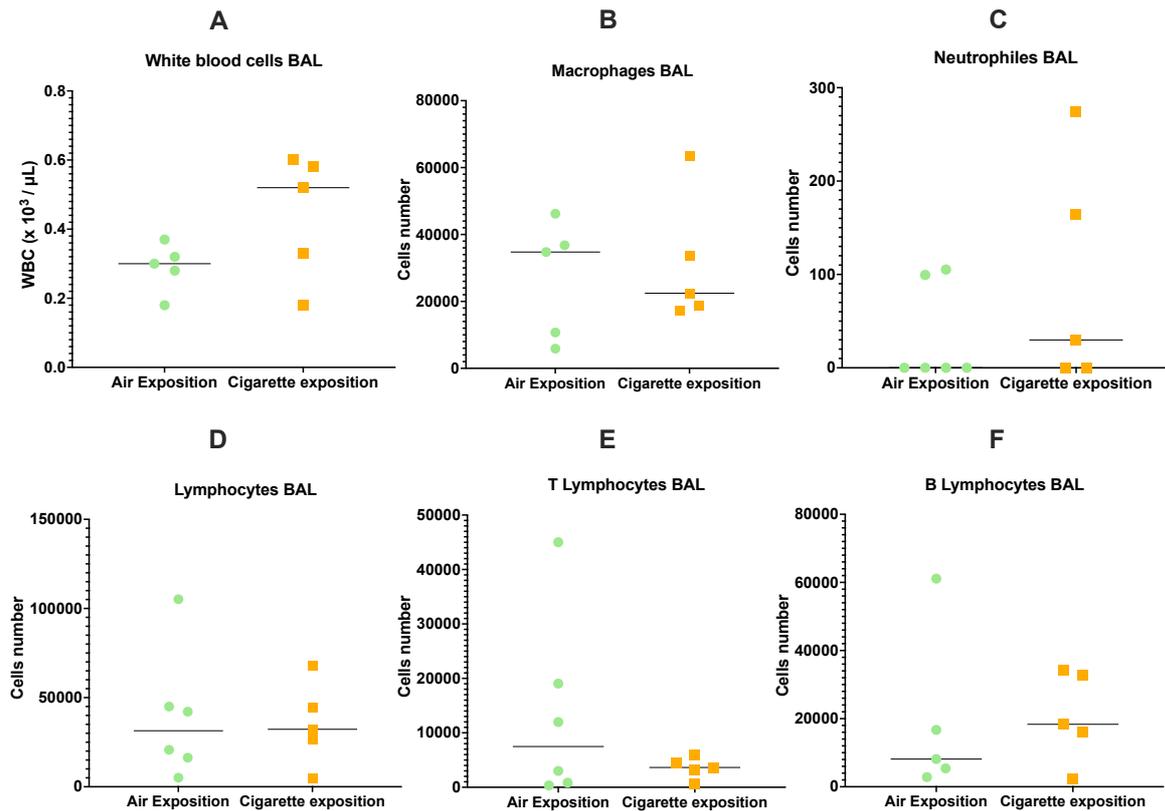


Figure 37 – Analyse des cellules immunitaires retrouvées dans le LBA des souris des 2 groupes expérimentaux (groupe contrôle en vert et groupe exposé à la fumée de cigarette en orange). Les populations cellulaires mesurées sont (A) les globules blancs totaux, (B) les macrophages, (C) les polynucléaires neutrophiles, (D) les lymphocytes totaux, (E) les lymphocytes T et (F) les lymphocytes B. Analyse statistique : comparaison des moyennes de chaque groupe par test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$; $n_{\text{groupe contrôle}} = 6$; $n_{\text{groupe fumée}} = 5$.

iii. L'analyse moléculaire : Quantification des ARN_m par RT-qPCR

Les poumons des 3 souris de chaque groupe expérimental ont été retirés, mis dans de l'azote liquide et utilisés pour des analyses biomoléculaires. L'ARN a été extrait avec du TRIzol puis la quantification des niveaux de l'ARN_m des métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9), des récepteurs muscariniques périphériques (M1, M2 et M3), des marqueurs de l'inflammation comme le récepteur aux produits de la glycation avancée (RAGE), de l'apoptose (ratio bax/bcl2) (Figure 38), des récepteurs sérotoninergiques, de SERT et de TPH-1 a été faite par RT-qPCR (Figure 39). Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les deux groupes expérimentaux quel que soit le marqueur analysé, principalement à cause d'un très faible nombre d'individus par groupe.

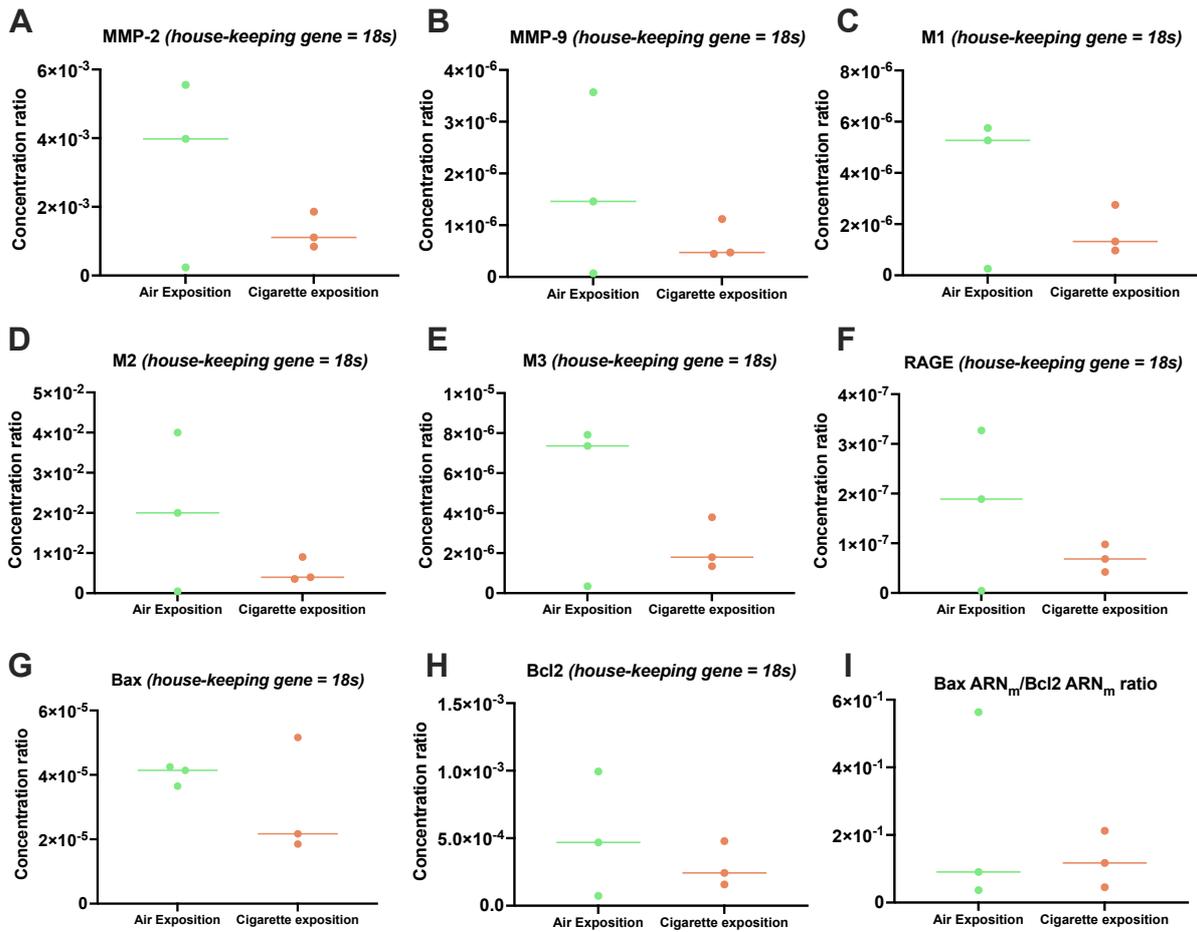


Figure 38 – Résultats des modifications de l'expression d'ARN_m pulmonaires obtenus par RT-qPCR. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les médianes dans les 2 groupes expérimentaux pour (A) MMP-2, (B) MMP-9, les récepteurs muscariniques périphériques (C) M1, (D) M2 et (E) M3, (F) le marqueur RAGE, les marqueurs apoptotiques (G) bax, (H) bcl2 et (I) le ratio bax/bcl2 ($p > 0,05$). Analyse statistique : test non-paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney avec $\alpha = 0,05$ et $n = 3$ par groupe expérimental.

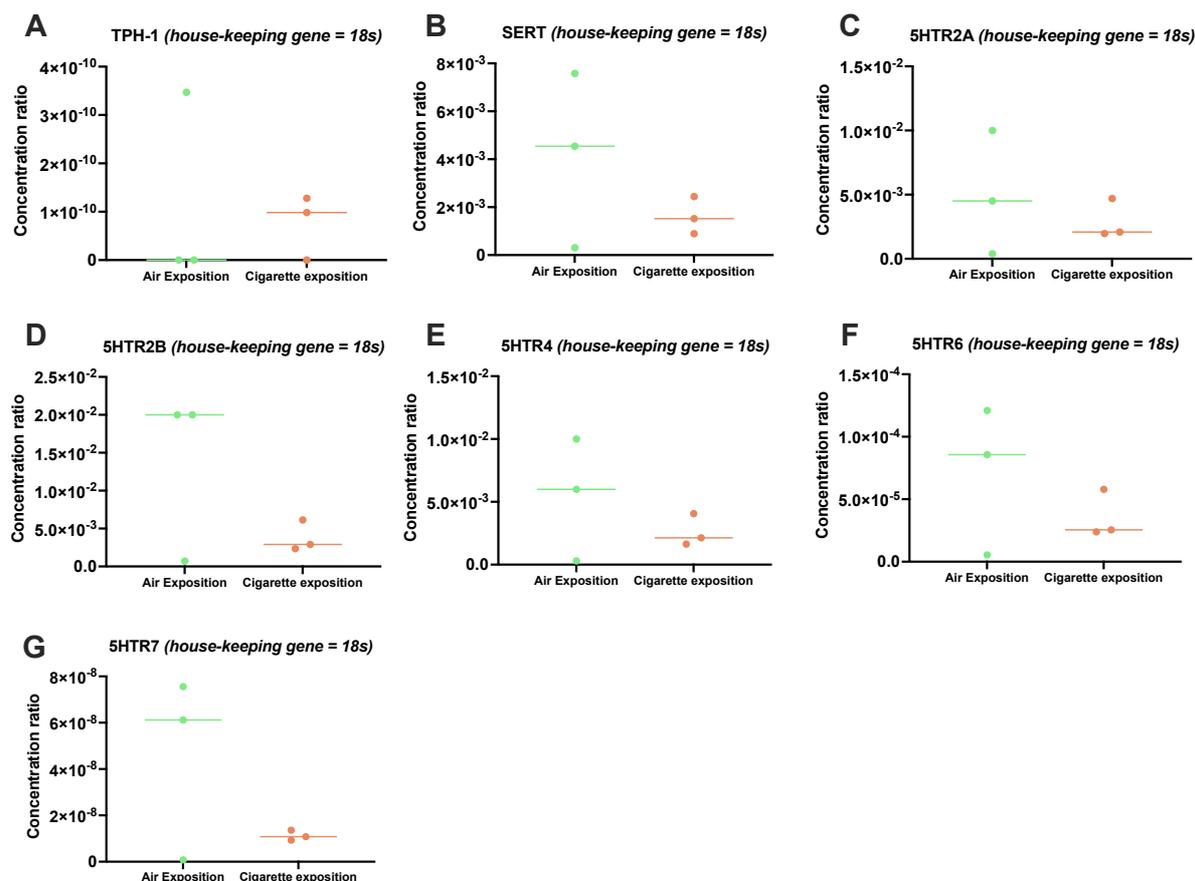


Figure 39 – Résultats des modifications de l’expression d’ARN_m pulmonaires obtenus par RT-qPCR. Aucune différence n’a été mise en évidence entre les médianes dans les 2 groupes expérimentaux pour les marqueurs du système sérotoninergique : (A) l’enzyme TPH-1, (B) le transporteur de recapture de la sérotonine SERT, les récepteurs (C) 5-HTR2A, (D) 5-HTR2B, (E) 5-HTR4, (F) 5-HTR6, (G) 5-HTR7, $p > 0,05$. Analyse statistique : test non-paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney avec $\alpha = 0,05$ et $n = 3$ par groupe expérimental.

d) Analyse d’histophysiopathologie

Les poumons entiers de 3 souris par groupe ont été imprégnés au paraformaldéhyde *in situ*, puis retirés, mis dans le paraformaldéhyde et inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 μm des poumons entiers ont été effectuées puis ces coupes ont été colorées à l’hématoxyline-éosine pour identifier un éventuel remodelage des voies respiratoires et la présence d’emphysème pulmonaire. Aucune différence n’a été mise en évidence entre les deux groupes expérimentaux.

4) Conclusions de l’étude pilote du projet *in vivo*

Les résultats obtenus pour l’étude pilote ont permis de montrer que les souris exposées à la cigarette classique pendant 1 mois présentent une courbe de réactivité bronchique après

instillation de méthacholine décalée vers la droite, mais sans qu'un remodelage des voies respiratoires ne puisse être mis en évidence. Malheureusement, la durée et/ou l'intensité d'exposition n'ont pas été suffisantes pour obtenir un modèle d'inflammation chronique pulmonaire chez la souris.

Dans la deuxième partie de ce projet *in vivo*, nous avons réalisé une étude des effets de l'exposition des souris femelles C57bl/6 à la fumée de cigarette classique selon un mode d'exposition plus intense.

VI. Étude principale : Exposition des souris à la fumée de cigarette classique selon un régime intense d'exposition en vue d'obtenir une inflammation pulmonaire chronique

1) Schéma expérimental de l'étude

Avant la mise en place de l'étude principale, plusieurs modèles murins d'inflammation pulmonaire ont été passés en revue afin d'adapter au mieux le protocole initial d'exposition à nos besoins (Tableau X) (Austin, Miller, and Vlahos 2019; Lee et al. 2014; K. M. Lee et al. 2018; Murray et al. 2017; Valença et al. 2004). Le modèle expérimental de Lee et ses collaborateurs a été choisi pour la suite de ce projet car c'est celui qui est le plus proche de nos conditions expérimentales (nose-only, exposition 5 jours/semaine) (K. M. Lee et al. 2018).

Tableau X – Modèles expérimentaux décrits dans la littérature permettant de développer une inflammation pulmonaire à la suite d'une exposition à la fumée de cigarette classique.

Référence	Cellules immunitaires (LBA)	Cytokines (LBA)	Protocole d'exposition
Valença, 2008 <i>Whole-body exposure</i>	↗ Macrophages à J10, J20, J30 et J60 ↗ MMP-12, TIMP-2	↗ TNF- α et IL-6 à partir de J10	3 cigarettes x 3/j (9 cigarettes/jour), 7 j/semaine, 10, 20, 30 ou 60 jours
Lee, 2014 <i>Whole-body exposure</i>	↗ Macrophages, Neutrophiles et Lymphocytes à S2	↗ TNF- α , IL-6 et KC à S2	5 cigarettes x 4/j (20 cigarettes/j), 30 min de pause entre séances, 6 j/semaine, 2 semaines

Murray, 2017 <i>Whole-body exposure</i>	↗ Macrophages, Neutrophiles et Lymphocytes à J19	↗ TGFβ1, GSK3β et coll1α1 à J19	10 cigarettes sans filtre x 2/j (20 cigarettes/j), 7 j/semaine, 18 jours
Lee, 2018 <i>Nose-only exposure</i>	↗ Macrophages, Neutrophiles et Lymphocytes à S3	↗ IP-10, MIP-1b	4 heures/j, 5 j/semaine, 3 semaines 5 jours d'acclimatation
Austin, 2019 <i>Whole-body exposure</i>	Pas d'effet sur les macrophages à S2 ↗ Macrophages, Neutrophiles et Lymphocytes à S8 et S12	-	9 cigarettes/j, 5 j/semaine, 2, 8 et 12 semaines

2) Protocole d'exposition

Un total de 24 souris (femelles C57bl/6Nhsd âgées de 12 semaines au début de l'exposition) a été randomisé en 2 groupes : un groupe exposé à la fumée de cigarette classique (12 souris) et un groupe contrôle exposé à l'air ambiant (12 souris). Le protocole d'exposition a une durée de 3 semaines et le sacrifice de la totalité des animaux est réalisé à la fin de cette période. La première semaine, l'exposition s'est faite de manière progressive (0,5 ; 1 ; 2 ; 3 et 4 heures pour les jours 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5, respectivement) afin d'acclimater les souris à la fumée de cigarette classique (Figure 40).

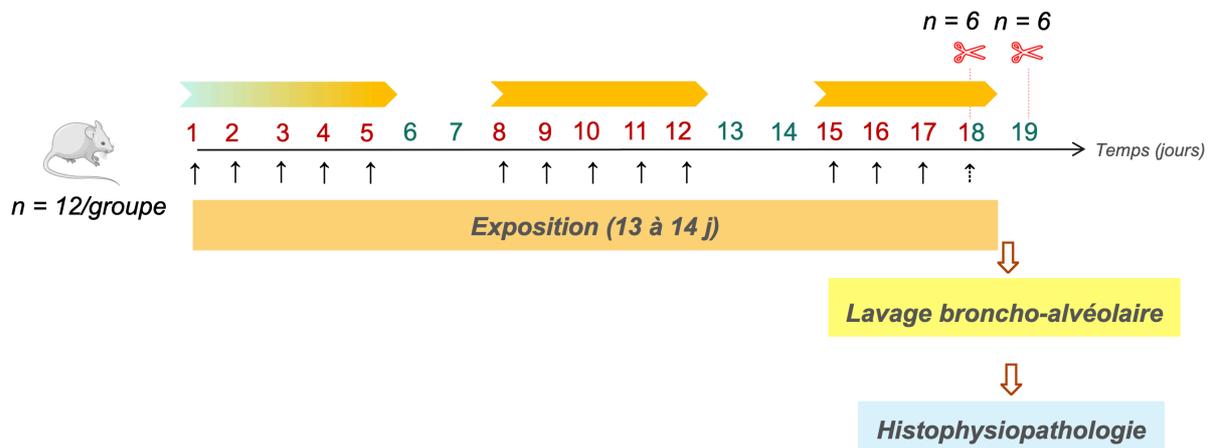


Figure 40 – Illustration du modèle expérimental implanté pour l'étude principale d'exposition des souris à la fumée de cigarette classique.

Les souris du groupe expérimental « cigarette classique » ont été exposées à la fumée par une méthode « nose-only », en respectant le protocole Health Canada (1999) de régime d'exposition « intense ». Ce régime d'exposition consiste en des inhalations de 2 secondes et un volume de 55 mL effectuées toutes les 30 secondes, avec 8 puffs par cigarette et sans modification

préalable du filtre de la cigarette (Tableau XI). Les souris du groupe contrôle ont été exposées en parallèle par la méthode « nose-only » à l'air ambiant ventilé sur une autre tour d'exposition. La nouvelle référence des cigarettes de l'université de Kentucky a été utilisée (1R6F, Kentucky).

Tableau XI – Protocole d'exposition avec le nombre de cigarettes prévues par le protocole de Lee et al., 2018.

Jour 1	8 cigarettes – 30 minutes
Jour 2	15 cigarettes – 60 minutes
Jour 3	30 cigarettes – 120 minutes
Jour 4	45 cigarettes – 180 minutes
Jour 5	60 cigarettes – 240 minutes
Semaine 2 et 3	60 cigarettes/jour soit 240 minutes (4 heures)

3) Résultats de l'étude principale

a) Suivi de l'état général et du poids

L'état de santé général des souris a été suivi tout au long des semaines. Il a consisté à suivre le poids (lundi et vendredi), la vie en groupe, la présence de blessures par morsure ou d'autres lésions externes. La figure 41 illustre la variation du poids des animaux (Figure 41(A)) et le poids des poumons le jour du sacrifice (Figure 41(B)) dans les 2 groupes expérimentaux. Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les deux groupes pour ces deux paramètres.

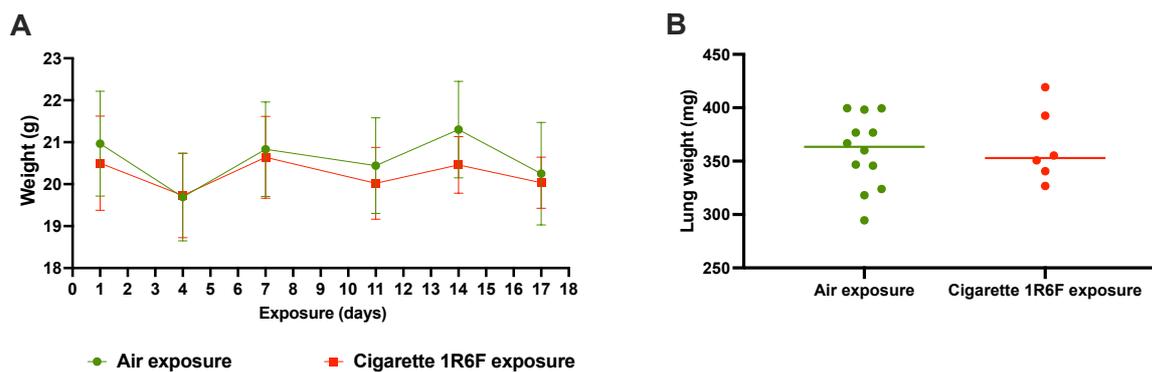


Figure 41 – (A) Suivi du poids des animaux dans les deux groupes expérimentaux sur la durée de l'étude. Malgré une tendance à des poids plus faibles chez les souris exposées à la fumée de cigarette 1R6F, aucune différence n'a été identifiée entre les deux groupes d'exposition. (B) Poids des poumons le jour du sacrifice. Analyse statistique : comparaison des moyennes de chaque groupe par test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$; $n_{\text{groupe contrôle}} = 12$; $n_{\text{groupe fumée}} = 6$.

La mortalité et la morbidité dans chaque groupe ont été suivies tous les jours. Des souris du groupe exposé à la fumée de cigarette étaient léthargiques après l'exposition quotidienne, mais toutes les activités de la vie courante sont revenues à la normale 2 heures après la remise en cage des souris. Deux souris du groupe exposé à la cigarette classique sont mortes à J4 pendant l'exposition. A partir du 5^{ème} jour d'exposition, le protocole d'exposition a été réadapté comme le montre le tableau suivant en raison d'une suspicion de toxicité de la fumée trop importante (Tableau XII) :

Tableau XII – Protocole d'exposition avec ajustement du nombre de cigarettes consommées à partir du 5^{ème} jour d'exposition.

Jour 1	8 cigarettes – 30 minutes
Jour 2	15 cigarettes – 60 minutes
Jour 3	30 cigarettes – 120 minutes
Jour 4	45 cigarettes – 180 minutes
Jour 5	16 cigarettes (64 minutes) – pause 3H – 16 cigarettes (64 minutes)
Semaine 2 et 3	16 cigarettes (64 minutes) – pause 3H – 16 cigarettes (64 minutes)

Au 15^{ème} jour d'exposition, 4 autres souris du groupe exposé à la fumée de cigarette classique sont mortes pendant l'exposition. A partir du 16^{ème} jour, le protocole a été de nouveau adapté en diminuant le nombre de cigarettes par deux et en passant au régime « normal » d'exposition

avec une inhalation par minute (Tableau XIII). Ce régime normal d'exposition a été mieux toléré par les souris.

Tableau XIII – Protocole d'exposition avec ajustement du nombre de cigarettes consommées à partir du 16^{ème} jour d'exposition avec passage à une exposition selon un régime normal (ISO 3308:2012)

Jour 1	8 cigarettes – 30 minutes
Jour 2	15 cigarettes – 60 minutes
Jour 3	30 cigarettes – 120 minutes
Jour 4	45 cigarettes – 180 minutes
Jour 5	16 cigarettes (64 minutes) – pause 3H – 16 cigarettes (64 minutes)
Semaine 2	16 cigarettes (64 minutes) – pause 3H – 16 cigarettes (64 minutes)
Semaine 3	8 cigarettes (64 minutes) – pause 3H – 8 cigarettes (64 minutes) selon un régime normal d'exposition

b) Niveaux d'exposition des souris à la fumée de cigarette classique

La concentration moyenne en particules contenues dans la fumée lors de l'exposition des souris a été calculée à J4 et à la fin de la deuxième semaine à partir de la masse recueillie sur des filtres placés à différents emplacements du système d'exposition et du volume total de fumée produit. L'homogénéité de la répartition des concentrations de particules présentes dans la fumée a été déterminée en déposant des filtres de façon aléatoire au niveau des deux étages de la tour d'exposition.

Ainsi, l'exposition selon le régime intense a produit en moyenne $736 \pm 44 \mu\text{g}$ et $985 \pm 94 \mu\text{g}$ de particules/L de fumée produite à J4 et à la fin de la deuxième semaine, respectivement.

c) Les études moléculaires et tissulaires

i. Comptage des cellules immunitaires dans le liquide broncho-alvéolaire

Le comptage des GBT dans le LBA a permis de mettre en évidence une augmentation des GBT dans le groupe exposé à la fumée de cigarette classique par rapport au groupe exposé à l'air ($p = 0,0001$). L'analyse des populations des cellules immunitaires par cytométrie en flux a

montré une augmentation significative des macrophages ($p = 0,0038$), des polynucléaires neutrophiles ($p = 0,0006$), des lymphocytes T ($p = 0,0011$) et des polynucléaires éosinophiles ($p = 0,0030$). En revanche, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes pour les lymphocytes B (Figure 42).

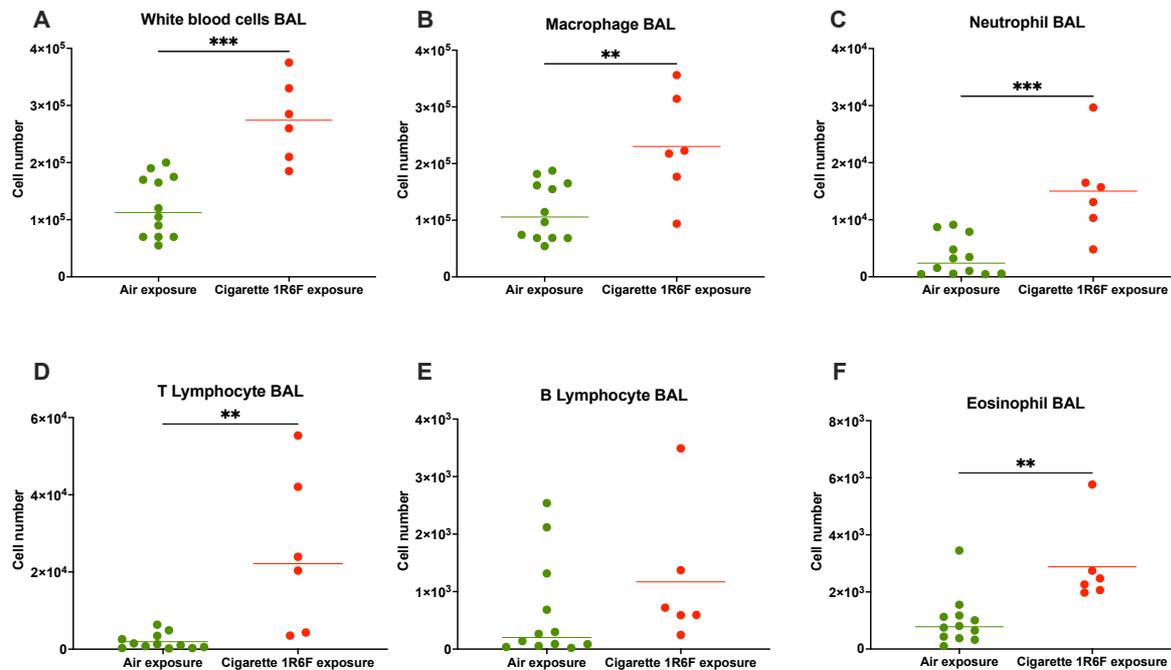


Figure 42 – Analyse des cellules immunitaires retrouvées dans le LBA des 2 groupes (exposé à l'air en vert et exposé à la fumée de cigarette en rouge). Les populations cellulaires analysées sont (A) les globules blancs totaux, (B) les macrophages, (C) les polynucléaires neutrophiles, (D) les lymphocytes T, (E) les lymphocytes B et (F) les polynucléaires éosinophiles. Analyse statistique : comparaison des moyennes obtenues dans les 2 groupes par test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$ % ; $n_{\text{groupe contrôle}} = 12$; $n_{\text{groupe fumée}} = 6$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

ii. Dosage des cytokines et chémokines dans le lavage broncho-alvéolaire

Le dosage de 6 cytokines et chémokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-33, IL-10 et MCP-5) dans le LBA, effectué en duplicata par une technique ELISA, n'a pas permis de montrer de différence de profil cytokinique entre les souris exposées à la cigarette classique et les souris exposées à l'air (Figure 43).

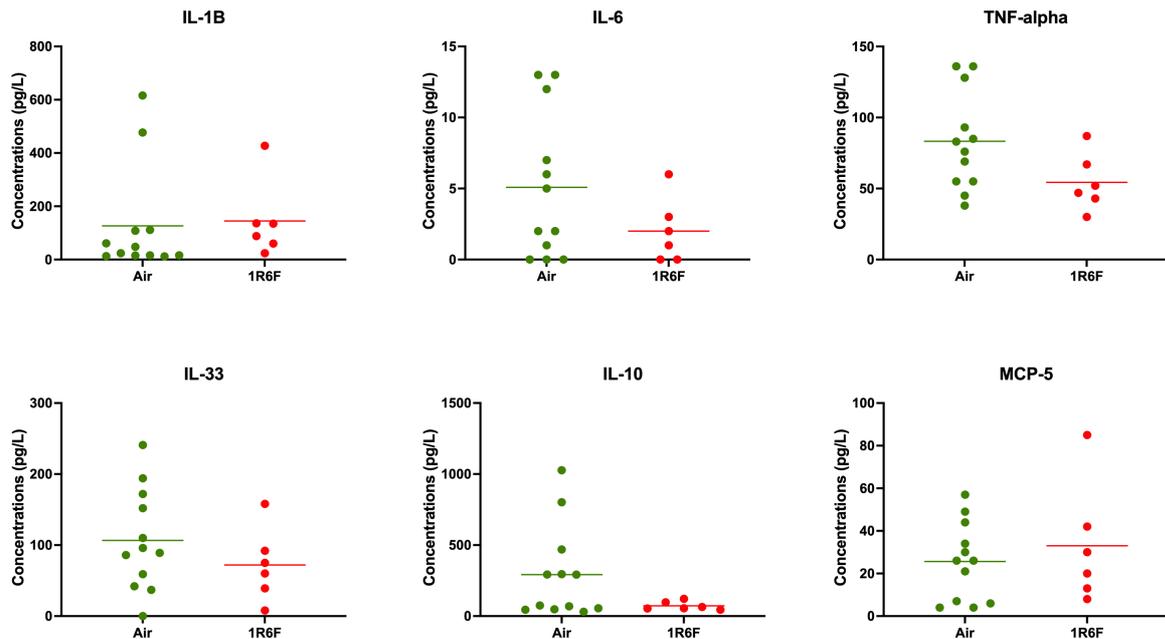


Figure 43 – Dosage d'un panel de cytokines et chémokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-33, IL-10 et MCP-5) dans le lavage broncho-alvéolaire des souris exposées à l'air et à la fumée de cigarette classique 1R6F. Analyse statistique : comparaison des moyennes obtenues dans les 2 groupes par test de Student pour échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$; n groupe contrôle = 12 ; n groupe fumée = 6.

iii. Analyse histologique des poumons

Les poumons entiers des souris ont été fixés au paraformaldéhyde puis inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 μm des poumons entiers ont été colorées à l'hématoxyline-éosine pour identifier un éventuel remodelage des voies respiratoires. Sur les coupes de poumons de souris exposées à la fumée de cigarette classique, un élargissement des espaces alvéolaires est visible, avec des parois des alvéoles rompues évocatrices d'un emphysème pulmonaire (Figure 44).

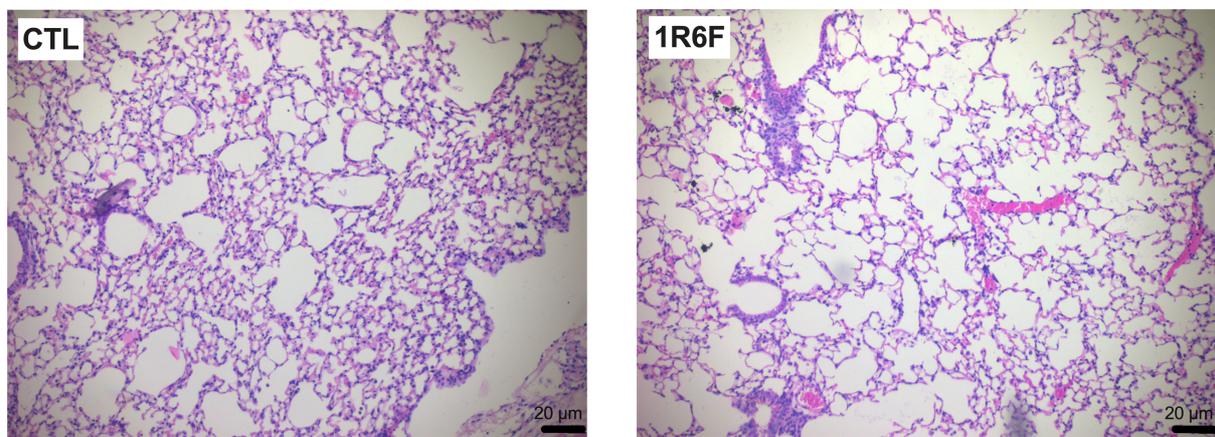


Figure 44 – Coupes histologiques de poumons de souris du groupe contrôle (CTL) exposé à l'air et du groupe exposé à la fumée de cigarette de référence (1R6F). Les coupes colorées à l'hématoxyline (noyaux) et à l'éosine (cytoplasme) montrent un élargissement des espaces alvéolaires et une rupture des alvéoles. Ces éléments sont caractéristiques d'un emphysème se développant dans le groupe de souris exposées à la fumée de cigarette.

VII. Discussion

Dans cette partie du projet, un modèle d'inflammation pulmonaire chronique à la suite d'une exposition à la fumée de cigarette classique a été développé afin qu'il puisse être utilisé par la suite comme témoin positif lors d'expositions aux systèmes électroniques délivrant de la nicotine. Les résultats de la première étude effectuée lors de ce projet *in vivo* ont montré une tendance à l'augmentation pour certaines cellules de l'inflammation, mais la durée et/ou l'intensité de l'exposition n'ont pas été suffisantes pour obtenir un modèle d'inflammation pulmonaire chronique chez la souris. Dans la deuxième expérimentation, une intensification du régime d'exposition a été suffisante pour obtenir une augmentation du nombre de cellules inflammatoires dans le LBA, ainsi qu'une destruction des parois alvéolaires sans toutefois montrer d'augmentation de cytokines et chémokines inflammatoires dans le LBA.

Le modèle murin est majoritairement utilisé pour étudier les pathologies pulmonaires causées par les particules inhalées lors du tabagisme actif et passif, mais également causées par la pollution de l'air. La fumée de tabac est un aérosol chimique complexe, comportant une phase liquide dispersée en fines gouttelettes (phase particulaire) dans un mélange de gaz (phase gazeuse). Les chercheurs ont estimé que la fumée de cigarette contient 10^9 à 10^{10} particules/cm³ et plus de 7000 composés appartenant à de nombreuses classes chimiques différentes. La phase particulaire contient par exemple de la nicotine (6,2 %), des goudrons (78,2 %) et de l'eau (15,6%), alors que la phase gazeuse est composée d'azote (59 %), de CO₂ (12,5 %), de CO (4 %), et d'un mélange d'hydrocarbures et d'autres composants (24,5 %) (Rodgman et Perfetti 2009). Cependant, la composition chimique de la fumée de cigarette peut être très différente en raison de nombreux facteurs comme le mélange ou le type de tabac, la préparation du tabac (par exemple, la largeur de coupe des feuilles, la présence d'additifs et le niveau d'humidité), les dimensions de la cigarette, le poids de la tige de tabac, la porosité du papier, la présence d'un filtre et même le type de filtre (Perfetti et al. 1998). Pour ces raisons, lors d'expérimentations

animales, il est primordial d'utiliser des cigarettes standardisées, comme les cigarettes de l'Université de Kentucky, pour pouvoir comparer les données générées par les différents laboratoires. La cigarette de référence 3R4F n'étant plus disponible à l'achat depuis le 31 décembre 2018, la deuxième partie du projet *in vivo* a été réalisée avec la nouvelle référence 1R6F.

1) L'étude de faisabilité

Le protocole d'exposition de l'étude pilote a suivi les recommandations ISO 3308:2012 qui définissent les conditions standard nécessaires pour la génération de fumée de cigarettes par une machine en routine au laboratoire. L'exposition à un régime standard pendant 4 semaines, qui consiste en la répétition d'inhalations de 2 secondes et un volume de 35 mL toutes les 60 secondes sans modification préalable du filtre de la cigarette, n'a pas permis d'obtenir un modèle murin d'inflammation de type BPCO. En effet, l'analyse pléthysmographique de l'hyperréactivité bronchique après instillation de concentrations croissantes de méthacholine a montré un décalage de la courbe effet-dose vers la droite dans le groupe exposé à la fumée de cigarette. Ce décalage se traduit par une diminution de la réactivité des bronches face à la méthacholine qui est un agoniste non sélectif des récepteurs muscariniques mimant donc les effets du système nerveux parasympathique au niveau du muscle lisse bronchique. Cette diminution inattendue de la réactivité des bronches peut s'expliquer par une diminution du nombre de récepteurs muscariniques ou de leur disponibilité pour la fixation de la méthacholine. L'analyse moléculaire des récepteurs muscariniques n'a pas identifié de diminution d'expression de l'ARN_m des récepteurs muscariniques M1, M2 ou M3, mais le faible effectif dans chaque groupe ne nous permet pas d'exclure un effet du tabac sur l'expression génique de ces récepteurs. Des études d'immunohistochimie sur des coupes histologiques des voies aériennes inférieures et des études subcellulaires pourraient apporter des informations complémentaires sur la disponibilité de ces récepteurs. Par ailleurs, lors de l'étude pilote, aucun

remodelage des voies aériennes n'a été mis en évidence dans le groupe exposé à la fumée de cigarette classique par rapport au groupe contrôle. Les mécanismes de réparation des voies respiratoires semblent être suffisants pour empêcher le déséquilibre observé lors d'une agression chronique après un premier mois d'exposition à la fumée de cigarette selon un régime normal. De plus, l'analyse moléculaire des métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9), des marqueurs de l'inflammation comme RAGE et de l'apoptose (ratio bax/bcl2) n'a pas démontré de différence statistiquement significative entre les 2 groupes expérimentaux.

Au regard des résultats de l'étude de faisabilité, l'hypothèse de l'implication des acteurs du système sérotoninergique dans la physiopathologie de la BPCO n'a pu être confirmée. En effet, aucune différence n'a été mise en évidence entre les deux groupes, pour la concentration de sérotonine dans le sang total, ni pour les autres acteurs du système sérotoninergique (récepteurs, TPH-1, SERT) par RT-qPCR. Une fois de plus, les effectifs pour cette dernière analyse étaient sûrement trop faibles pour aboutir à une significativité statistique. Une équipe de chercheurs a montré une augmentation de la sérotonine chez les patients atteints de BPCO par rapport aux non-fumeurs sains ou aux anciens fumeurs (W. K. W. Lau et al. 2012). *In vivo* chez les rats mâles Sprague Dawley exposés une heure par jour et 56 jours consécutifs à la fumée de cigarette, une augmentation significative de la concentration de sérotonine sérique a été observée, sans cependant observer d'augmentation de la concentration de sérotonine dans le LBA ou le poumon (W. K.-W. Lau et al. 2012). Enfin, la sérotonine et ses récepteurs 5-HT₂ ont été associés à plusieurs fonctions pulmonaires rencontrées dans la BPCO, telles que le remodelage vasculaire (Esteve et al. 2007; Launay et al. 2002) et la bronchoconstriction, *ex vivo* et dans les voies aériennes du rat et de la souris (Kummer et al. 2006; Larsson-Callerfelt et al. 2013; Löfdahl et al. 2018). La dégradation de la sérotonine est majoritairement effectuée au niveau pulmonaire par la MAO-A (Tyce 1990). Il a été montré que cette enzyme contribue à l'augmentation du stress oxydant par l'augmentation de la production d'anion superoxyde dans

les valves cardiaques et les artères pulmonaires humaines exposées à la sérotonine (Peña-Silva et al. 2009). De plus, l'activité de la MAO-A pulmonaire des rats est augmentée lors de l'exposition à la fumée de cigarette (W. K.-W. Lau et al. 2012). Ainsi, pour les futures expérimentations, la voie de dégradation de la sérotonine constitue également une piste mécanistique dans la physiopathologie de la BPCO.

2) L'étude principale

Au regard des résultats insuffisants obtenus lors de l'étude pilote, de nouvelles souris ont été exposées à la fumée de cigarette classique selon un régime « intense » (K. M. Lee et al. 2018). Ce dernier prévoit notamment l'augmentation de la fréquence et du volume des inhalations (1 inhalation de 2 secondes et un volume de 55 mL et toutes les 30 secondes). Les niveaux d'exposition des souris ont été estimés à 736 μg et 985 μg de particules/L de fumée produite à J4 et à la fin de la deuxième semaine, respectivement. Ces niveaux d'exposition mesurées correspondent aux valeurs hautes décrites dans la littérature (Ansari et al. 2016; Hodge-Bell et al. 2007). En effet, dans le protocole de Lee et ses collègues, une concentration particulière de 550 $\mu\text{g}/\text{L}$ de fumée a été atteinte après 4 heures d'exposition à un régime intense (K. M. Lee et al. 2018). Une des raisons pouvant expliquer cette discordance est le type de filtre utilisé pour notre expérimentation qui n'est pas celui habituellement recommandé (#361042545, Fisher scientific) et qui pourrait adsorber différemment les particules présentes dans l'aérosol, influençant ainsi la masse de particules déposées. Selon les recommandations ISO 3308:2012, la capture de la fumée se fait à travers un filtre en fibre de verre appelé filtre de Cambridge. Il s'agit d'une des procédures les plus efficaces pour le piégeage d'un aérosol de fumée pour les particules de 0,3 μm de diamètre et plus (efficacité supérieure à 99,9 %). D'autres explications pourraient être apportées par la machine génératrice d'aérosol utilisée qui n'est pas identique à celle de Lee et ses collègues, ou encore par la référence de cigarettes utilisées (3R4F pour Lee et al., 1R6F dans notre projet). Enfin, ces hauts niveaux d'exposition peuvent expliquer

l'importante perte d'animaux observée dans ce projet. Par la suite, une vérification de la calibration de l'appareil d'exposition en amont de l'expérimentation sera incontournable.

Les cellules épithéliales constituent une première ligne de défense contre les effets délétères de la fumée de cigarette et l'exposition à la fumée de cigarette entraîne une libération accrue de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires par l'épithélium respiratoire avec recrutement consécutif de cellules immunitaires. Les procédures effectuées à la fin de la période d'exposition ont montré une infiltration de la région broncho-alvéolaire par les polynucléaires neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes T et les polynucléaires éosinophiles. Le recrutement de ces cellules sur le site agressé par la fumée de tabac confirme les observations de la littérature.

En effet, le nombre de polynucléaires neutrophiles est plus élevé dans les sécrétions pulmonaires des patients atteints de BPCO que chez les fumeurs en bonne santé (Stănescu et al. 1996). Les polynucléaires neutrophiles se caractérisent par la présence de granules et vésicules cytoplasmiques contenant un arsenal complexe de produits impliqués dans la communication cellulaire, la chimiotaxie, la destruction microbienne, la dégradation, la réparation et le remodelage des tissus. La migration et l'activation des polynucléaires neutrophiles passent par des facteurs tels que le GM-CSF, le G-CSF, le LTB₄, l'IL-8 ou le CXCL5 et libèrent le contenu des granules comme l'élastase neutrophile, la cathepsine G et la protéinase 3 dans l'espace extracellulaire. Les substrats de ces protéinases comprennent l'élastine, le collagène et la fibronectine, qui sont des composants majeurs de la matrice extracellulaire, et leur dégradation contribue à la destruction du tissu conjonctif et des cellules alvéolaires du poumon, ainsi qu'à l'hypersécrétion de mucus, induisant l'emphysème. Ces éléments physiopathologiques correspondent à toutes les facettes cliniques de la BPCO. Ainsi, le nombre de polynucléaires neutrophiles et la présence de leurs produits sécrétés sont corrélés à la gravité de la maladie (Lonergan et al. 2020), évaluée par le degré d'obstruction des voies

aériennes (Pilette et al. 2007), les signes d'emphysème (Ekberg-Jansson et al. 2001) et la présence de bronchite chronique (Hill et al. 2000).

Au cours d'une inflammation continue, les monocytes sont également recrutés par le poumon pour se différencier en macrophages alvéolaires. Les monocytes de patients atteints de BPCO présentent une réponse chimiotactique plus importante à CXCL1 que les cellules de fumeurs et de non-fumeurs en bonne santé. Cela ne s'explique pas par une augmentation de son récepteur, CXCR2, mais semble être dû à un renouvellement plus important de ses récepteurs (Traves et al. 2004). Dans l'agression par la fumée de tabac, le nombre de macrophages est multiplié par 5 à 10 fois dans les bronches, le parenchyme pulmonaire et le lavage broncho-alvéolaire (Ando et al. 1984; Di Stefano et al. 1998; Pratt et al. 1969). De plus, il existe une forte corrélation entre le nombre de macrophages dans les voies respiratoires et la sévérité de la BPCO (Di Stefano et al. 1998).

Les macrophages font preuve de plasticité et peuvent changer leur phénotype en fonction de l'environnement local. *In vitro*, les macrophages ont traditionnellement été décrits comme formant un phénotype au repos ou non activé (M0) et deux phénotypes polarisés (ou activés) distincts après exposition aux cytokines. Les macrophages M1, classiquement activés par le lipopolysaccharide (LPS), l'IFN- γ ou le TNF- α , produisent des cytokines pro-inflammatoires et sont impliqués dans la destruction directe des pathogènes intracellulaires. Les macrophages M2, généralement activés par l'IL-4 et l'IL-10, sont impliqués dans la régulation négative de l'inflammation ou dans la réparation des tissus. *In vivo*, ces phénotypes sont moins distincts et de nombreux marqueurs M1/M2 sont co-exprimés sur les mêmes macrophages. Une étude récente s'intéressant à la polarisation des macrophages dans la BPCO, a montré que dans les poumons sains de donneurs, plus de 80 % des macrophages alvéolaires n'expriment aucun marqueur de polarisation, mais que ce pourcentage diminue progressivement avec le tabagisme et la gravité de la maladie, pour atteindre 20 % dans les cas de BPCO sévères. De plus, l'étude

décrit une augmentation significative de la polarisation des macrophages et une co-expression des macrophages M1 et M2 selon le niveau de gravité de la BPCO (Bazzan et al. 2017). Les macrophages semblent extrêmement dynamiques au cours de la maladie inflammatoire, passant des phénotypes M1 à M2 pour faire face aux besoins du microenvironnement pulmonaire. Alors que le tabagisme et les lésions tissulaires qui en découlent favorisent le phénotype M1, les signaux homéostatiques de l'environnement local, en réponse à la réaction inflammatoire déclenchée par les M1, incitent les macrophages à adopter le phénotype M2 lié au remodelage et à la réparation des tissus.

Les macrophages produisent une multitude de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-8, le MCP-1, les ROS et les MMP. Les macrophages des patients atteints de BPCO libèrent plus de protéines inflammatoires, telle l'IL-8, que les macrophages des fumeurs en bonne santé et des non-fumeurs, ce qui accroît encore leur activation (Culpitt et al. 2003). La production de ces médiateurs pro-inflammatoires va permettre le recrutement d'autres cellules immunitaires innées telles que les polynucléaires neutrophiles et d'autres monocytes circulants. Les macrophages jouent également un rôle d'éboueurs dans la niche inflammatoire par le processus d'efferoctose des polynucléaires neutrophiles apoptotiques et la phagocytose de leurs produits tels que l'élastase. Dans la BPCO, les macrophages des patients atteints de BPCO sont moins compétents dans l'élimination des cellules apoptotiques, ce qui pourrait contribuer à l'incapacité à réduire l'inflammation locale chez ces patients. La nature de ce défaut de phagocytose n'est pas entièrement comprise mais semble être due à un défaut de la fonction microtubulaire, qui est nécessaire pour englober les corps apoptotiques, plutôt qu'à une anomalie de reconnaissance des particules phagocytées (Minematsu, Blumental-Perry, and Shapiro 2011).

Dans notre étude, un élargissement des parois alvéolaires a été observé chez les souris exposées à la fumée de cigarette. Les macrophages pulmonaires sécrètent les MMP (notamment la MMP-

2, 9 et 12) et les cathepsines K, L et S, qui contribuent à la dégradation des agents pathogènes, mais également du parenchyme pulmonaire (Punturieri et al. 2000). Ces dégradations sont suivies d'une réparation et d'un remodelage tissulaire qui se traduit, avec le temps, par un épaississement des tissus. Cela peut expliquer nos observations.

Enfin, les macrophages jouent un rôle central dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative en servant de cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes et en libérant également les chémokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11, qui attirent les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques. Ainsi, les lymphocytes s'accumulent dans le parenchyme pulmonaire des patients atteints de BPCO (Cosio and Guerassimov 1999). Les cellules T cytotoxiques entraînent également la destruction de la paroi alvéolaire en activant la voie de l'apoptose. Dans notre étude, les lymphocytes T étaient augmentés. Ils produisent également de l'IFN- γ qui est la cytokine la plus puissante activant les macrophages.

Une caractéristique importante de la BPCO est la libération d'un certain nombre de médiateurs inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-1 β , le GM-CSF, le TGF β et le CXCL-8, par les cellules épithéliales pulmonaires. Isajevs et ses collaborateurs ont démontré que l'inflammation chronique dans la BPCO est pilotée par NF- κ B (Isajevs et al. 2011). Les patients atteints de BPCO à un stade sévère peuvent présenter un état inflammatoire compromis, caractérisé par une concentration plus élevée d'IL-6 et une concentration plus faible d'IL-10 (Silva et al. 2018). Dans notre étude, aucune modification des marqueurs inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-33, IL-10 et MCP-5) n'a pu être observée. Dans d'autres études chez la souris, l'exposition relativement courte à la fumée de cigarette n'a pas produit de changement sur les niveaux de sécrétion du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-10 et de RANTES (Hodge-Bell et al. 2007; Obot et al. 2004). Les mécanismes de compensation pulmonaires semblent être suffisants pour les premières semaines d'exposition à la fumée de cigarette. Pour observer l'ensemble des

caractéristiques de la BPCO, il semble que des études plus longues soient nécessaires (Wright and Churg 2008).

Pour la suite de nos expérimentations, une augmentation de la durée d'exposition est à envisager afin d'aboutir à un modèle de BPCO qui reflète mieux les caractéristiques physiopathologiques retrouvées dans cette pathologie. Enfin, une adaptation de l'appareil d'exposition avec un module permettant l'aérosolisation du liquide pour cigarette électronique est prévue. Il sera alors nécessaire de normaliser des facteurs tels que la fréquence et la topographie des puffs ou encore les niveaux d'exposition à la nicotine, afin de garantir une exposition à l'aérosol de e-cigarette comparable à celle à la fumée de cigarette classique, l'objectif étant de comparer le niveau d'inflammation pulmonaire pour une même exposition nicotinique des souris en utilisant les 2 modalités d'exposition (e-cigarette et cigarette classique). Il sera aussi possible d'étudier l'effet de la substitution du tabac par l'usage de la e-cigarette sur le modèle qui a développé une inflammation pulmonaire et de comparer l'évolution pathologique des souris.

En conclusion, la partie *in vivo* chez la souris a permis de développer un modèle murin de BPCO regroupant certaines caractéristiques pathologiques de la maladie telles que le recrutement des cellules immunitaires (polynucléaires neutrophiles, macrophages, lymphocytes T et polynucléaires éosinophiles) dans les voies aériennes inférieures ou encore l'emphysème pulmonaire. D'autres traits de la BPCO n'ont pas pu être modélisés comme la présence de marqueurs d'inflammation chronique (IL-1 β , IL-6, TNF- α ...). En conséquence, ce modèle murin nécessite davantage d'ajustements avant son utilisation comme contrôle positif lors de l'exposition à l'aérosol de cigarette électronique.

3^ère partie : Effets des liquides pour cigarettes
électroniques sur un modèle de co-culture cellulaire
mimant la barrière alvéolo-capillaire

I. Importance de la barrière alvéolo-capillaire dans l'étude de l'exposition aux liquides pour cigarette électronique

Les voies respiratoires sont un des principaux points de dépôt des particules contenues dans la fumée de tabac et l'aérosol des dispositifs électroniques délivrant la nicotine. Les voies respiratoires sont structurées sur plusieurs étages (nez, bouche, pharynx, larynx, trachée, bronches et bronchioles) et jouent un rôle essentiel dans la filtration de l'air inhalé. Le lieu de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires et leurs effets lorsqu'elles s'y sont déposées dépendent de la taille, de la forme et de la masse volumique de ces particules, ainsi que de leurs propriétés chimiques. En général, les particules dont le diamètre aérodynamique est supérieur à 10 μm se déposent dans la zone rhinopharyngienne (voies aériennes supérieures) et les plus petites particules d'un diamètre aérodynamique inférieur à 5 μm se déposent dans les régions trachéobronchiques et alvéolaires par sédimentation.

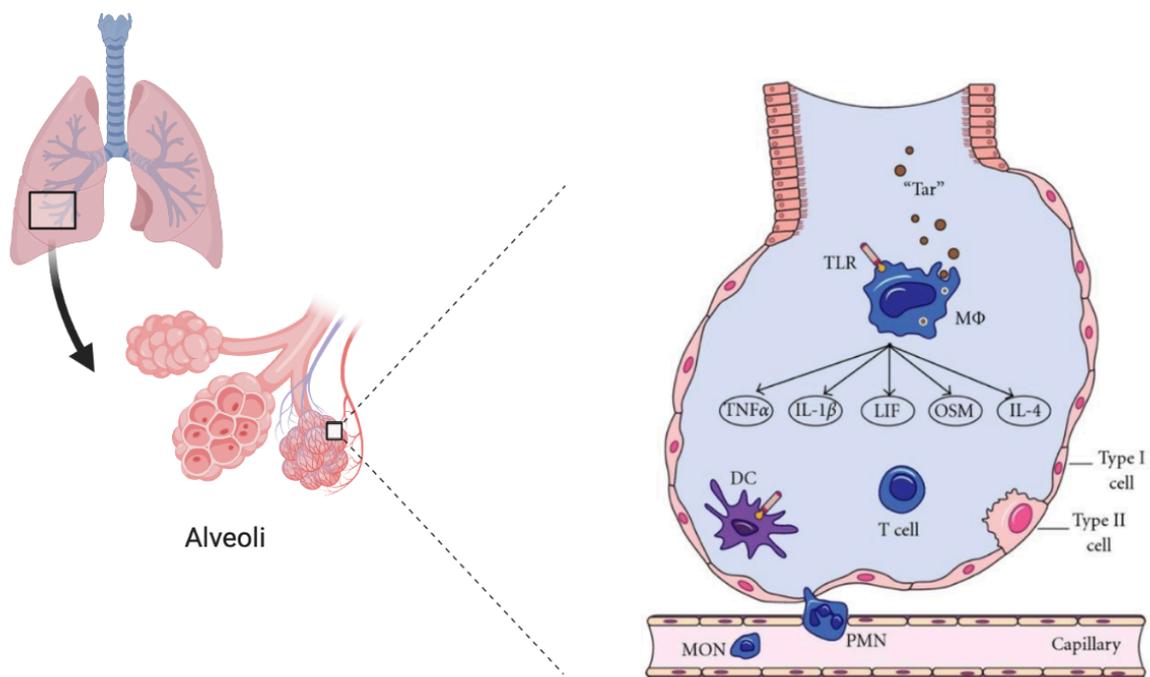


Figure 45 – Schématisation du tractus respiratoire inférieur avec focus sur la barrière alvéolo-capillaire et les effets des particules de fumée de cigarette sur la réaction inflammatoire. « tar » : goudrons, CD : cellules dendritiques, MON : monocytes, PMN : polynucléaires neutrophiles, M ϕ : Macrophage, TLR : toll-like receptor, Type I cell : pneumocyte de type I, Type II cell : pneumocyte de type II.

Au niveau distal des bronchioles se trouvent les alvéoles qui sont des petits sacs d'un volume de $4,2 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ayant des parois très minces de l'ordre de $0,2 \mu\text{m}$ (Figure 45). Le corps humain compte environ 480 millions d'alvéoles (Ochs et al. 2004). Chaque alvéole est séparée de l'autre par un septum alvéolaire, qui contient le tissu conjonctif et les capillaires pulmonaires participant aux échanges gazeux. La barrière alvéolo-capillaire qui représente une surface d'échange air-sang d'environ 120 m^2 , est le siège des échanges gazeux et joue un rôle central dans certaines pathologies pulmonaires comme la BPCO induites par l'exposition à des micro- et nanoparticules. La barrière alvéolo-capillaire est également le principal lieu d'absorption de la molécule de nicotine (Takano et al. 2017). Cette barrière est principalement la résultante d'une interaction entre un épithélium alvéolaire exposé à l'air et un endothélium exposé au sang capillaire.

L'épithélium alvéolaire est de type pavimenteux simple et est composé d'une monocouche cellulaire de deux types morphologiques distincts, les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II. Les pneumocytes de type I sont des cellules très aplaties qui couvrent la très grande majorité de la surface alvéolaire (95 %). Ces pneumocytes possèdent sur leurs membranes latérales des jonctions serrées imperméables à l'infiltration de liquide ou de particules et leur cytoplasme contient des vésicules de micropinocytose, d'abondants ribosomes et quelques lysosomes. Les pneumocytes de type II, de forme cuboïde et de répartition variable, sont habituellement nichés entre les capillaires, mais peuvent faire saillie dans la cavité alvéolaire. Ils sont unis aux pneumocytes de type I par des complexes de jonction. Leur pôle apical est irrégulier et leur cytoplasme renferme de nombreux corps lamellaires, de nombreuses mitochondries, des lysosomes et un abondant réticulum endoplasmique rugueux. Les pneumocytes de type II ont des fonctions métaboliques à l'origine de nombreuses sécrétions. Pour exemple, ils sont responsables de la production du surfactant et sont impliqués dans l'inflammation par la sécrétion de cytokines et chémokines. Ils servent également de

progéniteurs aux pneumocytes de type I durant le développement pulmonaire ou lors d'une agression cellulaire (Adamson and Bowden 1974; Uhal 1997). Pour arriver dans la circulation sanguine, une molécule inhalée doit traverser la membrane basale et la deuxième couche cellulaire composée de l'endothélium capillaire continu de la microvascularisation profonde du poumon.

De multiples modèles cellulaires ont été utilisés dans les études toxicologiques de la cigarette classique (Li 2016; Manuppello and Sullivan 2015) et de la cigarette électronique (Neilson et al. 2015; Vasanthi Bathrinarayanan et al. 2018) sur les voies respiratoires supérieures.

A cause du rôle central de la barrière alvéolo-capillaire dans les fonctions pulmonaires, la modélisation *in vitro* de la barrière alvéolo-capillaire nous serait utile pour étudier les effets de la cigarette électronique et analyser la diffusion des molécules au travers de la barrière.

Les premières modélisations *in vitro* de cette barrière ont été publiées dans les années 2000 (Birkness et al. 1999; Hermanns et al. 2004). Depuis, plusieurs modèles multicellulaires (3 ou plus de types cellulaires), comprenant l'ajout d'autres cellules ayant soit un rôle de structure soit jouant un rôle dans la réaction inflammatoire, ont été développés et ont été utilisés pour étudier l'effet de certains xénobiotiques ou de certaines particules sur la barrière alvéolo-capillaire (Klein et al. 2013; Lehmann et al. 2011). Cependant, à notre connaissance, peu de modèles multicellulaires mimant cette interface air-sang ont été utilisés pour explorer l'effet des nouveaux systèmes de délivrance de la nicotine (Bengalli et al. 2017; Ganguly et al. 2020).

II. Modélisation de la barrière alvéolo-capillaire *in vitro*

1) Choix des lignées cellulaires utilisées dans notre modèle de barrière alvéolo-capillaire

Le premier choix qui a été fait réside dans l'utilisation de lignées cellulaires plutôt que de cellules primaires. En effet, devant la grande variabilité des cellules primaires et leur disponibilité limitée, des modèles bi- voire multi-cellulaires permanents et plus robustes doivent être davantage développés.

a) Les cellules épithéliales alvéolaires choisies pour notre modèle de barrière alvéolo-capillaire

En dehors des cultures de cellules primaires, trois lignées cellulaires humaines sont décrites dans la littérature comme ayant les caractéristiques des pneumocytes : les pneumocytes de types II transformés en pneumocytes de type I (Kemp et al. 2008), les cellules A549 (Lieber et al. 1976; Shapiro et al. 1978) et les cellules NCI-H441 (Gazdar et al. 1990). Si chacune de ces lignées apportent une simplicité d'utilisation en comparaison aux cellules primaires, elles présentent aussi des inconvénients. Les pneumocytes de types I immortalisés ne produisent plus le surfactant qui a un rôle important dans la réduction de la tension de surface et dans la défense locale de la barrière alvéolo-capillaire et plus générale du poumon (Kemp et al. 2008). La lignée A549 est communément décrite comme ayant les caractéristiques des pneumocytes de types II, mais, même après plusieurs jours de culture, la formation d'une barrière fonctionnelle n'a pas pu être démontrée. Seule la lignée cellulaire NCI-H441 possède les caractéristiques métaboliques, de transport et de barrière semblables aux cultures de cellules alvéolaires humaines (Hermanns et al. 2004; Salomon et al. 2014). Cette dernière lignée, obtenue à partir d'un adénocarcinome papillaire pulmonaire, reste capable de produire les composants du surfactant (protéines SP-A, SP-B, SP-D, phospholipides) et de les stocker dans des organelles

(Weaver, Na, and Stahlman 2002) dans les conditions de culture cellulaire *in vitro*. De plus, les NCI-H441 ont une activité phosphatase alcaline similaire aux pneumocytes, expriment les protéines des jonctions serrées et le facteur 1 de transcription de la thyroïde (TTF-1) impliqué dans la production du surfactant. Pour finir, le NCI-H441 forment des corps lamellaires comme les cellules alvéolaires primaires (Chess, Ryan, and Finkelstein 1998; Hermanns et al. 2004).

La lignée cellulaire NCI-H441 (ATCC® HTB-174™) se cultive dans un milieu RPMI-1640 (ATCC 30-2001™) enrichi en sérum de veau fœtal (SVF, 10 %) et antibiotiques Pénicilline-Streptomycine (10 000 UI/mL - 10 mg/mL, à 1 %) correspondant à des conditions de culture cellulaire simple.

b) Les cellules endothéliales choisies pour notre modèle de barrière alvéolo-capillaire

Pour notre modèle cellulaire mimant la barrière alvéolo-capillaire, nous avons choisi la lignée endothéliale HULEC-5a. Ces cellules issues de poumon sain et immortalisées par transfection avec un vecteur pSVT contenant le gène 40A qui code pour l'oncoprotéine SV40 large T antigen, présentent les caractéristiques des cellules endothéliales. Elles ont déjà été utilisées dans divers modèles de barrière alvéolo-capillaire, notamment en infectiologie (Mehta et al. 2006).

La lignée cellulaire HULEC (ATCC® CRL-3244™) se cultive dans un milieu MCDB131 enrichi en EGF (10 ng/mL), hydrocortisone (1 µg/mL), glutamine (10 mM), SVF (10%) et antibiotiques Pénicilline-Streptomycine (10 000 UI/mL - 10 mg/mL, à 1 %).

2) Mise en œuvre et validation de notre modèle de barrière alvéolo-capillaire

a) Choix du milieu optimal pour la co-culture

Comme décrit ci-dessus, les 2 lignées cellulaires choisies n'ont pas de conditions de culture communes. Pour trouver un milieu de culture commun qui permettrait la croissance optimale de chaque lignée, différentes conditions ont été testées pour chaque lignée, et sont présentées dans le Tableau XIV. Le milieu de culture spécifique à chaque lignée a été utilisé comme contrôle. Les cellules ont été cultivées sur des plaques de 24 puits (5×10^4 cellules/puits), avec 3 puits par condition de culture et 500 μ L de milieu.

Tableau XIV – Conditions de culture testées pour obtenir la croissance des lignées.

		Milieu	Pyruvate de sodium* (% (v/v))	hEGF (ng/mL)	Héparine sodique (μ g/mL)
NCIH441	Contrôle	RPMI1640	—	—	—
	Milieu A	RPMI1640	1	10	25
	Milieu B	RPMI1640/MCDB131 (50:50)	1	10	25
	Milieu C	MCDB131	1	10	25
HULEC-5a	Contrôle	MCDB131	1	10	—
	Milieu A	RPMI1640	1	10	25
	Milieu B	RPMI1640/MCDB131 (50:50)	1	10	25
	Milieu C	MCDB131	1	10	25

*Le pyruvate de sodium, absent du milieu RPMI1640 est une source d'énergie supplémentaire présente dans le milieu MCDB131 utilisé pour les cellules endothéliales.

À J3, J6 et J8 après ensemencement, les cellules de 3 puits ont été décollées avec 200 μ L de trypsine-EDTA (5 min d'incubation à 37°C), centrifugées puis le culot resuspendu dans 800 μ L de milieu et la densité cellulaire a été mesurée (Scepter™ 2.0 Handheld Automated Cell Counter, Merck) et comparée au contrôle (Figure 46).

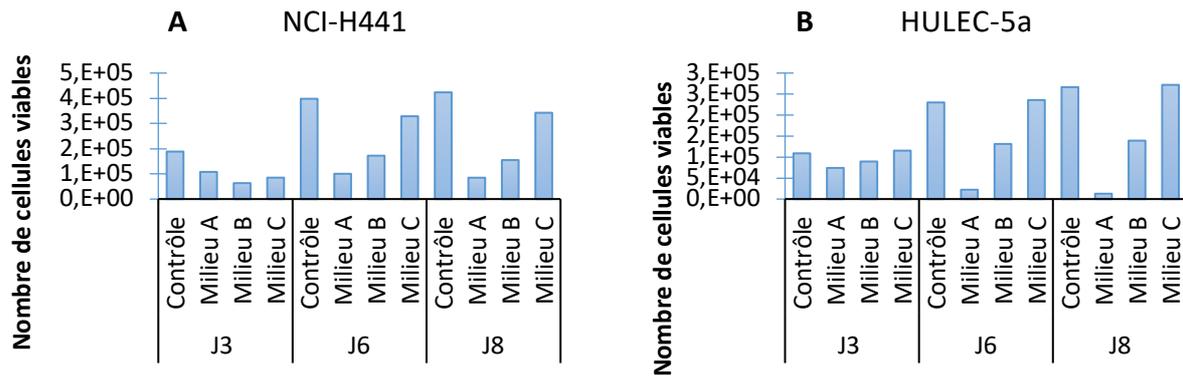


Figure 46 – Nombre de cellules viables (A) NCI-H441 et (B) HULEC-5a cultivées dans différentes conditions pendant 8 jours.

Comme le montre la figure 46(A), le nombre de cellules viables NCI-H441 change selon le milieu de culture utilisé. L'ajout du pyruvate de sodium et de facteurs de croissance semble être néfaste pour cette lignée considérée comme peu exigeante. Par rapport au contrôle, le « milieu C » semble le plus adapté pour permettre la croissance des cellules même si elle est un peu retardée dans le temps. Par ailleurs, un mélange 50/50 des deux milieux de culture (« milieu B ») n'est pas suffisant pour permettre une croissance optimale de la lignée endothéliale alors que le « milieu C » semble le plus adapté (Figure 46(B)). Le « milieu C » semble donc le mieux adapté pour la co-culture. Cependant, cultivées à la même densité cellulaire (5×10^4 cellules/puits), la croissance des cellules épithéliales atteint un plateau plus rapidement à partir de J6, alors que les cellules endothéliales nécessitent un temps supplémentaire de 2 jours pour atteindre ce plateau.

À ces différents temps de culture (J3, J6, J8), des images des cellules ont été prises à l'aide du microscope inversé (Evos XL Core, Thermo Fisher) et ont confirmé que la co-culture doit se faire dans un milieu MCDB131 enrichi en EGF (10 ng/mL), hydrocortisone (1 μ g/mL), glutamine (10 mM), SVF (10 %) et héparine sodique (25 μ g/mL) pour que les cellules forment un tapis cellulaire homogène et ne présentent pas de modifications morphologiques laissant suspecter une différenciation cellulaire.

Pour la suite des expérimentations, nous avons donc déterminé les conditions optimales permettant la construction de notre modèle de BAC, en suivant les étapes comme l'indique le protocole ci-dessous (Figure 1 de l'article 1) :

#1 – Cultiver les HULEC-5a sur le côté basolatéral d'un insert cellulaire pendant 2 jours (J0-J2) dans leur milieu de culture.

#2 – A J2, ajouter la lignée NCI-H441 du côté apical dans le milieu de culture choisi commun aux deux lignées (même densité que les HULEC-5a).

#3 – Laisser les cellules en culture de J2 à J8, avec un changement du milieu tous les 3 jours.

b) Validation fonctionnelle du modèle de co-culture de notre modèle de barrière alvéolo-capillaire

i. Test de perméabilité au Bleu Trypan

Le bleu Trypan est une petite molécule (873 g/mol) souvent utilisée pour des tests de viabilité cellulaire. Les cellules vivantes dont la membrane est intacte n'absorbent pas cette molécule, alors que les cellules dont la membrane est perméabilisée vont laisser passer le bleu Trypan dans leur cytoplasme.

Ici, les propriétés absorbantes du bleu Trypan ont été utilisées pour une étude de l'intégrité de la barrière formée par les cellules en monoculture ou en co-culture, par rapport à un contrôle représenté par un insert poreux de culture cellulaire.

Les cellules ont étéensemencées à une densité de 5×10^4 cellules par insert cellulaire. A différents temps de culture (J4, J7 et J9), 200 μ L d'une solution de bleu Trypan dilué au 1/16^{ème} sont déposés du côté apical de l'insert cellulaire, soit des cellules en monoculture (NCI-H441 ou HULEC-5a), soit des cellules en co-culture de chaque côté de l'insert, soit sur des inserts sans cellules qui servent de contrôle négatif correspondant à l'absence de barrière cellulaire (Figure 47(A)). La cinétique de passage du bleu Trypan est effectuée en prélevant 100 μ L de

milieu basolatéral à différents temps (0, 15, 30, 60, 120 et 240 minutes). Les 100 μ L prélevés sont déposés dans une plaque 96 puits et la lecture de l'absorbance des puits se fait par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 490 nm (Figure 47(B)). Plus le bleu Trypan passe rapidement du niveau apical vers le niveau basolatéral, plus la barrière cellulaire est perméable et donc dysfonctionnelle (Figure 47(C)).

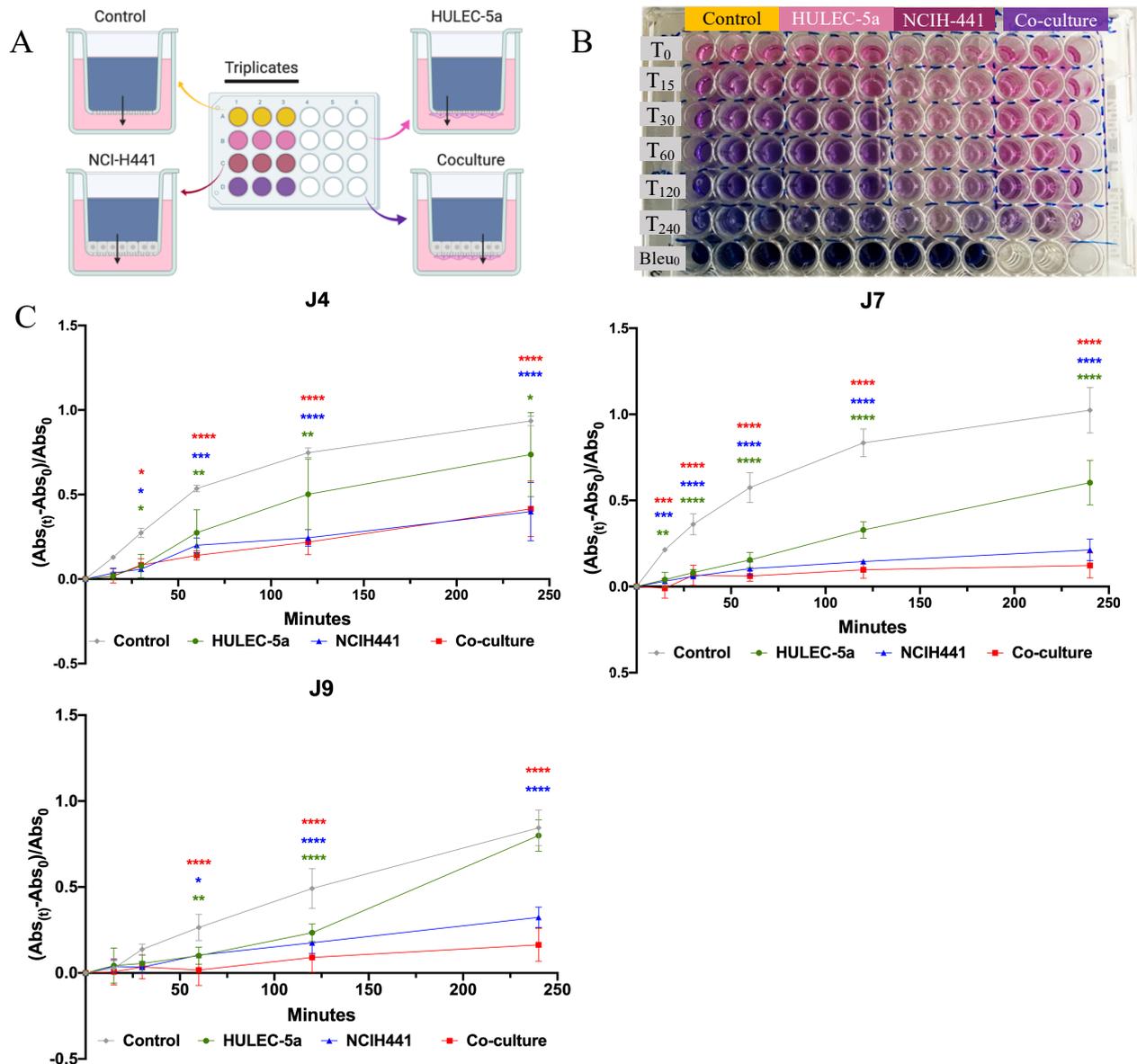


Figure 47 – Illustrations de l'expérimentation de perméabilité de la barrière cellulaire au bleu Trypan. (A) Les monocultures (NCI-H441 et HULEC-5a), la co-culture des 2 lignées et le contrôle sont mis en contact, sur la partie apicale de l'insert, d'une solution de bleu Trypan dilué au 1/16^{ème} dans le milieu spécifique. (B) Plaque de 96 puits contenant les 100 μ L prélevés du côté basolatéral à des temps prédéfinis. (C) Cinétiques des absorbances normalisées par rapport au T₀ correspondant pour chaque condition, à J4, J7 et J9 de culture. Analyse statistique : Comparaison des monocultures (NCI-H441 (\blacktriangle et *) et HULEC-5a (\bullet et *)) et de la co-culture (\blacksquare et *) versus contrôle (\blacklozenge) à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. n = 3 expérimentations en triplicata.

La cinétique de passage du bleu Trypan montre que les cellules NCI-H441 assurent un rôle majeur dans l'efficacité de l'intégrité de barrière alvéolo-capillaire de notre modèle.

A partir de J7, la barrière formée par la lignée endothéliale HULEC-5a limite le passage du bleu Trypan et les barrières comprenant des NCI-H441 en monoculture et en co-culture sont fonctionnelles plus précocement, dès J4. Ainsi, le temps de culture à J7 semble être le plus approprié pour la suite des expérimentations. A J9, une désorganisation de la barrière, certainement due à une toxicité de contact peut être suspectée. En effet, un trop grand nombre de cellules présentes dans la culture cellulaire est à l'origine du décollement des cellules du support ce qui produit des surfaces sans cellules et donc où le passage du bleu Trypan est totalement libre comme pour le contrôle.

La mesure de la résistance électrique trans-épithéliale/endothéliale (TEER) nous a permis de consolider ces résultats en sachant que cette mesure est plus sensible que l'analyse par le bleu Trypan car celle-ci suit les ions qui ont des tailles inférieures au bleu Trypan. La mesure de TEER permet d'identifier une rupture plus précoce des barrières cellulaires.

ii. Mesure de la résistance électrique de la barrière

La mesure de la résistance électrique trans-épithéliale/endothéliale (TEER) est une technique qui évalue la résistance ohmique entre les compartiments apical et basolatéral d'un insert, tout en préservant les populations cellulaires étudiées. Elle indique donc le degré d'intégrité des jonctions mises en place par les cellules endothéliales et épithéliales en monoculture et en co-culture.

La résistance étant inversement proportionnelle à la surface de l'insert, généralement le produit de la résistance et de l'aire de l'insert est calculé ($\Omega \cdot \text{cm}^2$), après avoir soustrait la résistance du blanc (insert sans cellules). La formule de calcul de la TEER est donc :

$$\text{TEER (en } \Omega \cdot \text{cm}^2) = (\text{TEER}_{\text{obtenue}} - \text{TEER}_{\text{blanc}}) * \text{Surface}_{\text{insert}}$$

Les mêmes conditions d'ensemencement que pour l'expérimentation au bleu Trypan ont été testées à savoir les cellules en monoculture (densité cellulaire à 5×10^4 /puits à J0 pour HULEC-5a et à J2 pour NCI-H441), en co-culture (densité cellulaire initiale pour les deux lignées à 5×10^4 /puits, avec la lignée NCI-H441 ajoutée à J2) et pour le blanc (inserts sans cellules). Les mesures de la TEER ont été réalisées en triplicata à différents temps de culture (J0, J1, J2, J4, J5, J6, J7, J8, J9, J10 et J12). Les inserts utilisés possèdent une surface de $0,3 \text{ cm}^2$ (inserts pour plaque de 24 puits).

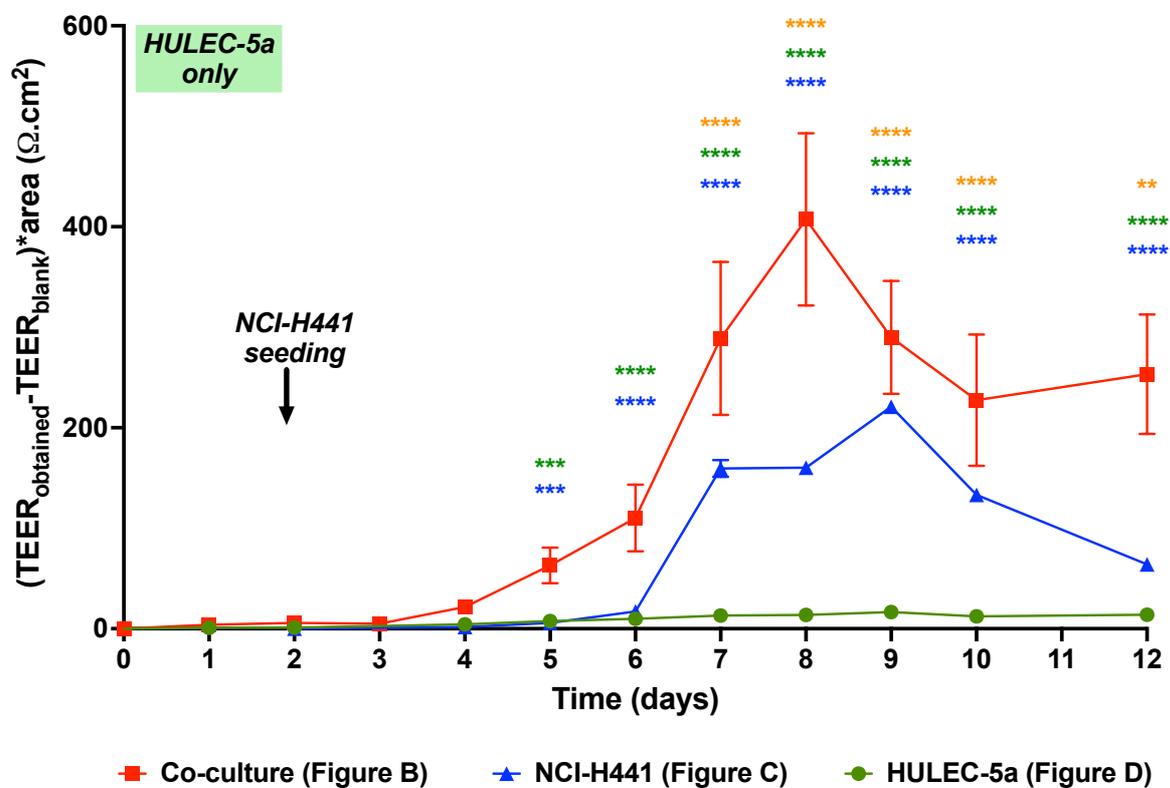


Figure 48 – Évolution de la résistance trans-épithéliale/endothéliale (TEER) électrique au cours du temps. Densités cellulaires initiales pour HULEC-5a à J0 et NCI-H441 en monoculture et co-culture à J2 sont de 5×10^4 /puits pour les deux lignées. Analyse statistique : Comparaison des monocultures NCI-H441 (\blacktriangle et *) et HULEC-5a (\bullet et *) versus co-culture (\blacksquare) et monoculture NCI-H441 versus monoculture HULEC-5a (*) à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. n = 3.

Les résultats montrent qu'il y a une augmentation progressive de la résistance jusqu'à J8 pour les inserts de la co-culture et jusqu'à J9 pour ceux des monocultures NCI-H441 et HULEC-5a, puis une diminution progressive de la résistance (Figure 48). Ces données confirment le rôle prépondérant de la lignée NCI-H441 dans la formation d'une barrière efficace par rapport aux

cellules endothéliales. De manière surprenante, les données de TEER pour la co-culture ne sont pas le résultat de l'addition de la résistance de ses deux composantes, mais la somme des valeurs pour les monocultures est multipliée par 1,2 à 4,1 fois entre J5 et J12, montrant ainsi une complémentarité de l'effet induit par les deux lignées.

En comparant les résultats obtenus pour la TEER avec ceux obtenus pour le bleu Trypan, les observations suivantes peuvent être formulées :

- A J4, la mesure de la TEER ne met en évidence aucune différence entre les monocultures et la co-culture, alors que la cinétique du bleu Trypan est significativement différente entre la monoculture HULEC-5a et la monoculture NCI-H441, ainsi qu'entre la monoculture HULEC-5a et la co-culture (résultats non-illustrés sur la figure 47). Ceci suggère qu'à J4 la barrière est suffisamment perméable pour laisser passer les ions, mais suffisamment étanche pour limiter le passage du bleu Trypan.
- A J7, la mesure de la TEER met en évidence une différence entre la monoculture NCI-H441 et la co-culture, alors que cette différence n'a pas été mise en évidence par la cinétique du bleu Trypan sur la durée de temps analysée. En revanche, les deux méthodes ont mis en évidence la différence entre la barrière formée par la monoculture NCI-H441 et celle formée par la monoculture HULEC-5a, indiquant le rôle majeur de la lignée épithéliale dans la fonction de barrière.
- A J9, les deux méthodes ont mis en évidence des différences significatives selon les conditions de culture testées, montrant principalement une désorganisation de la barrière.

La mesure de la résistance a permis la validation fonctionnelle du modèle de co-culture. Le modèle est optimal lorsque la valeur de TEER pour la co-culture est comprise dans l'intervalle

300-500 Ω .cm². Cela nous permettra pour la suite du projet de suivre la fonctionnalité du modèle en tant que barrière efficace.

iii. Validation phénotypique des monocultures et de la co-culture

- *Recherche de marqueurs spécifiques de chaque type cellulaire*

La seconde étape importante de la validation de notre modèle est la caractérisation phénotypique des deux lignées choisies. Ainsi, les marqueurs spécifiques de chaque lignée ont été recherchés par RT-qPCR afin d'évaluer la présence d'ARN_m, par Western-Blot (WB) afin de confirmer et de quantifier l'expression de la protéine correspondant à l'ARN_m et par immunofluorescence (IF) afin de confirmer la localisation cellulaire de la protéine sur son site d'action habituel. Le tableau ci-dessous décrit les marqueurs spécifiques et les résultats obtenus pour la lignée NCI-H441 (Tableau XV) :

Tableau XV – Caractérisation phénotypique de la lignée épithéliale NCI-H441.

Marqueur	Rôle	ARN _m	Protéine
SP-A	Protéine du surfactant A	++	+
SP-D	Protéine du surfactant D	+	++
AQP-5	Canal membranaire de transport d'eau	++	++
TTF-1	Facteur de transcription de la thyroïde impliqué dans la synthèse des protéines du surfactant	++	++
Occludine	Protéine des jonctions serrées	+++	+++
ZO-1	Protéine des jonctions serrées	+++	+

ARN_m quantifié par rapport au gène de ménage 18S. Protéines quantifiées par rapport aux protéines totales (technologie stain free). + : marqueur faiblement présent ; ++ : marqueur moyennement présent ; +++ : marqueur fortement présent.

Le tableau ci-dessous décrit les marqueurs spécifiques et les résultats obtenus pour la lignée HULEC-5a (Tableau XVI) :

Tableau XVI – Caractérisation phénotypique de la lignée endothéliale HULEC-5a.

Marqueur	Rôle	ARN _m	Protéine
CD31	Marqueur d'angiogenèse impliqué dans la migration des leucocytes	ND	+++
eNos	Enzyme permettant la production endothéliale du NO	+++	+
vWF	Facteur de la coagulation	++	+++
Occludine	Protéine des jonctions serrées	+	+/-
ZO-1	Protéine des jonctions serrées	++	+

ND = Non déterminé. ARN_m quantifié par rapport au gène de ménage 18S. Protéines quantifiées par rapport aux protéines totales (technologie stain free). +/- : marqueur très faiblement présent ; + : marqueur faiblement présent ; ++ : marqueur moyennement présent ; +++ : marqueur fortement présent.

Les images d'immunofluorescence de la figure 49 montrent la localisation cellulaire de quelques marqueurs (Figure 49). Ainsi, comme attendu les cellules HULEC-5a présentent bien un marquage membranaire de la protéine CD31 et un marquage cytoplasmique du facteur de von Willebrand, alors que le marquage de l'occludine n'est visible que sur les membranes des NCI-H441.

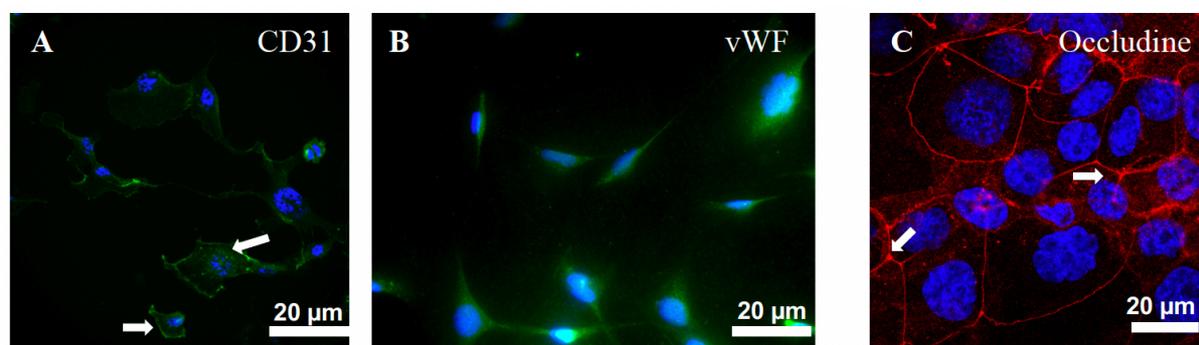


Figure 49 – Images d'immunofluorescence obtenues pour (A) le marqueur CD31 membranaire (#ab28364, Abcam, 1/100^{ème}) et (B) le facteur de von Willebrand cytoplasmique (#ab6994, Abcam, 1/100^{ème}) pour les cellules endothéliales HULEC-5a, ainsi que pour (C) l'occludine (#33-1500, Thermo Fisher, 1/100^{ème}) pour les cellules épithéliales alvéolaires NCI-H441. Les anticorps secondaires utilisés sont pour (A) et (B) les anticorps secondaires chèvre anti-lapin conjugués à l'Alexa fluor-488 (#AP132JA4, Sigma-Aldrich, 1/500^{ème}) et pour (C) les anticorps secondaires chèvre anti-souris conjugués à l'Alexa fluor-647 (#ab150115, Abcam, 1/500^{ème}). Les flèches blanches indiquent le marquage membranaire.

Il a donc été mis en évidence que les lignées NCI-H441 et HULEC-5a utilisées possèdent bien des caractéristiques phénotypiques semblables aux cellules alvéolaires humaines et aux cellules endothéliales, respectivement.

- *Recherche de la présence d'acteurs du système sérotoninergique sur les lignées sélectionnées*

Dans la perspective d'étudier l'implication du système sérotoninergique dans la réponse inflammatoire et/ou dans le stress oxydant induit par l'exposition aux composants des liquides pour cigarettes électroniques, la recherche de l'expression des acteurs majeurs du système sérotoninergique a été effectuée pour les deux lignées. Les marqueurs concernés par cette investigation ont été les enzymes Tryptophane Hydroxylases 1 et 2 (TPH-1 et TPH-2) qui sont impliquées dans la production de la sérotonine à partir du tryptophane, le transporteur spécifique de la sérotonine (SERT) et les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇.

Le tableau XVII résume les résultats obtenus après analyse de l'ARN_m par RT-qPCR et de l'expression protéique par WB. Chaque marqueur a été recherché dans les cellules NCI-H441 et les cellules HULEC-5a (Tableau XVII).

Tableau XVII – Résultats des RT-qPCR et WB obtenus lors de la recherche des acteurs majeurs du système sérotoninergique dans les lignées NCI-H441 et HULEC-5a.

Marqueur	Fonction	Lignée endothéliale HULEC-5a		Lignée épithéliale NCI-H441	
		ARN _m	Protéine	ARN _m	Protéine
TPH-1	Enzyme impliquée dans la synthèse de la sérotonine en périphérie	+	+++	+++	++
TPH-2	Enzyme impliquée dans la synthèse de la sérotonine au niveau central	+/-	-	+/-	-
SERT	Transporteur de recapture de la sérotonine	+	ND	+	ND
5-HT_{1B}	Récepteur membranaire couplé à une protéine G _i	+++	+++	-	-
5-HT_{1D}	Récepteur membranaire couplé à une protéine G _i	+++	ND	+++	ND
5-HT_{1F}	Récepteur membranaire couplé à une protéine G _i	+	ND	++	ND

5-HT_{2A}	Récepteur membranaire couplé à une protéine G _q	ND	++	ND	-
5-HT_{2B}	Récepteur membranaire couplé à une protéine G _q	++	-	+	+++
5-HT₄	Récepteur membranaire couplé à une protéine G _s	++	++	+	-
5-HT₆	Récepteur membranaire couplé à une protéine G _s	+	+	++	++
5-HT₇	Récepteur membranaire couplé à une protéine G _s	-	-	+++	+++

ND = Non déterminé. ARNm quantifié par rapport au gène de ménage 18S. Protéines quantifiées par rapport aux protéines totales. +/- : très faible expression détectée ; + : marqueur faiblement présent ; ++ : marqueur moyennement présent ; +++ : marqueur fortement présent.

Ces résultats montrent que différents acteurs du système sérotoninergique sont présents et sont exprimés à des degrés divers dans notre modèle de barrière alvéolo-capillaire. Une perspective de ce projet sera d'identifier les modulations pharmacologiques du système sérotoninergique lors de l'exposition aux liquides/aérosols de cigarette électronique, et notamment l'impact des e-liquides sur la synthèse et la libération de sérotonine dans le milieu alvéolaire.

3) Conclusion sur la validation du modèle de barrière alvéolo-capillaire *in vitro*

En prenant en compte les résultats obtenus lors de la caractérisation phénotypique des lignées par RT-qPCR, WB et IF, ainsi que lors de l'évaluation fonctionnelle de notre modèle de co-culture par le test d'intégrité au bleu Trypan et la mesure de la TEER, nous pouvons conclure que notre modèle cellulaire *in vitro* de barrière alvéolo-capillaire peut être utilisé pour étudier les effets des principaux composants de e-liquides et des e-liquides commercialisés. Ces travaux *in vitro* et les résultats obtenus sont décrits dans les deux suivants articles.

III. Article 1 : Effets des principaux composants des liquides pour cigarette électronique et de 5 liquides commercialisés aromatisés, avec ou sans nicotine, sur le modèle de barrière alvéolo-capillaire

1) Objectif de l'article et résultats obtenus

La cigarette électronique bien que considérée plus sûre que le tabac par les utilisateurs et par une partie de la communauté médicale (Berlin et al. 2021; HCSP 2021), n'a pas démontré son innocuité puisque peu ou pas de preuves concrètes existent. Bien au contraire, une quantité sans cesse croissante de travaux scientifiques montre que la cigarette électronique, du fait de la composition du e-liquide ou du dispositif électronique, présente une menace à long terme pour la santé publique. Le e-liquide contient généralement du propylène glycol (PG) et de la glycérine végétale (VG) dans des proportions différentes, de la nicotine et une grande panoplie d'arômes. Il est chauffé par une batterie et les gouttelettes d'aérosol produites se déposent principalement dans la zone alvéolaire où la nicotine et d'autres molécules traversent la barrière alvéolo-capillaire (Takano et al. 2017). Pour étudier les effets des e-cigarettes sur cette barrière, le modèle *in vitro* de co-culture préalablement validé a été exposé à des concentrations croissantes des composants suivants :

- Du PG et de la VG seul(e)
- Des mélanges de PG/VG à des ratios de 50/50 et 76/24 (V/V)
- Trois e-liquides aromatisés sans nicotine : fruits rouges, menthe-eucalyptus, tabac blond
- Deux e-liquides aromatisés « tabac blond » avec 6 mg/mL de nicotine différant par leur ratio en PG/VG : 50/50 (E-liquide 1 ou EL1) et 76/24 (E-liquide 2 ou EL2). Ces e-liquides sont ceux utilisés dans l'essai clinique VAPexp' AIR.

Des méthodes analytiques permettant l'investigation de plusieurs mécanismes cellulaires ont été menées :

- La modification de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire a été mise en évidence par la mesure de la résistance électrique trans-épithéliale/endothéliale et par l'analyse en Western-blot de l'occludine, une protéine des jonctions serrées.
- La production de ROS a été analysée grâce au MitoSOX[®] et celle de marqueurs inflammatoires grâce à une méthode multiplex incluant 20 cytokines/chémokines.
- La mort cellulaire a été explorée par un test de viabilité cellulaire au MTS et la recherche de marqueurs d'apoptose (ratio Bax/Bcl-2) et d'autophagie (marqueur LC3) en WB.

Nous avons montré que :

- Les véhicules, PG et VG, en raison de leurs propriétés hypertoniques, modulent l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire en modifiant l'expression de l'occludine.
- En dessous d'une concentration de 10%, les véhicules seuls ou leurs mélanges 50/50 et 76/24, ne déclenchent pas de stress oxydant ou de mort cellulaire.
- La toxicité induite par les e-liquides aromatisés dépend de l'arôme présent dans le e-liquide : alors que les e-liquides « fruits rouges » et « menthe-eucalyptus » agissent à des concentrations plus faibles en amoindrissant l'intégrité de la barrière, déclenchant un stress oxydant et une mort cellulaire, l'arôme « tabac blond » ne semble pas plus néfaste que les véhicules sur ces mêmes critères. De plus, le e-liquide « menthe-eucalyptus » augmente de manière très significative la production de certains marqueurs pro-inflammatoires.
- La présence de nicotine dans le e-liquide « tabac blond » est source d'augmentation du stress oxydant mitochondrial comparé au e-liquide « tabac blond » sans nicotine.

- Notre modèle permet de discriminer les effets cellulaires des différents e-liquides testés. Il est, de ce fait, un très bon outil pour un premier criblage rapide des e-liquides afin de détecter ceux qui sont délétères pour les cellules, avant d'étudier les effets de l'aérosolisation des e-liquides sur des modèles *in vitro* air-liquide.

2) Article

Soumis à *Food and Chemical Toxicology* le 29 août 2022.

Flavoured and nicotine-containing e-liquids impair homeostatic properties of an alveolar-capillary cell model

Amelia-Naomi Sabo^{a,b}, Emma Filaudeau^a, Sylvia Da Silva^a, Guillaume Becker^{a,c}, Laurent Monassier^a, Véronique Kemmel^{a,b*}

^a Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neurocardiovasculaire, UR 7296, Faculté de Médecine de Maïeutique et des Métiers de la Santé, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg (CRBS), 67085, Strasbourg, France; amelia-naomi.sabo@chru-strasbourg.fr (A.N.S.), emma.filaudeau@ctu.unistra.fr (E.F.), sylvia.dasilva@unistra.fr (S.D.S.), guillaume.becker@chru-strasbourg.fr (G.B.), laurent.monassier@unistra.fr (L.M), kemmel@unistra.fr (V.K.)

^b Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67200, Strasbourg, France; amelia-naomi.sabo@chru-strasbourg.fr (A.N.S.), veronique.kemmel@chru-strasbourg.fr (V.K.)

^c Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Pôle Pharmacie-Pharmacologie, 67200, France; guillaume.becker@chru-strasbourg.fr (G.B.)

***Address all correspondence to:**

Véronique Kemmel : veronique.kemmel@chru-strasbourg.fr ; Tel.: +33 (0) 3 88 12 75 33 (V.K.)

Number of text pages: 32

Number of tables: 1

Number of figures: 9

Number of references: 52

Number of words in the Abstract: 200

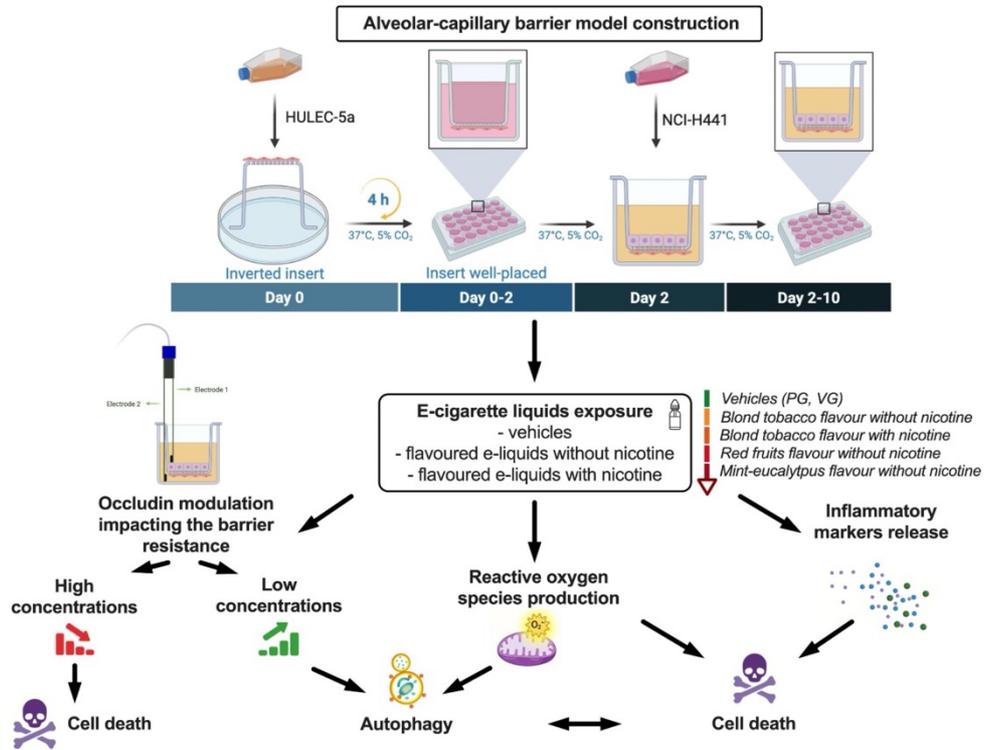
ABSTRACT

Most people consider that electronic cigarettes are safer than tobacco and are marketed as quit-smoking products. The e-liquid, which usually contains propylene glycol (PG) and vegetable glycerin (VG) in different ratios, nicotine and a wide variety of flavours, is heated by a battery and the aerosol droplets are primarily delivered to the alveolar area where nicotine and other molecules cross the alveolar-capillary barrier (ACB). However, e-cigarettes effects on the ACB are not yet established. In our study, a well-characterised *in vitro* model of the ACB was exposed to PG and VG and to five flavoured e-liquids with and without nicotine. The vehicles, due to their hypertonic properties, modulated the ACB integrity by modifying occludin expression. Below a 10% concentration, the vehicles did not trigger oxidative stress or cell death. Different results were observed between flavoured e-liquids: while red fruits and mint-eucalyptus disrupted ACB integrity, triggered oxidative stress and cell death, blond tobacco had no worse effect compared to the vehicles. However, the addition of nicotine in the latter e-liquid increased oxidative stress and cell death compared to the vehicles. Finally, mint-eucalyptus e-liquid increased some inflammation markers. Our results revealed that e-liquids alter ACB homeostasis, depending on flavour and nicotine presence.

KEYWORDS

Number: E-cigarettes, alveolar-capillary barrier, oxidative stress, inflammation, barrier disruption, cell death

GRAPHICAL ABSTRACT



1 **1. Introduction**

2 It is now well established that tobacco smoke has serious effects on the respiratory health status of
3 users and represents the main etiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). This
4 pathology described by the Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD 2017) as
5 a persistent airflow limitation in the airways, is associated with a chronic inflammatory response of
6 the airways and a degradation of lung function (<https://goldcopd.org>). The pathophysiological
7 mechanism of COPD, even if not yet fully elucidated, involves mediators of oxidative stress (reactive
8 oxygen species or ROS, such as the superoxide anion and the hydroxyl radical) and inflammation
9 (cytokines, chemokines) (1,2). The oxidant burden in the lungs due to smoke toxicants is enhanced
10 by the release of ROS from macrophages and neutrophils, with the increased migration of these cells
11 in the lungs of smokers observed as a response to chemokine signalling (3).

12 Electronic cigarettes, also named e-cigarettes or e-cigs, are marketed as safe or less harmful than
13 tobacco, with defenders claiming the benefit of these systems in reducing smoking and, consequently,
14 smoking-related diseases. The use of e-cigarettes has spread very quickly, and the international
15 market for them is growing. They usually consist of three basic elements: an atomiser, an e-liquid
16 tank and a battery. Although there are several generations on the market, they all work according to
17 the common principle of aerosolisation of a liquid, usually named e-liquid, by heating a resistance.
18 Propylene glycol (PG) and vegetable glycerin (VG) are the two main ingredients of e-liquids. Their
19 mixture serves as a vehicle for nicotine and a wide range of flavours. The addition of these flavours
20 gives a pleasant taste to the e-liquid consumption.

21 However, a growing body of evidence points to e-cigarettes cytotoxicity. Wattage and voltage
22 settings influence the generation of hazardous components through heating and transformation of the
23 e-liquid (formaldehyde, acrolein and free radical generation) (4) or through decomposition of the
24 metallic systems (copper, lead, and nickel) (5). Although most of the components of e-liquids are
25 food additives considered safe, their safety for inhalation has not yet been confirmed. In addition, e-

1 liquids contain a wide variety of flavours in different PG/VG ratios, with or without nicotine at
2 different concentrations, making e-liquids the most variable element of e-cigarettes. Exposure to e-
3 cigarettes has been shown to trigger cellular markers of oxidative stress, inflammation and cell death
4 (6–8). Therefore, the question of the involvement of the main components of e-liquids in the
5 development of lung diseases such as COPD remains open.

6 The literature contains multiple cell models for toxicological studies of conventional and electronic
7 cigarettes on the bronchial region of the airways (9). However, it has been shown that e-cigarette
8 aerosol particles, like those from conventional cigarettes, predominantly reach the alveolar region of
9 the lung (10), making *in vitro* models of the alveolar-capillary barrier essential for comparing their
10 tissue toxicities. The first *in vitro* models of this barrier were published in the 2000s (11). Since then,
11 other multicellular models, including cells with a structural role or inflammatory cells, have been
12 developed and have been used to study the effect of certain xenobiotics or particles on the alveolar-
13 capillary barrier (12). To our knowledge, few multicellular models mimicking this air-blood interface
14 have been used to explore the effect of electronic cigarettes (13).

15 The aim of our study was to explore the effects of the main constituents of e-liquids such as vehicles
16 (PG or VG and their mixtures) and of five marketed e-liquids with and without nicotine on a alveolar-
17 capillary barrier model.

18 For this purpose, a new cellular model of the alveolar-capillary barrier was constructed and
19 characterised. This model was then exposed to a wide range of e-liquid concentrations. The integrity
20 of the alveolar-capillary barrier was tested by measuring the trans-epithelial/endothelial resistance
21 (TEER) and to explain TEER response, osmolality, occludin expression and cell viability were
22 analysed. Finally, the mechanisms of cell death were explored by measuring apoptosis and autophagy
23 markers, mitochondrial superoxide expression and cytokine and chemokine secretion.

1 **2. Material and methods**

2 **2.1 Chemicals and reagents**

3 RPMI-1640 medium (#21875091), MCDB131 medium (#10372019), penicillin-streptomycin
4 (#15140122), glutamine (#25030024), fetal bovine serum (#10270106), TRIzol® reagent
5 (#15596018), MitoSOX Red® (#M36008) and mouse occludin antibody (#33-1500) were purchased
6 by Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France). Human EGF (#E9644), hydrocortisone
7 (#H0888), secondary antibodies conjugated with goat anti-rabbit Alexa fluor-488 (#AP132JA4) were
8 ordered from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Heparin was ordered from Panpharma
9 (La Selle-en-Luitré, France). The iScript™ cDNA Synthesis Kit (#1708891BUN), the SsoAdvanced
10 Universal SYBR® Green Supermix (#1725274) and all mRNA primers were obtained from Bio-Rad
11 (Marnes-la-Coquette, France). The goat serum (#S2000-100) was ordered from Dutscher
12 (Bernolsheim, France). The MTS assay (#ab197010), CD31 (# ab28364), Bax (#ab32503), Bcl-2
13 (#ab182858), LC3B (#ab192890) and rabbit occludin (#ab216327) antibodies, secondary antibodies
14 goat anti-mouse conjugated with Alexa fluor-647 (#ab150115) and DAPI (#ab104139), were ordered
15 from Abcam (Cambridge, UK). The horseradish peroxidase (HRP) substrate Luminata™
16 (#WBLUC0500) was from Merck Millipore (Molsheim, France). PG, VG, and marketed e-liquids
17 were obtained from Gaiatrend® (Rohrbach-lès-Bitche, France).

18 **2.2 Cell culture**

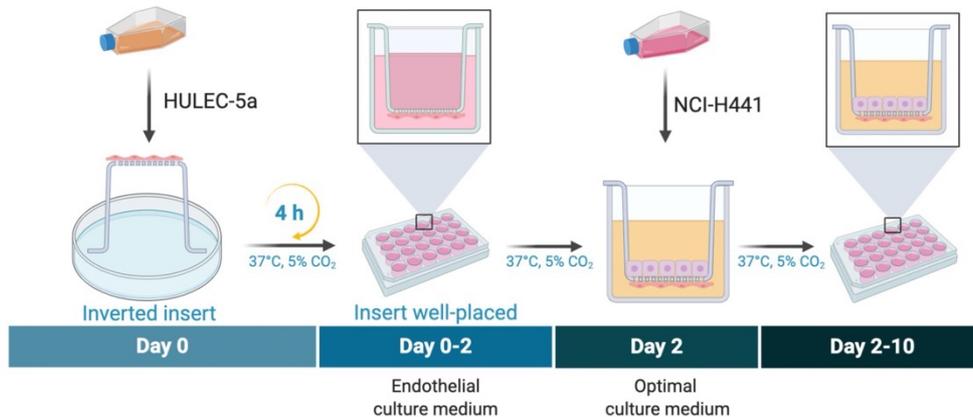
19 **2.2.1 Cell lines**

20 The NCI-H441 cell line (ATCC® HTB-174™) was maintained in RPMI-1640 medium supplemented
21 with 10% of fetal bovine serum and 0.5% of penicillin-streptomycin solution. The HULEC-5a cell
22 line (ATCC® CRL-3244™) was maintained in MCDB131 medium supplemented with human EGF
23 (10 ng/mL), hydrocortisone (1 µg/mL), glutamine (10 mM), fetal bovine serum (10%) and penicillin-
24 streptomycin solution (0.5%). Cells were cultured and passed twice a week, without a passage number
25 higher than 20.

1 **2.2.2 Co-culture of the epithelial cells with the endothelial cells**

2 **2.1.2.1. Co-culture steps**

3 The different steps needed to obtain the alveolar-capillary barrier construction were represented in
4 Figure 1. Briefly, HULEC-5a (5×10^4 cells/well) were placed on the lower surface of inverted
5 translucent inserts for 24-well plates in polyethylene terephthalate (PET) with 0.4 mm pore size and
6 10^8 pores/cm² membrane (Sarstedt, Germany) and incubated for 4 h at 37°C and 5% CO₂. The inserts
7 were then inverted and placed in 24-well plates filled with 0.8 mL HULEC-5a medium per well. A
8 0.2 mL volume of the same medium was placed in the upper compartment. After 48 h, the bottom
9 medium was replaced by “optimal medium” containing MCDB131 medium supplemented with
10 human EGF (10 ng/mL), hydrocortisone (1 µg/mL), glutamine (10 mM), heparin (25 µg/mL), foetal
11 bovine serum (10%) and penicillin-streptomycin solution (0.5%). NCI-H441 (5×10^4 cells/well) were
12 seeded on the upper surface of the insert membranes in 0.2 mL of the same medium. The two cell
13 lines grew to confluence simultaneously over 12 days and fresh medium was replaced every second
14 day for further experiments.



16 **Figure 1 – Steps to build the alveolar-capillary barrier model.** The co-culture model involves NCI-H441 as alveolar epithelial cells
17 (seeding at 5×10^4 cells/well) and HULEC-5a as pulmonary endothelial cells (seeding at 5×10^4 cells/well) on a 24-well plate insert.

18 **2.1.2.2. Functional and phenotype characterisation of the co-culture model**

20 **2.1.2.2.1. Functional role characterised by measuring trans-epithelial endothelial resistance**

1 Trans-Epithelial/Endothelial Resistance (TEER), indicating the paracellular permeability of the NCI-
2 H441/HULEC-5a co-culture, was measured with standard STX2 electrodes connected to the Evom2®
3 epithelial ohmmeter (World Precision Instruments, Hitchin, UK). TEER of inserts with NCI-H441
4 monolayer placed in the upper compartment or HULEC-5a monolayer placed in the lower membrane
5 was also measured.

6 Two alternative co-cultured cell arrangements were tested: first, HULEC-5a cells were placed at the
7 bottom of the 24-well plate and second, HULEC-5a cells were seeded in the same compartment as
8 NCI-H441 cells.

9 TEER values for an insert without cells (blank) were subtracted from the TEER values measured with
10 co-cultures, NCI-H441 and HULEC-5a monolayers. The result was multiplied by the total membrane
11 surface area (0.3 cm²) to obtain the resistance value in Ω.cm². Measurements were performed daily
12 for 12 days.

13 ***2.1.2.2.2. Phenotype characterisation of the co-culture model***

14 ***2.1.2.2.2.1. mRNA***

15 TRIzol® reagent was used for extraction of total RNA from NCI-H441 or HULEC-5a cells. A volume
16 of 2 µL of the extract was used to quantify the total RNA concentration by the NanoDrop™
17 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). In addition, 200 nanograms of
18 total RNA were run for the synthesis of cDNA in a thermal cycler with the iScript™ cDNA Synthesis
19 Kit and then qPCR was performed with the SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix using
20 a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, USA). The relative amount in each sample was
21 normalized with 18S (#qHsaCED0037454), actin-1 (#qHsaCED0005010) and GAPDH
22 (#qHsaCED0038674) levels as house-keeping genes mRNA.

23 ***2.1.2.2.2.2. Western blot***

24 Proteins were extracted from cells with the lysis buffer supplemented with phosphatase and protease
25 inhibitors and denatured using a solution containing β-mercaptoethanol (5 minutes at 95°C). Samples

1 containing 20 µg of proteins were then separated using SDS-PAGE (10%) and transferred onto a
2 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane using a Trans-blot Turbo system. One hour incubation in
3 a non-fat milk powder solution (10% in phosphate buffered saline (PBS) with 0.1% Tween 20
4 detergent) blocked non-specific sites. Then, the membranes were incubated overnight with the
5 primary antibody specific for the target being tested (diluted according to the supplier's
6 recommendations, usually 1:1,000). The next day, the membranes were washed and incubated with
7 the secondary antibody (diluted 1:10,000) conjugated to a horseradish peroxidase (HRP) for 1 hour
8 at room temperature. Revealing the bands of interest was done by chemiluminescence after 3 minutes
9 incubation with the HRP substrate Luminata™, using the ChemiDoc XRS+ detection system (Bio-
10 Rad). The quantification of band intensity was performed by Image Lab™ 6.0 Software (Bio-Rad)
11 relative to total protein in each lane revealed by stain-free method.

12 **2.1.2.2.2.3. Immunostaining**

13 On day 3, 5 and 8 of co-culture on transparent 24-well inserts, cells were fixed with 4%
14 paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Cells were permeabilized with Triton X-100
15 (0.3%) and non-specific sites blocked with 5% goat serum in PBS for 1 hour at room temperature.
16 Then, the inserts were incubated at 4°C overnight with the primary antibodies in 1% bovine serum
17 albumin: occludin (mouse, 1:100) and CD31 antibodies (rabbit, 1:100) were placed in the upper and
18 lower compartment, respectively. The next day, cells were extensively washed and then incubated
19 with the secondary antibodies for 2 hours in 1% bovine serum albumin. As primary antibodies were
20 from different species, secondary antibodies were goat anti-mouse and goat anti-rabbit antibodies
21 coupled with Alexa fluor-647 and Alexa fluor-488, respectively. The inserts were mounted on 35 mm
22 culture dishes with 15 mm glass bottom with aqueous mounting medium containing DAPI which
23 counterstained the nuclei. The cells on both sides of the permeable insert were observed by confocal
24 fluorescent microscopy (Zeiss LSM 800) in z-Stack acquisition.

1 **2.2.3 Impact of co-culture exposure to e-liquid vehicles and marketed e-liquids**

2 **2.1.3.1. Exposure protocol of co-culture to e-liquid components or marketed e-liquids**

3 The validated co-culture model was exposed to increasing concentrations (0.2 to 30%, V/V) of the
4 main components of e-liquids: PG or VG and mixtures of PG/VG (50/50 and 76/24 ratios). The model
5 was also exposed to 5 marketed e-liquids (0.2 to 30%, V/V): 3 e-liquids without nicotine but flavoured
6 with red fruits, mint-eucalyptus or blond tobacco, all in 76/24 PG/VG ratio, and 2 e-liquids with 6
7 mg/mL nicotine and blond tobacco flavour in 50/50 (EL1) and 76/24 (EL2) PG/VG ratio,
8 respectively.

9 Different concentrations of components or mixtures were applied to the upper compartment 8 days
10 after the initiation of co-culture, when the barrier is most effective, and different parameters were
11 measured at 4, 24 or 48 hours after exposure, depending on the parameters.

12 **2.1.3.2. Assessment of membrane integrity fluctuation after different exposures**

13 TEER measures were registered 24 and 48 hours after vehicles and e-liquids exposure to follow
14 barrier integrity fluctuations. As TEER decreased, paracellular permeability increased, demonstrating
15 the failure of barrier capacity. Mannitol, a component known for its hyperosmotic properties, was
16 used as a positive control for the barrier opening. The results were expressed as a percentage of non-
17 exposed co-culture control.

18 **2.1.3.2.1. E-liquids effect on occludin expression, a tight junction protein**

19 Impact of vehicles and e-liquids was tested on the main junction protein, occludin, for NCI-H441 and
20 HULEC-5a monolayers after 24 hours of exposure to low concentrations (0.2, 1 and 2.5%). Cells
21 were seeded on 6-well plates (0.5×10^6 cells/well) and treated with the mixtures on day 4. Western
22 blot was performed as described previously.

23 **2.1.3.2.2. E-liquids hypertonic properties**

24 Osmolality of solutions was determined using the Fiske® Micro Osmometer model 210 (Advanced
25 instruments, Norwood, Massachusetts, USA). The quantification range of this system goes from 0 to

1 2000 mOsm/kg H₂O. Concentrations between 0.2 and 30 % of each mixture (V/V in optimal MCDB
2 medium) were tested.

3 **2.1.3.3. Cell viability after vehicles and e-liquids exposure**

4 The MTS assay was used to evaluate cell viability in the two compartments of the model. 48-hours
5 after exposure to the e-liquid vehicles and mixtures, the upper and lower media were removed, and
6 the co-culture was incubated with fresh medium supplemented with MTS for 3 hours at 37°C and 5%
7 CO₂. Subsequently, 100 µL of the upper and lower media were placed on a 96-well plate and the
8 absorbance of the formazan dye, due to the reduction of the MTS, was measured at 490 nm. The
9 results were expressed as a percentage of the unexposed control.

10 **2.1.3.4. Investigation on the epithelial cell death pathway induced by exposure to e-liquid** 11 **components**

12 **2.1.3.4.1. Apoptosis (Bax/Bcl-2 ratio) and autophagy (LC3B-II)**

13 NCI-H441 were seeded on 6-well plates (0.5 x 10⁶ cells/well) and treated with the mixtures (0.2, 1
14 and 2.5%) on day 4. Twenty-four hours after exposure, NCI-H441 cells were lysed. Apoptosis, by
15 the Bax/Bcl-2 ratio, and autophagy, by the autophagosome marker LC3B-II, were investigated by
16 western blot as described previously.

17 **2.1.3.5. Mitochondrial superoxide produced by the alveolar epithelial cells post-e-liquids** 18 **exposure**

19 The mitochondria-specific fluorescent probe, MitoSOX Red[®], was used to determine the levels of
20 mitochondrial superoxide produced by alveolar epithelial cells after exposure to e-liquids.

21 For this, cells were seeded at 10⁵ cells/well on a black 96-well plate and incubated at 37°C and 5%
22 CO₂ for 48 hours. On the day of the experiment, cells were washed twice with HBSS buffer and
23 incubated 30 minutes with MitoSOX Red[®] (5 µM in HBSS). The cells were washed 3 times in HBSS
24 and basal fluorescence was recorded at 510/580 nm using a Varioskan LUX plate reader (Thermo
25 Fisher Scientific). Immediately after the signal stabilisation, PG/VG vehicles ratio of 76/24 and e-

1 liquids (0.2 to 10 %, V/V) were added to the cell medium. The fluorescence was read every minute
2 over a period of 60 minutes. Results were expressed as a percentage of basal fluorescence (F/F_0). The
3 kinetics of superoxide production was assessed by the area under the curve (AUC) of the MitoSOX
4 Red[®] fluorescence intensity measurement over the 60-minute period.

5 **2.1.3.6. Cytokines and chemokines produced by the alveolar epithelial cells after e-liquids** 6 **exposure**

7 NCI-H441 were seeded on 12-well plates (2×10^5 cells/well) and treated on day 3 with 2.5% of the
8 following e-liquids: PG/VG 76/24, three flavoured e-liquids without nicotine (red fruits, mint-
9 eucalyptus, blond tobacco) and two commercial e-liquids EL1 and EL2 containing 6 mg/mL nicotine
10 and blond tobacco flavour in 50/50 and 76/24 PG/VG ratio respectively. Impact of e-liquids
11 components and mixtures was tested on a panel of 20 cytokines released by the alveolar epithelial
12 cells during the early (4 hours) and late (24 hours) phases of exposure. Cytokine concentrations were
13 measured using the Human Th1/Th2 Cytokine & Chemokine 20-Plex ProcartaPlex Panel 1 which
14 enables exploration of immune function by analysing 20 parameters in a single well using the
15 MAGPIX[®] Luminex instrument (Thermo Fisher Scientific). The parameters analysed were some
16 Th1/Th2 cytokines as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon
17 gamma ($IFN-\gamma$), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-18, tumor necrosis factor
18 alpha ($TNF-\alpha$), some chemokines as eotaxin-1 (CCL11), growth-regulated oncogene-alpha ($GRO-\alpha$,
19 CXCL1), interferon gamma-induced protein 10 (IP-10, CXCL10), monocyte chemoattractant protein
20 (MCP-1 (CCL2)), macrophage inflammatory proteins ((MIP-1 α (CCL3) and MIP-1 β (CCL4)),
21 Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES, CCL5) and stromal
22 cell-derived factor 1 alpha ($SDF1-\alpha$, CXCL12) were analysed. Results were expressed as a percentage
23 of the vehicle control (PG/VG 76/24).

1 **2.3 Statistical analysis**

2 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9[®] (GraphPad Software, San Diego, CA,
3 USA). Differences between groups were analysed using one-way or two-way ANOVA tests and a *p*-
4 value of less than 0.05 was required to consider statistical significance. Data from three or more
5 independent experiments of triplicate or duplicates are reported as mean ± standard deviation or
6 otherwise specified.

7 **3. Results**

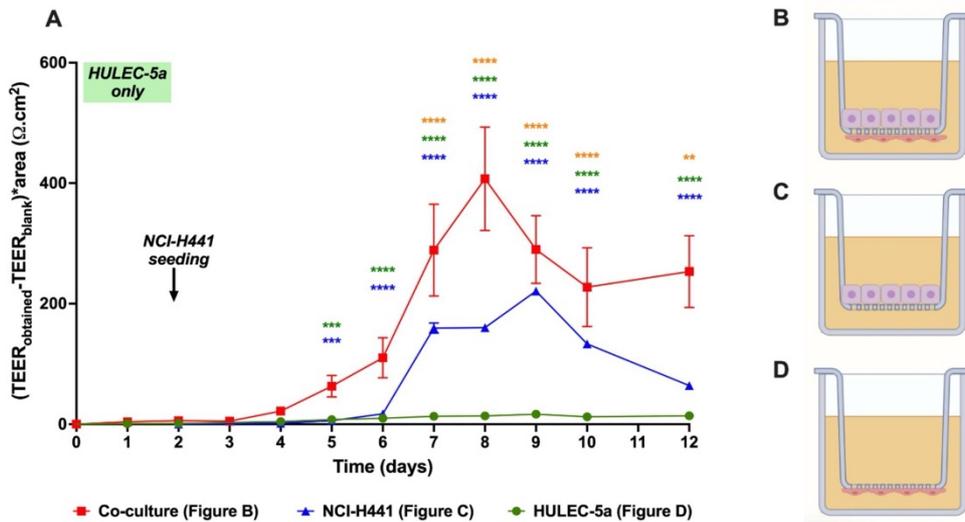
8 **3.1 Characterisation of the alveolar-capillary barrier model**

9 **3.1.1. Functional role of the alveolar-capillary barrier model characterised by measuring**

10 **TEER**

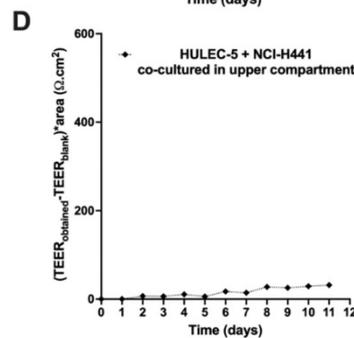
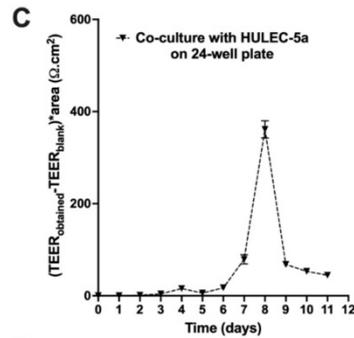
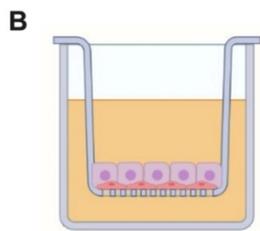
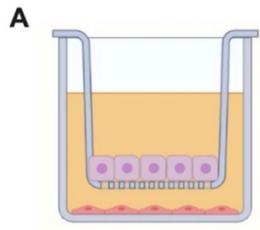
11 The barrier function was tested in different cultures or co-culture configurations (Figure 2 and
12 Supplementary Data 1).

13 As shown in Figure 2, barrier resistance (TEER) progressively increased until day 8 for standard co-
14 culture seeding ($407.3 \pm 85.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$) and until day 9 for NCI-H441 ($220.9 \pm 5.6 \Omega \cdot \text{cm}^2$) and HULEC-
15 5a ($16.5 \pm 2.0 \Omega \cdot \text{cm}^2$) seeded as monolayers. After 8 or 9 days, the increased TEER was followed by
16 a progressive decrease. Figure 2A highlights the predominant role of the NCI-H441 line in forming
17 an effective barrier compared to endothelial cells monolayer. Furthermore, between day 5 and day
18 12, the TEER data of the co-culture was not the result of the addition of the TEER of its two
19 components, but the sum of the values of each monolayer multiplied by 1.2 to 4.1, suggesting a
20 reinforcement of the barrier in the presence of both cell lines.



1
 2 **Figure 2 – Functional validation of the alveolar-capillary barrier model by measuring TEER:** (A) Evolution of
 3 transepithelial/endothelial resistance (TEER) over time for the co-culture arrangements described in figures (B-D). Initial cell density
 4 for HULEC-5a on day 0 and NCI-H441 monolayer and co-culture on day 2 were 5×10^4 cells/well. Statistical analysis: Comparison
 5 of NCI-H441 (\blacktriangle and \ast) and HULEC-5a (\bullet and \ast) monolayers versus the standard co-culture (\blacksquare) and NCI-H441 monolayer versus
 6 HULEC-5a monolayer (\ast) using a 2-factor ANOVA test followed by Tukey's multiple comparison test from three independent
 7 experiments of triplicates. $\ast p < 0.05$; $\ast\ast p < 0.01$; $\ast\ast\ast p < 0.001$; $\ast\ast\ast\ast p < 0.0001$.

8 Alternative cell arrangements were tested, and the results were shown in Supplementary Data 1.
 9 Briefly, when HULEC-5a cells were placed on the bottom of the 24-well plate, TEER curve showed
 10 a slowly and progressive increase until day 7. On day 8, TEER values reached a peak of
 11 $361.2 \pm 18.9 \Omega \cdot \text{cm}^2$, which was significantly lower than the TEER values observed with standard co-
 12 culture model on day 8 ($407.3 \pm 85.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $p < 0.0001$). In the second arrangement, HULEC-5a
 13 cells were seeded in the same compartment as NCI-H441 cells and, in this case, the TEER values
 14 remained low and no peak was observed, suggesting a difficulty for both cell lines to collaborate in
 15 the construction of an effective alveolar-capillary barrier when seeded together without a structure
 16 mimicking a basal lamina.
 17 For further experiments, only standard co-cultures with TEER values between 300 and $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$
 18 were exposed to the e-liquid components or mixtures on day 8.



1

2 **Supplementary Data 1 – Functional evaluation of other alveolar-capillary barrier model patterns:** (A) and (B) Seeding patterns
 3 for co-culture with NCI-H441 epithelial cells (squared purple cells) and HULEC-5a endothelial cells (flat orange cells). (C) and (D)
 4 Evolutions of TEER over the time for the alternative co-culture arrangement described in figures (A) and (B), respectively. Each
 5 measurement is the result of 3 experiments of triplicates.

6 3.1.2. Phenotype characterisation of the alveolar-capillary barrier model

7 Specific markers were screened for each cell line by RT-qPCR, Western blot or immunofluorescence
 8 allowing the phenotype characterisation of NCI-H441 as alveolar type II cells, and HULEC-5a as
 9 endothelial cells. The specific markers selected for alveolar type II cells were surfactant A and D,
 10 aquaporin 5 and thyroid transcription factor 1 (TTF-1) and those selected for endothelial cells were
 11 CD-31, eNos and von Willebrand factor (vWF). Table 1 resumes the expression of these markers for
 12 the two cell lines.

13

14

1 **Table 1 – Phenotype characterisation for the epithelial alveolar NCI-H441 cells and the lung microvascular endothelial**
 2 **HULEC-5a cells.**

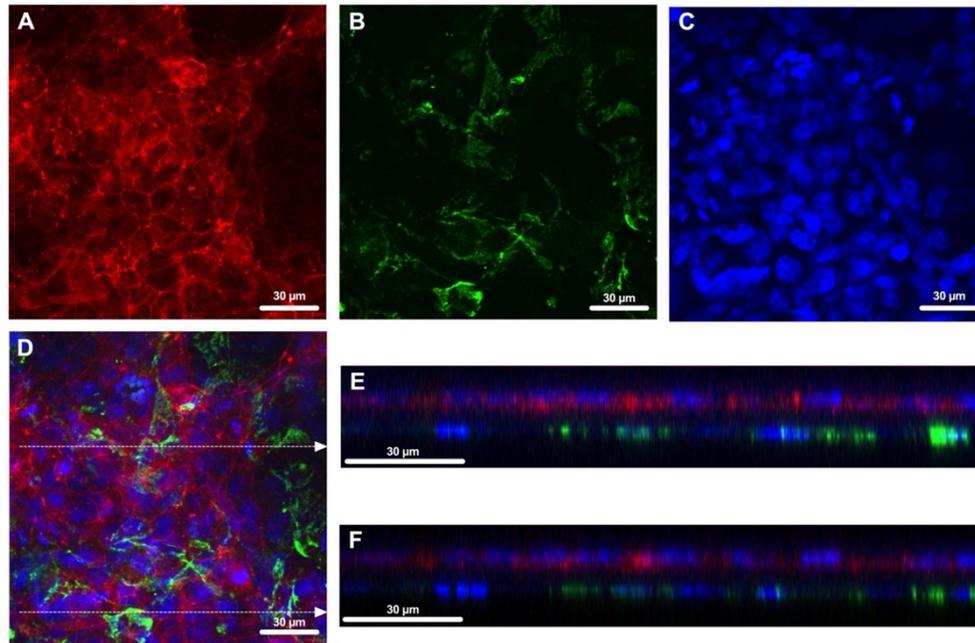
Marker	Role	mARN		Protein (WB + IF)		
		Reference (Bio-Rad)	Presence	Reference	Presence	
NCI-H441	SP-A	Surfactant protein A	qHsaCED0005710	++	ab51891 (Abcam)	+
	SP-D	Surfactant protein D	qHsaCID0012776	+	ab17781 (Abcam)	++
	AQP-5	Form of a water-specific channel	qHsaCED0045948	++	ab92320 (Abcam)	++
	TTF-1	Thyroid transcription factor-1, critical regulator of transcription for the surfactant proteins	qHsaCED0044085	++	ab76013 (Abcam)	++
	Occludin	Major component of the tight junctions	qHsaCED0038290	+++	ab216327 (Abcam)	+++
	ZO-1	Component of the tight junctions	qHsaCID0018062	++	33-9100 (Thermo Fisher)	+
HULEC-5a	CD31	Sensitive and specific marker for vascular differentiation	-	ND	ab28364 (Abcam)	+++
	eNos	Endothelial nitric oxide synthase	qHsaCID0015042	+++	ab76198 (Abcam)	+
	vWF	von Willebrand factor, product of endothelial cells	qHsaCED0043330	++	ab6994 (Abcam)	+++
	Occludin	Major component of the tight junctions	qHsaCED0038290	+	ab216327 (Abcam)	+/-
	ZO-1	Component of the tight junctions	qHsaCID0018062	+	33-9100 (Thermo Fisher)	+

3 mRNAs were quantified relative to the level of 18S, actin-1 and GAPDH house-keeping genes. Proteins were quantified relative to total protein in
 4 each lane revealed in western blot. WB: Western blot, IF: Immunofluorescence

5 +/-: marker very weakly present; +: marker weakly present; ++: marker moderately present; +++: marker strongly present, ND = Not determined.

6

7 The presence of occludin and ZO-1, proteins playing a crucial role in cell-cell tight junctions was
 8 also searched. While ZO-1 was moderately and weakly found in NCI-H441 and HULEC-5a,
 9 respectively, the two cell lines showed a positive but much varying expression of occludin. As NCI-
 10 H441 cells very highly expressed occludin, HULEC-5a revealed a very low expression. Finally,
 11 figure 3 showed the localisation of CD31 in HULEC-5a cells and occludin in NCI-H441 cells, two
 12 major membrane proteins of each cell line and illustrated their distribution around the PET
 13 membrane. The two cell lines were well distributed on each side of the membrane without apparent
 14 interactions one with the other. Anyway, this co-culture model possesses all the functional and
 15 phenotypic characteristics of the alveolar-capillary barrier and can subsequently be used for e-
 16 cigarette exposure.



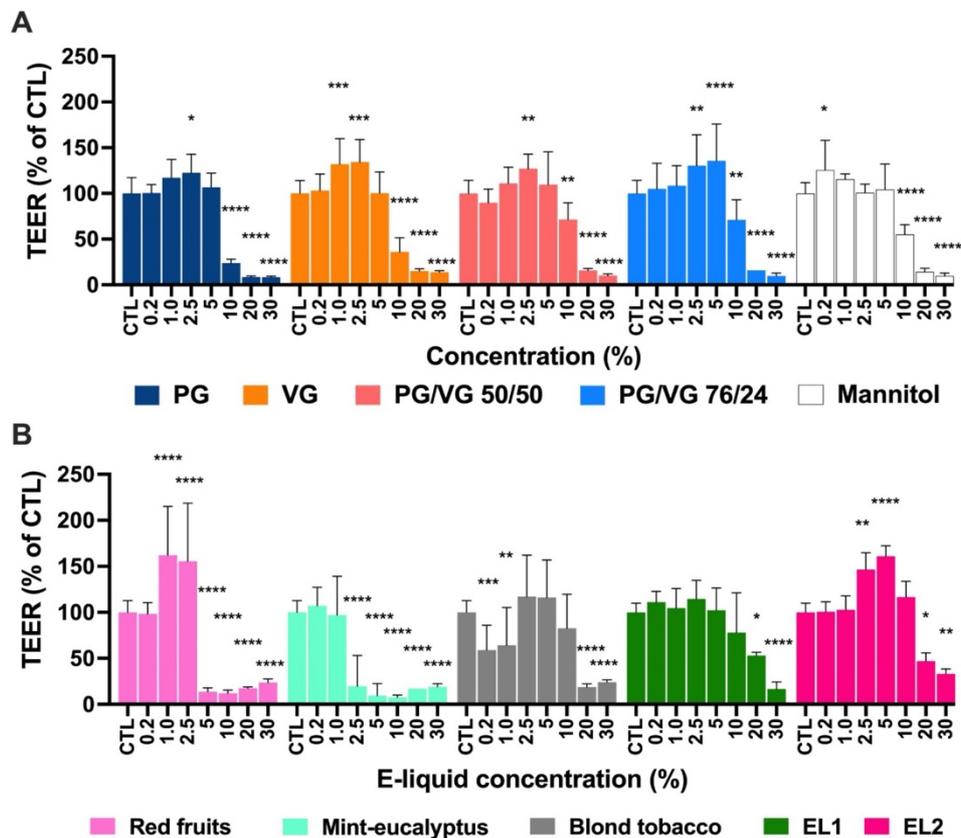
1
 2 **Figure 3 – Immunofluorescence of the alveolar–capillary barrier model.** (A) The epithelial NCI-H441 cells were stained with
 3 occludin (red) in upper compartment, (B) the endothelial HULEC-5a cells were stained with CD31 marker (green) in lower
 4 compartment, (C) nuclei were stained with DAPI (blue). The image (D) illustrates the z-projection of the slices obtained with a Zeiss
 5 confocal microscope for the 3 markers. The images (E and F) illustrate two orthogonal views, indicated by white arrowed lines, of (D).
 6 The confocal threshold was arbitrarily set so that the very weak signal of occludin from HULEC-5a cells was not visible in the lower
 7 compartment.

8 **3.2 Effects of the exposure of the co-culture to e-liquid vehicles (PG and VG) and**
 9 **flavoured marketed e-liquids with or without nicotine**

10 **3.2.1. E-liquids modified alveolar–capillary barrier integrity**

11 Exposure (24 or 48 hours) to increasing concentrations of e-liquid’s vehicles (PG, VG or 50/50 and
 12 76/24 PG/VG ratios) triggered a biphasic effect on TEER values. For low concentrations, between
 13 1% and 5%, an increase in resistance was observed, then higher concentrations altered the integrity
 14 of the barrier, leading to a decrease of more than 50% of TEER values for concentrations above 10%
 15 for PG and VG alone, and above 20% for 50/50 and 76/24 PG/VG ratios, compared to untreated cells.
 16 Mannitol, a compound known for its hypertonic properties that break down barrier integrity, showed

1 a similar pattern with a drop of more than 50% in TEER values for a concentration above 10% (Figure
 2 4A).



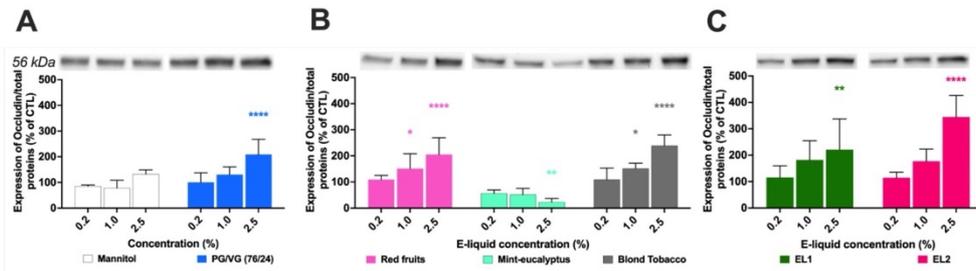
3
 4 **Figure 4 – Histograms of TEER's values of alveolar-capillary barrier model after 48 hours exposure to vehicles or marketed**
 5 **e-liquids.** TEER's values indicate the paracellular permeability of the NCI-H441/HULEC-5a co-culture and in consequence the barrier
 6 integrity. (A) represents TEER measures after 48 hours of exposure to vehicles PG and VG alone or in ratios of 50/50 and 76/24. (B)
 7 represents TEER measures after 48 hours of exposure to marketed flavoured e-liquids without nicotine; red fruits, mint-eucalyptus and
 8 blond tobacco. EL1 and EL2 contain blond tobacco flavour, 6 mg/mL of nicotine and ratios of 50/50 and 76/24 of PG/VG, respectively.
 9 Mannitol, a hypertonic product, was used as a positive control of barrier permeabilization in (A). Histograms represent mean \pm SD
 10 from at least three independent experiments of triplicates. Comparison between different exposures versus untreated cells was
 11 performed using a 2-factors ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Sidák's multiple comparisons test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p <$
 12 0.001 ; **** $p < 0.0001$.

13 Exposure to e-liquids with flavours were also tested (Figure 4B). When the red fruits and mint-
 14 eucalyptus flavours were present in an e-liquid with a PG/VG ratio of 76/24, the concentrations
 15 required to trigger a drop of more than 50% in TEER were 5% and 2.5% respectively, suggesting a
 16 greater role of these flavours in achieving barrier integrity impairment compared to the ratio of 76/24

1 of vehicles. In contrast, the presence of blond tobacco flavour in the 76/24 PG/VG ratio decreased
2 the TEER values for the 0.2 and 1% and for the 20 and 30% concentrations. However, the addition
3 of nicotine at 6 mg/mL in the latter e-liquid restored the biphasic pattern for EL2 but not EL1. In both
4 cases, nicotine neutralises blond tobacco flavour effect on barrier permeability at low percentages of
5 flavours (0.2 to 1%). Furthermore, while concentrations above 20% continued to decrease of more
6 than 50% the TEER for EL1, a concentration of 30% was necessary to cause a decrease of more than
7 50% in TEER for EL2 (Figure 4B).

8 **3.2.1.1. Low concentrations of e-liquids increase occludin expression and barrier integrity**

9 To further investigate the effect of lower concentrations of vehicles and e-liquids on cell membrane
10 rearrangements and cell-cell junctions, the changes in occludin expression, a tight junction protein,
11 were studied in both cell types. An increase in occludin expression was observed in NCI-H441
12 monolayers exposed to concentrations from 0.2 to 2.5% of 76/24 ratio of vehicle, red fruits and blond
13 tobacco flavoured e-liquids compared to untreated cells. In contrast, exposure of alveolar epithelial
14 cells to increasing concentrations of mint-eucalyptus e-liquid highly decreased occludin expression,
15 with protein expression being statistically lower at the 2.5% concentration ($p = 0.0013$) compared to
16 control. Although there was a tendency for occludin expression to increase after 24 hours of treatment
17 with 2.5% of mannitol, no significant difference was observed compared to control ($p = 0.2610$).
18 Interestingly, the presence of nicotine in the 76/24 blond tobacco e-liquid (EL2) enhanced the
19 phenomenon by increasing occludin expression. Thus, occludin expression after exposure to the 2.5%
20 concentration was statistically higher for the blond tobacco e-liquid with nicotine compared to the
21 same e-liquid without nicotine ($p = 0.0245$). (Figure 5).

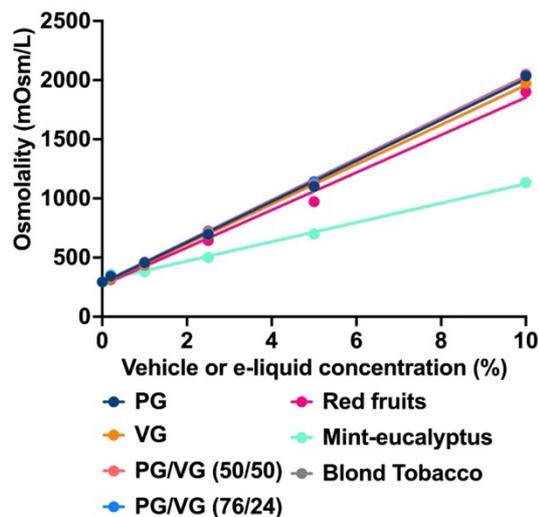


1
2 **Figure 5 – Western blots showing the expression of occludin, a tight junction protein, in epithelial alveolar NCI-H441 cells**
3 **treated for 24 hours with increasing concentrations of vehicle or marketed flavoured e-liquids.** Cells were treated for 24 hours
4 with increasing concentrations of (A) PG/VG 76/24 and mannitol, a hypertonic product, used as a control, (B) marketed flavoured e-
5 liquids red fruits, mint-eucalyptus, and blond tobacco without nicotine (C) and blond tobacco flavoured e-liquid with 6 mg/mL of
6 nicotine in ratios of 50/50 and 76/24 of PG/VG for EL1 and EL2, respectively. The relative to total proteins density values of occludin
7 are shown as histograms represented with mean \pm SD from at least three independent experiments. Comparison between different
8 exposures versus untreated cells was performed using a 2-factors ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Šidák's multiple comparisons
9 test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

10 For HULEC-5a endothelial cells that weakly express occludin, a 24-hour exposure to flavoured e-
11 liquids in a 76/24 ratio did not modify occludin expression (data not shown).

12 3.2.1.2. Hypertonic proprieties of e-liquids disturbed the tight junctions of the barrier

13 Hyperosmotic solutions like mannitol are known to decrease the TEER of barriers by increasing their
14 permeability. To investigate the effect of higher concentrations of vehicles and e-liquids, the
15 osmolality of the co-culture medium was measured. The initial osmolality of the medium was similar
16 to physiological values (around 294 mOsm/L). However, the solutions osmolality showed similar
17 curves for PG, VG, and PG/VG ratios 50/50 and 76/24, with a value above 500 mOsm/L being
18 reached above concentrations of 2.5%. In contradiction to these data, the e-liquid containing mint-
19 eucalyptus flavour in a PG/VG ratio of 76/24 showed a lower osmolality and values above 500
20 mOsm/L were reached above the concentration of 5% (Supplementary data 2). This latter
21 phenomenon could be explained by the higher freezing point of menthol compared to PG/VG
22 mixtures.



1

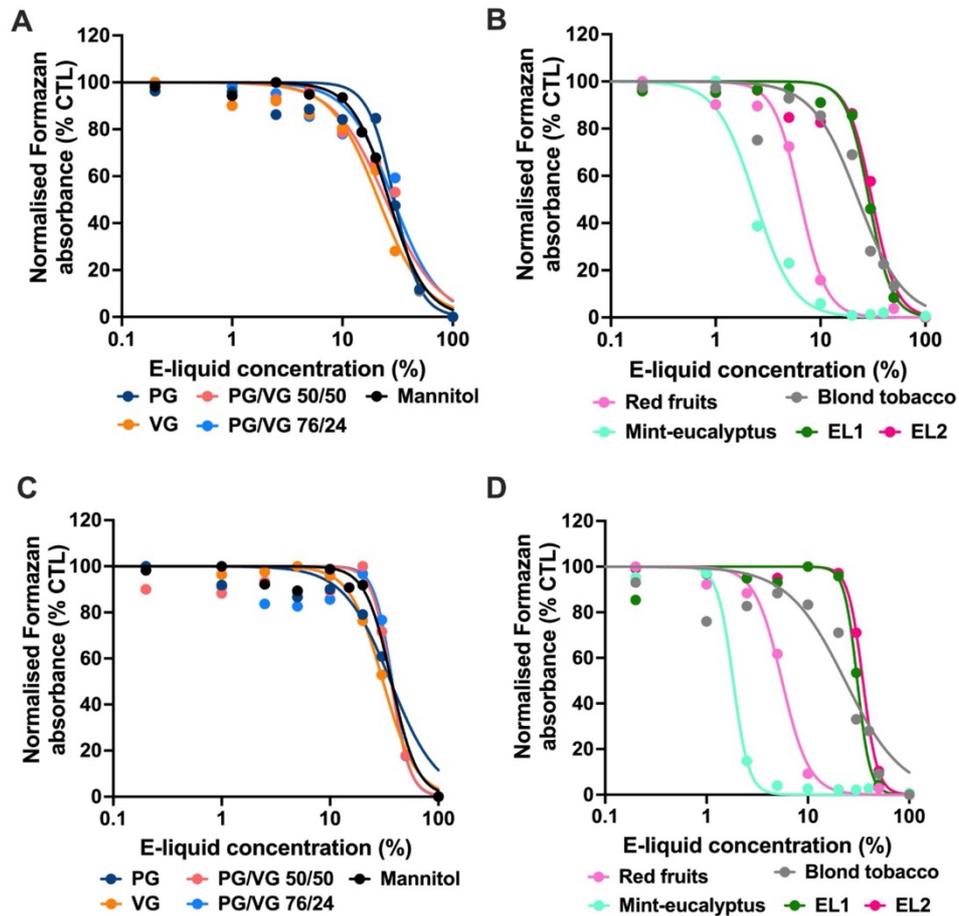
2 **Supplementary data 2 – Osmolality of the medium containing different percentages of vehicle or marketed e-liquids.** The
 3 osmolality of solutions was determined by using freezing point depression. The quantification range of this system goes from 0 to 2000
 4 mOsm/L H₂O. A correlation is observed between osmolality and concentrations from 0.2 to 10 % of each mixture (V/V in optimal
 5 MCDB medium). The osmolality was above the limit of quantification for concentrations above 10%. Mint-eucalyptus flavour in a
 6 PG/VG ratio of 76/24 showed a different slope certainly due to the higher menthol freezing point compared to PG and VG freezing
 7 points.
 8

9 3.2.2. E-liquids reduced cell viability

10 To determine whether the decrease in TEER was only due to a response to the hyperosmolality of the
 11 medium which opens the barriers or also to cell death, an MTS viability test was performed on the
 12 upper and lower compartments of the co-culture post- exposure to PG and VG vehicles alone or in a
 13 ratio of 50/50 and 76/24, and then to marketed flavoured e-liquids with and without nicotine. In the
 14 upper compartment of the co-culture (NCI-H441 cells), the cell viability was reduced by 50% after
 15 exposure to 29.5%, 21.2%, 24.6%, 28.8% of PG alone, VG alone, PG/VG 50/50 and PG/VG 76/24
 16 ratios, respectively (Figure 6A). Addition of flavours decreased the cell viability for lower
 17 concentrations of marketed e-liquids compared to the vehicle control (PG/VG 76/24 ratio).
 18 Concentrations of 6.4% of red fruits, 2.4% of mint-eucalyptus and 22.9% of blond tobacco were
 19 sufficient to reduce the viability by 50%. Mannitol triggered 50% drop of viability at a concentration

18

1 of 26.4% (Figure 6B). Similar results were obtained in the lower compartment (HULEC-5a cells) of
 2 the co-culture (Figure 6C and D).

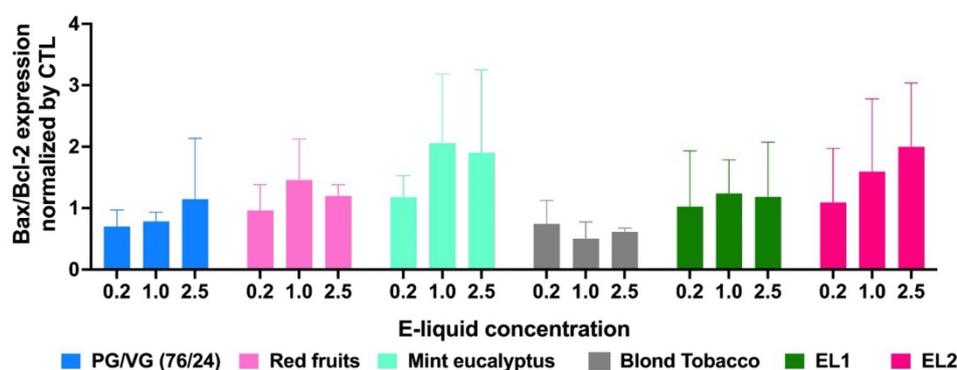


3
 4 **Figure 6 – Cell viability with increasing percentage of vehicles or marketed e-liquids in co-culture upper (A, B) and lower (C, D) compartments.** Cell viability of NCI-H441 and HULEC-5a cells was measured with MTS viability assay. After a 48-hours
 5 exposure, the formazan dye absorbance decreased with the increase concentration of (A) mannitol, vehicles PG and VG alone or in
 6 ratios of 50/50 and 76/24, and (B) marketed flavoured e-liquids red fruits, mint-eucalyptus and blond tobacco without nicotine. EL1
 7 and EL2 contain blond tobacco flavour, 6 mg/mL of nicotine and ratios of 50/50 and 76/24 of PG/VG, respectively. Each point on the
 8 curves represents triplicates of at least 3 independent experiments. Dose-effect curves are fitted from a logarithmic (agonist) versus
 9 normalized response model allowing for variable slope of the curves through a least squares analysis calculation.
 10

11

12 **3.2.3. E-liquids induced epithelial cell death by autophagy but not apoptosis**

1 NCI-H441 monolayers were exposed to increasing concentrations of vehicles and flavoured e-liquids.
 2 No significant increase in Bax/Bcl-2 ratio was observed for concentrations between 0.2 to 2.5%,
 3 showing that apoptosis was not the primary mechanism inducing cell death in cells constituting the
 4 alveolar capillary barrier after exposure to e-liquids (Supplementary data 3).

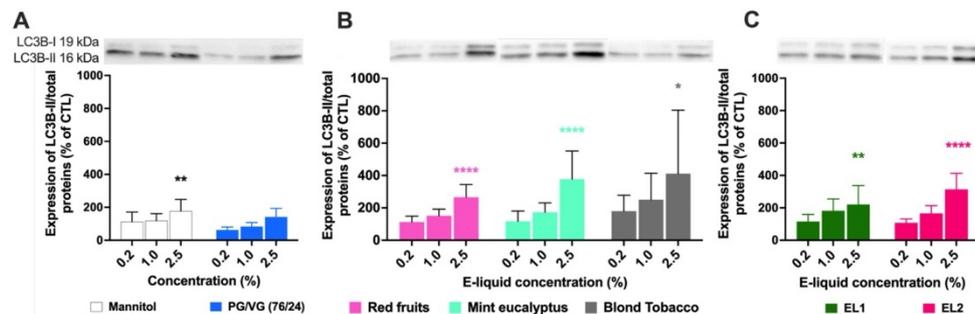


5 **■ PG/VG (76/24) ■ Red fruits ■ Mint eucalyptus ■ Blond Tobacco ■ EL1 ■ EL2**
 6 **Supplementary Data 3 – Bax/Bcl-2 ratio in NCI-H441 epithelial cells after 24-hour exposure to vehicle (PG/VG 76/24) or**
 7 **flavoured e-liquids in a 76/24 ratio.** No significant increase in Bax/Bcl-2 ratio was observed for concentrations between 0.2 and
 8 2.5%. EL1 and EL2 contain blond tobacco flavour, 6 mg/mL of nicotine and ratios of 50/50 and 76/24 of PG/VG, respectively.
 9 Histograms represent mean ± SD from at least three independent experiments. Comparisons between different exposures *versus*
 10 untreated cells were performed using a 2-factors ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Šidák's multiple comparisons test.
 11

12 However, the expression of LC3B-II protein, the most specific marker of the autophagic process (14)
 13 showed a weak increasing trend after vehicle exposure with a PG/VG ratio of 76/24, but not
 14 statistically different ($p = 0.1923$, Figure 7A). More interestingly, e-liquids containing red fruits and
 15 mint-eucalyptus flavours in a 76/24 PG/VG ratio significantly enhanced LC3B-II protein expression
 16 for the 2.5% concentration of red fruits ($p < 0.0001$ and $p = 0.0029$) and mint-eucalyptus ($p < 0.0001$
 17 and $p = 0.0011$) compared to untreated cells and 2.5% PG/VG 76/24 ratio, respectively (Figure 7B).
 18 These results showed an amplification of the autophagic mechanism in the presence of red fruits and
 19 mint-eucalyptus flavours. Due to a large variability in the data for the blond tobacco e-liquid, the
 20 accentuation of the autophagic pathway compared to the PG/VG vehicle (76/24, 2.5%) could not been
 21 demonstrated. However, the comparison with untreated cells was statistically significant ($p = 0.0147$).
 22 In another hand, the presence of nicotine with this last flavour significantly increased LC3B-II

1 expression in the 50/50 and 76/24 PG/VG e-liquids compared to untreated cells ($p = 0.0100$ and $p <$
 2 0.0001 , respectively). Nevertheless, no difference could be demonstrated between blond tobacco e-
 3 liquids with and without nicotine, thereby making it difficult to conclude on the role of blond tobacco
 4 flavour or nicotine in enhancing autophagy by these e-liquids (Figure 7C).

5



6

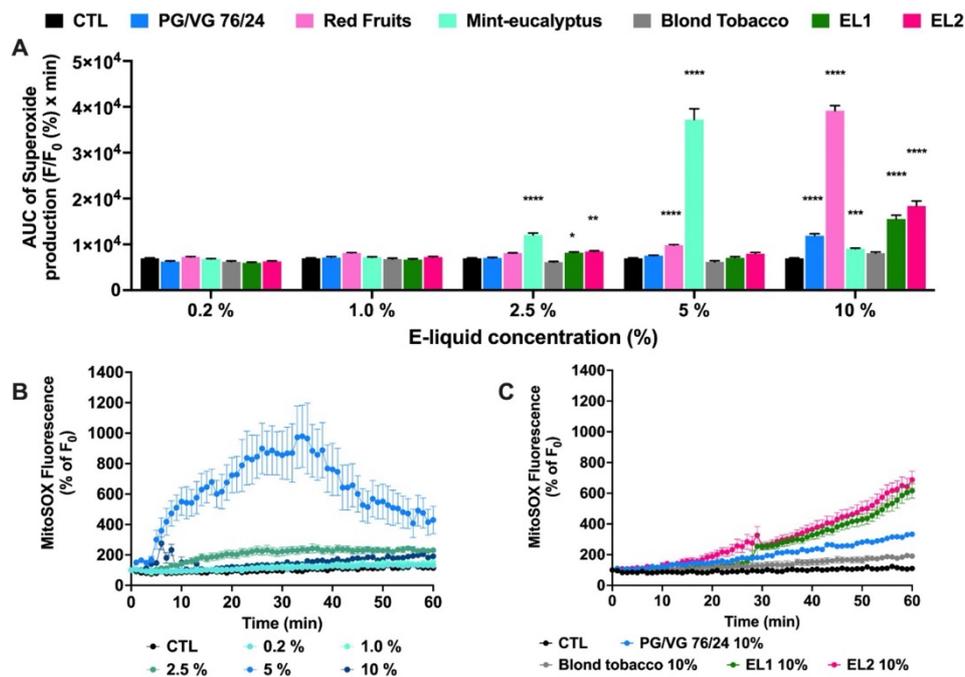
7 **Figure 7 – Expression of LC3B-II, an autophagosome marker, in epithelial alveolar NCI-H441 cells 24 hours after e-liquids**
 8 **exposure. (A-C)** Western blot analyses showing the expression of LC3B-I and -II, autophagosome proteins and histograms of LC3B-
 9 **II bands quantification, in epithelial alveolar NCI-H441 cells. Cells were treated for 24 hours with increasing concentrations of (A)**
 10 **mannitol, PG/VG 76/24, (B) marketed flavoured e-liquids red fruits, mint-eucalyptus, and blond tobacco without nicotine and (C)**
 11 **blond tobacco flavoured e-liquid with 6 mg/mL of nicotine in ratios of 50/50 and 76/24 of PG/VG for EL1 and EL2, respectively.**
 12 **Mannitol, a hypertonic product, was used as a control. The relative to total proteins density values of LC3B-II (16 kDa) were shown**
 13 **in histograms which represented mean \pm SD from at least three independent experiments. Comparison between different exposures**
 14 **versus untreated cells was performed using a 2-factors ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Šidák's multiple comparisons test.**
 15 *** $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.**

16 3.2.4. E-liquids induced mitochondrial oxidative stress

17 Numerous studies have shown that ROS derived from mitochondria are major inducers of autophagy
 18 and in turn, autophagy serves to reduce oxidative damage (15). MitoSOX Red[®] was used to follow
 19 the level of mitochondrial superoxide production. The results of the kinetic curves of superoxide
 20 production in alveolar epithelial cells were expressed by calculating the AUC. Figure 8A showed that
 21 the 76/24 vehicle ratio did not significantly increase mitochondrial stress for concentrations up to 5%,
 22 but that the 10% concentration triggered a 41.4% increase compared to untreated cells. The addition
 23 of flavourings affected the production of oxidative stress, with a significant increase in AUC starting
 24 at 2.5% for the mint-eucalyptus e-liquid and 5% for the red fruits e-liquid. A reduction in superoxide
 25 anion production was observed for 10% mint-eucalyptus e-liquid compared to 5%, which was

21

1 explained by the time-fluorescence curve showing a sharp increase until the eighth minute, followed
 2 by a decrease in fluorescence due to cell death (Figure 8B). Interestingly, the blond tobacco flavour
 3 in the 76/24 vehicle ratio did not increase cellular production of superoxide anions up to the 10%
 4 concentration compared to untreated cells. Moreover, the 10% concentration of the blond tobacco e-
 5 liquid triggered 32.3% less oxidative stress than the 10% of PG/VG 76/24 concentration (Figure 8A
 6 and C). In contrast, the presence of nicotine at 6 mg/mL in the blond tobacco flavoured e-liquid
 7 induced the production of oxidative stress from the 2.5% concentration level, at both 50/50 and 76/24
 8 PG/VG ratios, showing the effect of nicotine as an inducer of mitochondrial oxidative stress (Figure
 9 8C).



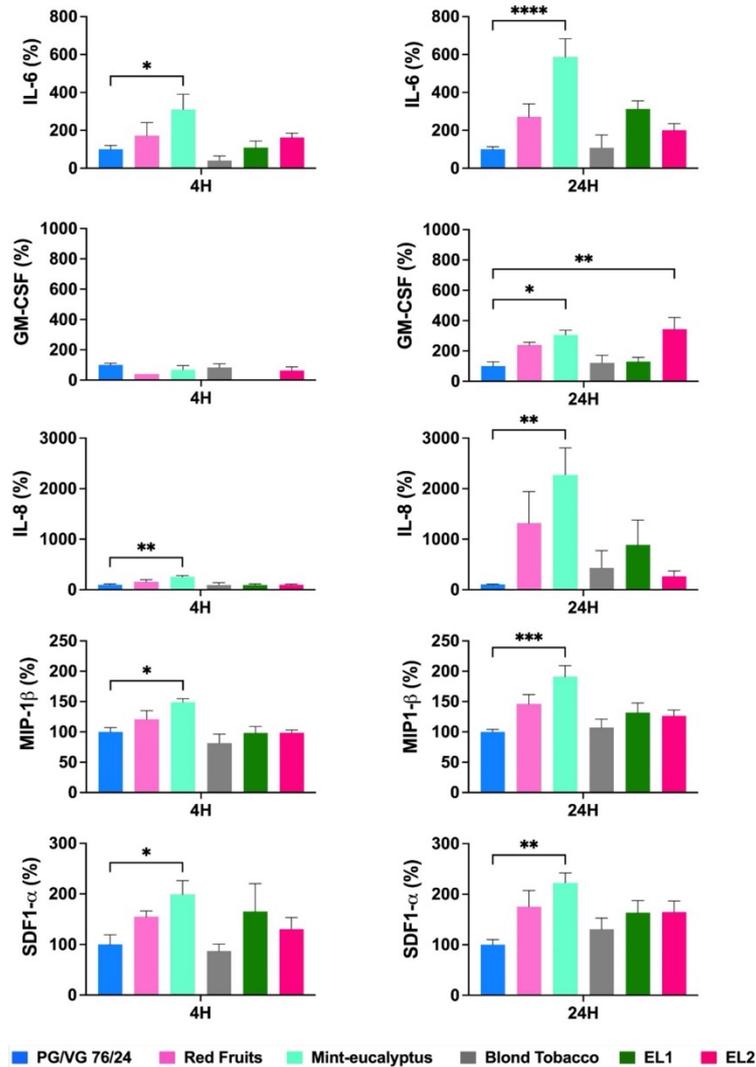
10

11 **Figure 8 – Effects of increasing e-liquid concentrations on mitochondrial oxidative stress of alveolar NCI-H441 epithelial**
 12 **monolayers measured by MitoSOX[®] Red. (A)** The area under the curve (AUC) of superoxide production kinetic curve for 1 hour
 13 using the MitoSOX[®] Red fluorescent signal. **(B)** illustrates fluorescence kinetic curves obtained with increasing concentrations of mint-
 14 eucalyptus e-liquid and the rapid (< 8 min) cell exhaustion after adding 10% of this e-liquid. **(C)** illustrates the role of nicotine as an
 15 oxidative stress inducer in EL1 and EL2 which contain blond tobacco flavour, 6 mg/mL of nicotine and ratios of 50/50 and 76/24 of
 16 PG/VG, respectively. Histograms represent mean ± SD from at least three independent experiments. Comparisons between different
 17 exposures *versus* untreated cells were performed using a 2-factors ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Šidák's multiple comparisons
 18 test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

22

1 **3.2.4. E-liquids increased the excretion of inflammatory cytokines**

2 The secretion of inflammatory cytokines is known as a molecular stress response for epithelial (NCI-
3 H441) cells. For example, IL-6 released from pulmonary epithelial cells, could promote cell
4 autophagy (16). A total of 20 cytokines were measured with a multiplex method in cell supernatant
5 collected from NCI-H441 monolayers treated with 2.5% of e-liquids for 4 and 24 hours. Overall, only
6 the levels of five cytokines were consistently increased after mint-eucalyptus e-liquid exposure
7 compared to the vehicle control, with four in the early phase (IL-6, IL-8, MIP-1 β and SDF1- α) and
8 five in the late phase (IL-6, IL-8, MIP-1 β , SDF1- α and GM-CSF) (Figure 9). Level of GM-CSF was
9 also significantly increased after exposure to the blond tobacco e-liquid with 6 mg/mL of nicotine
10 (76/24 PG/VG ratio), but not after exposure to blond tobacco e-liquid without nicotine, showing that
11 nicotine certainly had a role in GM-CSF release increase. However, while the most inflammatory e-
12 liquid contained mint-eucalyptus flavour, red fruits flavour showed a tendency to increase the
13 secretion of IL-6, IL-8, MIP-1 β , SDF1- α and GM-CSF. Otherwise, the levels of IP-10, MCP-1, MIP-
14 1 α and RANTES were not different from those of vehicle control after 4 or 24 hours of exposure and
15 eleven out of 20 cytokines were below the lower limit of quantification (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2,
16 IL-4, IL-5, IL-12p70, IL-13, IL-18, GRO- α and eotaxin-1).



1

2 **Figure 9 – Cytokine excretion after exposure of epithelial NCI-H441 cells to 2.5% of e-liquids.** Histograms illustrate the levels of
 3 IL-6, IL-8, MIP-1 β , SDF1- α and GM-CSF released by NCI-H441 cells after 4 and 24 hours of exposure to e-liquids. EL1 and EL2
 4 contain blond tobacco flavour, 6 mg/mL of nicotine and ratios of 50/50 and 76/24 of PG/VG, respectively. Histograms represent
 5 mean \pm SD from triplicates of two independent experiments. Comparisons between different exposures *versus* the vehicle control was
 6 performed using a 1-factor ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ***
 7 $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

8 **4. Discussion**

9 In this work, the effects of the main components of e-cigarette liquid were demonstrated on a
 10 functionally and phenotypically characterised cell model of the alveolar-capillary barrier. Thus, the

24

1 results showed that the response of exposed cells varied considerably depending on the components
2 and their mixture in e-liquids, with flavours playing a crucial role in the loss of barrier integrity,
3 inflammation, oxidative stress and cell death. Indeed, after exposure to e-liquids, epithelial cells, the
4 first cells to be exposed to aggression by e-liquids, responded with an increase in oxidative stress as
5 evidenced by an escalation of mitochondrial-generated superoxide and the release of some cytokines
6 and chemokines. However, low exposures to e-liquids or mixtures increased the expression of
7 occludin, a tight junction protein, thus enhancing the barrier role in both cell lines. An increase in
8 autophagy processes was also observed, corresponding to a stress response of the cells. Finally, at
9 higher exposures to e-liquids, a loss of alveolar capillary barrier integrity and cell death in both cell
10 lines occurred.

11 **4.1. Interest of a cell alveolar-capillary barrier model**

12 The alveolar-capillary barrier is involved in many aspects of normal lung physiology, and the loss of
13 its integrity is a central characteristic of lung disorders such as smoking-related COPD, but also E-
14 cigarette or Vaping Use-Associated Lung Injury (EVALI) (www.cdc.gov/EVALI). Thus, we first
15 developed an *in vitro* technique of a functional, robust, and reproducible co-culture model mimicking
16 the physiological situation of an alveolo-capillary unit, particularly fostering the 3 Rs principle.

17 The model is a co-culture of the human distal lung epithelial cell line isolated from a papillary
18 adenocarcinoma, NCI-H441, with the human pulmonary microvascular endothelial cells
19 immortalised by the SV40 large T antigen transfection, HULEC-5a, placed on the upper and lower
20 sides of a pored membrane respectively. In the phenotypic characterisation of the model, NCI-H441
21 cells were confirmed to possess specific markers of alveolar epithelial cells, including surfactant
22 proteins and water transporters (AQP-5). Also, HULEC-5a cells express endothelial markers as
23 CD31, eNos and von Willebrand factor. The two cell lines also express tight junction proteins
24 (Occludin and ZO-1). The measurement of TEER is a technique that assesses the ohmic resistance
25 between the upper and lower compartments of a cell insert, while preserving the characteristics and

1 growth of cell populations. It therefore indicates the degree of integrity of the intercellular junctions
2 and allows a reliable characterisation of the barrier function *in vitro*. This technique has been widely
3 used in other barrier models like blood-brain barrier (17). Functional characterisation of our cell
4 model confirmed that it acts as a barrier by establishing a high TEER ($407.3 \pm 85.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$) and
5 highlighted that NCI-H441 cells are primarily responsible for the barrier function by providing the
6 greatest resistance to the model compared to the HULEC-5a cells. NCI-H441 cells have been widely
7 used as a model of the alveolar epithelium and similar TEER values were obtained after 10 days of
8 co-culture with the angiosarcoma cell line ISO-HAS-1 ($380 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (18) or with primary human
9 pulmonary microvascular endothelial cells ($565 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (19). Furthermore, co-culture of NCI-H441
10 with HULEC-5a on either side of the insert induced a reinforcement of resistance, indicating an
11 increase in the barrier properties compared to the different cell arrangements tested. This latter finding
12 suggests that both cell lines collaborate in the construction of a more effective alveolar-capillary
13 barrier if seeded at either side of a basal lamina-like structure. Given the results obtained for the
14 phenotypic characterisation of the cell lines, as well as the functional validation of the co-culture
15 model, our alveolar-capillary model was used for further e-liquid exposure experiments. Thus, to
16 better understand how the main e-liquid components affect the cells and the properties of barrier
17 model, increasing concentrations of PG, VG alone and in 50/50 and 76/24 ratios were applied to the
18 apical surface of the co-culture or to the epithelial cell monolayer.

19 **4.2. Vehicles modify barrier integrity through tight junction protein expression like occludin**

20 The present study first demonstrated that PG and VG vehicles, alone or combined in different ratios
21 (50/50 and 76/24), disrupt the homeostasis of the alveolar-capillary unit by modifying resistance
22 through the expression of the junctional protein: occludin. Occludin is a key protein of the tight
23 junction complex present on the alveolar epithelium that seals together adjacent cells allowing the
24 formation of a mechanical barrier and determining paracellular permeability for the flow of water,
25 ions and other compounds from the air to the vascular compartments (20). A biphasic effect on barrier

1 resistance was observed after exposure to the vehicles: first, an increase in TEER for concentrations
2 below 5% with an increase in occludin expression on the alveolar epithelium. Second, for higher
3 concentrations, which resulted in a hypertonic effect on the barrier, a decrease in TEER was observed
4 which reflects a destruction of the barrier due to cell death. These results indicate that hypertonic e-
5 liquids can induce pressure on the tight junctions between adjacent epithelial cells resulting first in a
6 cell membrane rearrangement with an increase in occludin synthesis followed by an opening of the
7 barrier. Finally, hyperosmolality may lead to a dysregulation of the passage of molecules from the air
8 into the blood. Interestingly, the mint-eucalyptus e-liquid, which has a lower hyperosmolality, did
9 not increase occludin synthesis. For this e-liquid, the integrity of the barrier is broken at lower
10 concentrations due to the induction of oxidation and inflammation mechanisms. These findings
11 confirm a recent *in vitro* study, where a 55/45 ratio of PG/VG decreased resistance of alveolar
12 epithelium, reduced airway epithelial height, and increased epithelial permeability, although, this
13 work did not focus on vehicle impact on tight junctions (21). In addition, in rat Sertoli cells, VG at a
14 10% concentration disrupted the organisation of tight junctions associating actin microfilaments,
15 occludin and tubulin, by exerting a sufficient osmotic stress (22). Furthermore, hyperosmotic VG was
16 also shown to directly interact with the lipid components at the membrane interface (23).
17 Interestingly, the most common side effects of inhaling e-liquid containing PG and VG are dry mouth,
18 sore throat and increased thirst which may be due to the hypertonic properties of these two
19 compounds, indirectly triggering cell and systemic dehydration of the user depending on the intensity
20 of the vaping. The higher the frequency and intensity of vaping, the more deleterious the effects of
21 the vehicles on the barrier. Longer exposure of the barrier could result in a disbalance in the regulation
22 of the alveolar surfactant fluid, the passage of inhaled pathogens from air to blood and the passage of
23 immunity cells from blood to the alveolar space. To resume, disruption of alveolar immune
24 homeostasis can be a source of edema fluid, impaired gas exchange and pulmonary infection.

25 **4.3. Flavoured e-liquids are not equal in terms of cell responses**

1 The addition of flavours in e-liquids results in an additional deleterious effect on the alveolar-capillary
2 unit as they lower the threshold for cells stress, barrier failure and finally cell death. Similar to
3 PG/VG, flavours are designated *Generally Recognized As Safe* (GRAS) but there are only limited
4 safety data after inhalational exposure. In literature, the most studied flavouring compounds are
5 cinnamaldehyde, vanillin, ethyl-maltol and menthol. They have been shown to induce oxidative stress
6 and inflammatory responses in human cells through a variety of more or less well identified
7 mechanisms (24–26). However, users of flavoured e-cigarettes reported higher satisfaction than users
8 of unflavored e-cigarettes (27). For example, in Europe, the most popular flavours in e-liquids are
9 fruity (red fruits being the most sold in this category), tobacco and menthol (28). The appeal of
10 flavours, particularly among young adults, could have long-term consequences that are currently
11 poorly understood.

12 For this study, three commercially available flavoured e-liquids were chosen, with a PG/VG ratio of
13 76/24: red fruits, mint-eucalyptus and blond tobacco. While blond tobacco seems to be as safe as
14 vehicles in terms of alveolar toxicity, red fruits and mint-eucalyptus trigger cellular stress,
15 inflammatory and death mechanisms, with the mint-eucalyptus flavour causing the worst effects.
16 Thus, when the co-culture model was exposed to red fruits and mint-eucalyptus e-liquids, cell
17 viability decreased significantly, with 50% of cell death being reached after concentrations of 6.4%
18 and 2.4%, respectively. These results confirm deleterious effects of menthol flavoured e-liquids
19 described in the literature. For example, Goenka et al. showed that human retinal pigment epithelial
20 cells viability was lowered by 41.7% and 96.5% at concentrations of 1% and 2% of menthol e-liquid,
21 respectively (29).

22 While cell death is related to osmotic shock for high concentrations of PG and VG, other mechanisms
23 were demonstrated for lower PG and/or VG concentrations. The main mechanism of cell death
24 initiated at low concentrations appears to be autophagy, as in this study flavoured e-liquids stimulated
25 LC3B-II expression on NCI-H441 cells, reflecting increased autophagosome production. There is

1 now considerable interest in autophagy in lung diseases, in which autophagy may be either a
2 protective homeostatic mechanism as it clears cellular components damaged by oxidative stress or
3 inflammation, nor even deleterious due to autophagy activation of fibrosis (30). The establishment of
4 an autophagy mechanism after e-liquid exposure confirms the literature data, as Go et al. found a
5 significant accumulation of LC3B-II in cells treated with tobacco and menthol flavoured e-liquids,
6 but not in the PG/VG treated group, compared to the control group (31). They also identified higher
7 expression levels of the pro-apoptotic genes of Bax and caspase-3, and lower expression levels of the
8 anti-apoptotic marker Bcl-2 in tobacco and menthol flavoured e-liquids compared to the control group
9 (31). In our study, neither the blond tobacco nor the red fruits and mint-eucalyptus e-liquids increased
10 significantly the pro-apoptotic ratio of Bax/Bcl-2 proteins, showing that this death pathway certainly
11 exists but is not the principal pathway involved after exposure of increasing concentrations to the e-
12 liquids studied. As autophagy is generally implemented to eliminate impaired proteins and organelles
13 accumulated in the cell cytoplasm, the impact of e-liquid compounds on the formation and
14 accumulation of highly reactive oxygen species was further investigated in this work.

15 **4.4. Mint-eucalyptus and red fruits e-liquids and nicotine induced mitochondrial oxidative** 16 **stress and inflammation, but not vehicles or blond tobacco without nicotine**

17 Mitochondrial superoxide anion production was increased when alveolar epithelial cells were
18 exposed to e-liquids, but in an unequal manner. Thus, mint-eucalyptus and red fruits e-liquids induced
19 a significant dose-dependent increase in superoxide ion production for concentrations above 2.5%
20 and 5%, respectively. In literature, Lamb et al. found that menthol flavoured e-cigarette exposure to
21 bronchial epithelial cells caused mitochondrial dysfunction, reducing basal and maximal respiration,
22 consequently affecting mitochondrial oxidative stress (32). In addition, tobacco flavour exposure
23 resulted in non-significant alterations of mitochondrial respiration in this previously cited study,
24 which is in concordance with our work where blond tobacco e-liquid up to 10% did not enhance
25 superoxide production compared to untreated cells and even reduced by 32.3% the superoxide anion

1 production induced by the PG/VG 76/24 ratio at a 10% concentration. In contrast, when nicotine was
2 present in blond tobacco flavoured (6 mg/ml nicotine) in both 50/50 and 76/24 ratios, e-liquids
3 induced an increase in superoxide anions production compared to tobacco-flavoured e-liquid without
4 nicotine, demonstrating the activation of mitochondrial activity and intracellular oxidative stress by
5 nicotine, as previously described in literature (33,34). Nicotine has been shown to mediate
6 intracellular Ca^{2+} flux and activate protein kinase C pathway, which then activates NADPH oxidase
7 (NOX) enzymes. NOXs catalyze the conversion of oxygen to superoxide, which can lead to increased
8 cellular and mitochondrial oxidative stress (34).

9 The present study did not focus on the flavouring chemicals present in e-liquids and responsible for
10 cytotoxic effects. However, toxicity of mint-eucalyptus e-liquid may be attributed to menthol as it
11 increases oxidative stress through the binding of menthol to Transient Receptor Potential Melastatin
12 8 (TRPM8). TRPM8 is a cation channel with Ca^{2+} selectivity, which triggers an increase in
13 cytoplasmic and mitochondrial Ca^{2+} concentrations which can be the source of excessively ROS
14 generation (35). Further studies are needed to explore the mechanisms by which flavoured e-liquids
15 alter mitochondrial function (mitophagy, respiration...) and to find the molecules responsible for
16 these adverse effects.

17 Additionally, autophagy and inflammation have been described to be connected, and their networks
18 are complex as inflammation is involved in the induction and suppression of autophagy (36,37).
19 Different cytokines including IL-6 and TNF- α have been shown to stimulate autophagy (16,38) and,
20 in exchange, autophagy participates in the clearance of inflammasomes through proteasomal
21 degradation (39). In our study, increased cytokine release was most markedly observed with mint-
22 eucalyptus e-liquid, the only flavoured e-liquid without nicotine to produce increased inflammatory
23 cytokine and chemokine release (IL-6, IL-8, MIP-1 β , SDF1- α and GM-CSF). According to our
24 works, several studies have reported increased pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, CXCL1, and
25 G-CSF) after e-cigarette exposure in human bronchial cells (7,40). E-cigarette aerosol condensate

1 mediated inflammation in A549 cells with significant upregulation of cytokines and chemokines (IL-
2 6, IL-8, and MCP-1) (41). Finally, e-cigarette extract, by activating the p38 MAPK, TLR-4/NF- κ B,
3 and EGFR/ERK signal pathways, promotes the release of inflammatory mediators (6,7,42).
4 Moreover, exposure of bronchial epithelial cells from patients with COPD to the Virginia tobacco
5 and menthol flavoured e-cigarette aerosols triggered comparable release of inflammatory cytokine
6 levels (IL-6 and IL-8) that conventional cigarette smoke (43). In fact, epithelial and endothelial cells
7 activated by cigarette smoke and other inhaled irritants, secrete a variety of proinflammatory
8 mediators, including cytokines, chemokines, like TNF- α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF, and IL-8 (44). Other
9 mediators, MCP-1 and GRO-, increase the recruitment of monocytes from the circulation, while the
10 direct stimulatory effect of GM-CSF acts on the production and release of granulocytes from the bone
11 marrow (45). Overall, the mediators secreted after prolonged exposure to menthol-flavoured e-liquids
12 are involved in the lung inflammation that leads to lung disorders and all these results raise questions
13 about the potential involvement of e-cigarette use in the development of COPD or other lung diseases.
14 Despite this, the mechanisms of induction of pro-inflammatory cytokines, oxidative stress and
15 cellular death of individual chemicals require further investigation to better predict pulmonary effects
16 of these formulations.

17 **4.5. Limitations of the study**

18 The main limitation of the present study is that it evaluated the toxicity of e-cigarettes liquids, in
19 liquid and not aerosolised form, on an *in vitro* model. As e-cigarettes users inhale aerosols rather than
20 e-liquids, further studies are needed to evaluate the effects of e-liquid aerosols using an appropriate
21 inhalation system, and confirmation by a *in vivo* model. Furthermore, as physiological concentrations
22 of e-liquid components have not been measured in humans after vaping, a wide range of
23 concentrations of e-liquids and mixtures was tested for the assessment of the different toxicity tests
24 in our study. Nevertheless, this exposure model has advantages as it defines the existence and the
25 mechanisms of e-liquids toxicity before aerosolisation. Also, it has been shown that during this

1 process other compounds were formed through decomposition of e-liquid vehicles and flavours
2 chemicals (46,47). Furthermore, e-liquid aerosolisation varies a lot depending on the brand and
3 features (voltage/wattage/resistance) of e-device studied, and the method of aerosol collection (48),
4 all this complexifying toxicity assays. Interestingly, Behar et al. demonstrated that e-liquid toxicity
5 accurately predicts *in vitro* aerosol toxicity in about 74% of the cases (49), allowing a fast screening
6 of deleterious e-liquids before their aerosolization on air-liquid *in vitro* models.
7 Finally, there is a considerable disparity in the literature regarding e-cigarettes tolerance. Many
8 groups have claimed that the toxicity of e-liquids is absent or less than that of tobacco (8,50,51), while
9 others have demonstrated the activation of cytotoxic pathways, including oxidative stress,
10 inflammation, and cellular death, that are dependent on the composition of e-liquids, in consistency
11 with our study (24,52). These conflicting results reflect the urgent need for standardised *in vitro* e-
12 cigarette exposure models and interpretation. Moreover, further research is needed to investigate the
13 effects of e-cigarette exposure in humans. Therefore, we suggest continued caution in the use of e-
14 cigarettes for smoking cessation purposes and strongly recommend the use of controlled e-liquids,
15 which means that their components have been validated for safe use.

16 **5. Conclusion**

17 This work allowed the development of a phenotypically and functionally well characterised model of
18 the alveolar-capillary barrier that was exposed to e-liquid components. The main components of e-
19 liquids and marketed e-liquids aberrantly modify the barrier homeostasis, and the intensity of their
20 effects vary with flavour and nicotine presence. These consequences have similarities with the
21 cellular alterations observed in COPD. This work highlights the non-harmfulness of all e-liquids and
22 raises a red flag about the use of e-cigarettes as a replacement for conventional cigarettes in the
23 context of cessation or personal entertainment use.

1 **6. AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS**

2 Amelia-Naomi Sabo: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation;
3 Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Emma Filaudeau: Formal
4 analysis; Investigation; Methodology; Validation; Writing - review & editing. Sylvia Da Silva:
5 Investigation; Methodology; Writing - review & editing. Guillaume Becker: Investigation;
6 Methodology; Writing - review & editing. Laurent Monassier: Funding acquisition; Resources;
7 Supervision; Writing - original draft; Writing - review & editing. Véronique Kimmel:
8 Conceptualization; Funding acquisition; Methodology; Resources; Supervision; Writing - original
9 draft; Writing - review & editing.

10 **7. ACKNOWLEDGMENTS**

11 IReSP and INCa as part of the call for research and intervention projects to reduce and fight against
12 smoking funded this research: IRESP-19-TABAC-V3-04.

13 The authors gratefully thank Pascal KESSLER from the PIC-STRA Imaging Platform (CRBS,
14 Strasbourg), Chloé GOMMENGINGER and Laetitia BEAL from the CNR toxoplasmose/Mycologie
15 (Strasbourg) for their assistance.

16 **8. REFERENCES**

- 17 1. Rahman I. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J.*
18 2006 Jul 1;28(1):219–42.
- 19 2. Taylor JD. COPD and the response of the lung to tobacco smoke exposure. *Pulm Pharmacol*
20 *Ther.* 2010 Oct;23(5):376–83.
- 21 3. Wang Y, Xu J, Meng Y, Adcock IM, Yao X. Role of inflammatory cells in airway remodeling
22 in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018 Oct;Volume 13:3341–8.
- 23 4. Bitzer ZT, Goel R, Reilly SM, Bhangu G, Trushin N, Foulds J, et al. Emissions of free radicals,
24 carbonyls, and nicotine from the NIDA Standardized Research Electronic Cigarette and
25 comparison to similar commercial devices. *Chem Res Toxicol.* 2019 Jan 22;32(1):130–8.
- 26 5. Olmedo P, Goessler W, Tanda S, Grau -Perez Maria, Jarmul S, Aherrera A, et al. Metal
27 Concentrations in e-Cigarette Liquid and Aerosol Samples: The Contribution of Metallic Coils.
28 *Environ Health Perspect.* 126(2):027010.

- 1 6. Chen IL, Todd I, Tighe PJ, Fairclough LC. Electronic cigarette vapour moderately stimulates
2 pro-inflammatory signalling pathways and interleukin-6 production by human monocyte-
3 derived dendritic cells. *Arch Toxicol*. 2020 Jun 1;94(6):2097–112.
- 4 7. Iskandar AR, Gonzalez-Suarez I, Majeed S, Marescotti D, Sewer A, Xiang Y, et al. A
5 framework for in vitro systems toxicology assessment of e-liquids. *Toxicol Mech Methods*.
6 2016 Jul 23;26(6):392–416.
- 7 8. Wang L, Wang Y, Chen J, Yang XM, Jiang XT, Liu P, et al. Comparison of biological and
8 transcriptomic effects of conventional cigarette and electronic cigarette smoke exposure at
9 toxicological dose in BEAS-2B cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021 Oct;222:112472.
- 10 9. Morris AM, Leonard SS, Fowles JR, Boots TE, Mnatsakanova A, Attfield KR. Effects of E-
11 Cigarette Flavoring Chemicals on Human Macrophages and Bronchial Epithelial Cells. *Int J*
12 *Environ Res Public Health*. 2021 Oct 22;18(21):11107.
- 13 10. Son Y, Mainelis G, Delnevo C, Wackowski OA, Schwander S, Meng Q. Investigating E-
14 Cigarette Particle Emissions and Human Airway Depositions under Various E-Cigarette-Use
15 Conditions. *Chem Res Toxicol*. 2020 Feb 17;33(2):343–52.
- 16 11. Birkness KA, Deslauriers M, Bartlett JH, White EH, King CH, Quinn FD. An In Vitro Tissue
17 Culture Bilayer Model To Examine Early Events in Mycobacterium tuberculosis Infection.
18 Tuomanen EI, editor. *Infect Immun*. 1999 Feb;67(2):653–8.
- 19 12. Lehmann AD, Daum N, Bur M, Lehr CM, Gehr P, Rothen-Rutishauser BM. An in vitro triple
20 cell co-culture model with primary cells mimicking the human alveolar epithelial barrier. *Eur J*
21 *Pharm Biopharm*. 2011 Apr;77(3):398–406.
- 22 13. Ganguly K, Nordström A, Thimraj TA, Rahman M, Ramström M, Sompa SI, et al. Addressing
23 the challenges of E-cigarette safety profiling by assessment of pulmonary toxicological
24 response in bronchial and alveolar mucosa models. *Sci Rep*. 2020 Nov 24;10(1):20460.
- 25 14. Mizushima N, Yoshimori T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*. 2007 Nov
26 26;3(6):542–5.
- 27 15. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage
28 and metabolic needs. *Cell Death Differ*. 2015 Mar;22(3):377–88.
- 29 16. Hu F, Song D, Yan Y, Huang C, Shen C, Lan J, et al. IL-6 regulates autophagy and
30 chemotherapy resistance by promoting BECN1 phosphorylation. *Nat Commun*. 2021
31 Dec;12(1):3651.
- 32 17. Becker G, Da Silva S, Sabo AN, Antal MC, Kemmel V, Monassier L. Blood-Brain Barrier
33 Permeability: Is 5-Hydroxytryptamine Receptor Type 4 a Game Changer? *Pharmaceutics*. 2021
34 Nov 3;13(11):1856.
- 35 18. Dohle E, Singh S, Nishigushi A, Fischer T, Wessling M, Möller M, et al. Human Co- and
36 Triple-Culture Model of the Alveolar-Capillary Barrier on a Basement Membrane Mimic.
37 *Tissue Eng Part C Methods*. 2018 Sep;24(9):495–503.
- 38 19. Hermanns MI, Unger RE, Kehe K, Peters K, Kirkpatrick CJ. Lung epithelial cell lines in
39 coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-

- 1 capillary barrier in vitro. *Lab Invest.* 2004 Jun;84(6):736–52.
- 2 20. Cummins PM. Occludin: One Protein, Many Forms. *Mol Cell Biol.* 2012 Jan;32(2):242–50.
- 3 21. Woodall M, Jacob J, Kalsi KK, Schroeder V, Davis E, Kenyon B, et al. E-cigarette constituents
4 propylene glycol and vegetable glycerin decrease glucose uptake and its metabolism in airway
5 epithelial cells in vitro. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 2020 Dec 1;319(6):L957–67.
- 6 22. Wiebe JP, Kowalik A, Gallardi RL, Egeler O, Clubb BH. Glycerol Disrupts Tight Junction—
7 Associated Actin Microfilaments, Occludin, and Microtubules in Sertoli Cells. *J Androl.*
8 2000;11.
- 9 23. Biondi AC, Disalvo EA. Effect of glycerol on the interfacial properties of
10 dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes as measured with merocyanine 540. *Biochim*
11 *Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1990 Sep 21;1028(1):43–8.
- 12 24. Hua M, Omaye EE, Luo W, McWhirter KJ, Pankow JF, Talbot P. Identification of Cytotoxic
13 Flavor Chemicals in Top-Selling Electronic Cigarette Refill Fluids. *Sci Rep.* 2019
14 Dec;9(1):2782.
- 15 25. Muthumalage T, Lamb T, Friedman MR, Rahman I. E-cigarette flavored pods induce
16 inflammation, epithelial barrier dysfunction, and DNA damage in lung epithelial cells and
17 monocytes. *Sci Rep.* 2019 Dec;9(1):19035.
- 18 26. Rickard BP, Ho H, Tiley JB, Jaspers I, Brouwer KLR. E-Cigarette Flavoring Chemicals Induce
19 Cytotoxicity in HepG2 Cells. *ACS Omega.* 2021 Mar 16;6(10):6708–13.
- 20 27. Landry RL, Groom AL, Vu THT, Stokes AC, Berry KM, Kesh A, et al. The role of flavors in
21 vaping initiation and satisfaction among U.S. adults. *Addict Behav.* 2019 Dec 1;99:106077.
- 22 28. Havermans A, Krüsemann EJZ, Pennings J, de Graaf K, Boesveldt S, Talhout R. Nearly 20 000
23 e-liquids and 250 unique flavour descriptions: an overview of the Dutch market based on
24 information from manufacturers. *Tob Control.* 2021 Jan;30(1):57–62.
- 25 29. Goenka S, Simon SR. Effects of E-Cigarette Refill Liquid Flavorings with and without Nicotine
26 on Human Retinal Pigment Epithelial Cells: A Preliminary Study. *Int J Environ Res Public*
27 *Health.* 2021 Jan;18(21):11655.
- 28 30. Hill C, Wang Y. Autophagy in pulmonary fibrosis: friend or foe? *Genes Dis.* 2021
29 Oct;S2352304221001161.
- 30 31. Go YY, Mun JY, Chae SW, Chang J, Song JJ. Comparison between in vitro toxicities of
31 tobacco- and menthol-flavored electronic cigarette liquids on human middle ear epithelial cells.
32 *Sci Rep.* 2020 Dec;10(1):2544.
- 33 32. Lamb T, Muthumalage T, Rahman I. Pod-based menthol and tobacco flavored e-cigarettes
34 cause mitochondrial dysfunction in lung epithelial cells. *Toxicol Lett.* 2020 Oct 15;333:303–11.
- 35 33. Barr J, Sharma CS, Sarkar S, Wise K, Dong L, Periyakaruppan A, et al. Nicotine induces
36 oxidative stress and activates nuclear transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells.
37 *Mol Cell Biochem.* 2007 Mar 14;297(1–2):93–9.

- 1 34. Zanetti F, Giacomello M, Donati Y, Carnesecchi S, Frieden M, Barazzone-Argiroffo C.
2 Nicotine mediates oxidative stress and apoptosis through cross talk between NOX1 and Bcl-2 in
3 lung epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2014 Nov;76:173–84.
- 4 35. Nair V, Tran M, Behar RZ, Zhai S, Cui X, Phandthong R, et al. Menthol in Electronic
5 Cigarettes: A Contributor to Respiratory Disease? *Toxicol Appl Pharmacol*. 2020 Nov
6 15;407:115238.
- 7 36. Chen YM, Chang CY, Chen HH, Hsieh CW, Tang KT, Yang MC, et al. Association between
8 autophagy and inflammation in patients with rheumatoid arthritis receiving biologic therapy.
9 *Arthritis Res Ther*. 2018 Dec;20(1):268.
- 10 37. Saitoh T, Akira S. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J Cell*
11 *Biol*. 2010 Jun 14;189(6):925–35.
- 12 38. Harris J. Autophagy and cytokines. *Cytokine*. 2011 Nov 1;56(2):140–4.
- 13 39. Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, et al. Activation of
14 autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated
15 inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*. 2012 Mar;13(3):255–63.
- 16 40. Anthérieu S, Garat A, Beauval N, Soyez M, Allorge D, Garçon G, et al. Comparison of cellular
17 and transcriptomic effects between electronic cigarette vapor and cigarette smoke in human
18 bronchial epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2017 Dec 1;45:417–25.
- 19 41. Singh DP, Begum R, Kaur G, Bagam P, Kambiranda D, Singh R, et al. E-cig vapor condensate
20 alters proteome and lipid profiles of membrane rafts: impact on inflammatory responses in
21 A549 cells. *Cell Biol Toxicol*. 2021 Oct 1;37(5):773–93.
- 22 42. Wang L, Wang Y, Chen J, Liu P, Li M. A Review of Toxicity Mechanism Studies of Electronic
23 Cigarettes on Respiratory System. *Int J Mol Sci*. 2022 May 1;23(9):5030.
- 24 43. O'Farrell HE, Brown R, Brown Z, Miljevic B, Ristovski ZD, Bowman RV, et al. E-cigarettes
25 induce toxicity comparable to tobacco cigarettes in airway epithelium from patients with
26 COPD. *Toxicol In Vitro*. 2021 Sep 1;75:105204.
- 27 44. Gao W, Li L, Wang Y, Zhang S, Adcock IM, Barnes PJ, et al. Bronchial epithelial cells: The
28 key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology*.
29 2015;20(5):722–9.
- 30 45. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J*
31 *Allergy Clin Immunol*. 2016 Jul;138(1):16–27.
- 32 46. Khlystov A, Samburova V. Flavoring Compounds Dominate Toxic Aldehyde Production
33 during E-Cigarette Vaping [Internet]. ACS Publications. American Chemical Society; 2016
34 [cited 2022 May 26]. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.est.6b05145>
- 35 47. Lorkiewicz P, Keith R, Lynch J, Jin L, Theis W, Krivokhizhina T, et al. Electronic Cigarette
36 Solvents, JUUL E-Liquids, and Biomarkers of Exposure: In Vivo Evidence for Acrolein and
37 Glycidol in E-Cig-Derived Aerosols. *Chem Res Toxicol*. 2022 Feb 21;35(2):283–92.
- 38 48. Dusautoir R, Zarcone G, Verrielle M, Garçon G, Fronval I, Beauval N, et al. Comparison of the

- 1 chemical composition of aerosols from heated tobacco products, electronic cigarettes and
2 tobacco cigarettes and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *J*
3 *Hazard Mater.* 2021 Jan 5;401:123417.
- 4 49. Behar RZ, Wang Y, Talbot P. Comparing the cytotoxicity of electronic cigarette fluids, aerosols
5 and solvents. *Tob Control.* 2018 May;27(3):325–33.
- 6 50. Scheffler S, Dieken H, Krischenowski O, Förster C, Branscheid D, Aufderheide M. Evaluation
7 of E-Cigarette Liquid Vapor and Mainstream Cigarette Smoke after Direct Exposure of Primary
8 Human Bronchial Epithelial Cells. *Int J Environ Res Public Health.* 2015 Apr 8;12(4):3915–25.
- 9 51. Su L, Zhao M, Ma F, An Z, Yue Q, Zhao C, et al. A comparative assessment of e-cigarette
10 aerosol extracts and tobacco cigarette smoke extracts on in vitro endothelial cell inflammation
11 response. *Hum Exp Toxicol.* 2022 Jan 1;41:09603271221088996.
- 12 52. Khachatoorian C, Luo W, McWhirter KJ, Pankow JF, Talbot P. E-cigarette fluids and aerosol
13 residues cause oxidative stress and an inflammatory response in human keratinocytes and 3D
14 skin models. *Toxicol In Vitro.* 2021 Dec;77:105234.
- 15

1 **9. SUPPLEMENTARY DATA**

2

3 **SUPPLEMENTARY DATA 1:**

4 **Functional evaluation of other alveolar-capillary barrier model patterns: (A) and (B)** Seeding
5 patterns for co-culture with NCI-H441 epithelial cells (squared purple cells) and HULEC-5a
6 endothelial cells (flat orange cells). **(C) and (D)** Evolutions of TEER over the time for the alternative
7 co-culture arrangement described in figures **(A) and (B)**, respectively. Each measurement is the result
8 of 3 experiments of triplicates.

9

10 **SUPPLEMENTARY DATA 2:**

11 **Osmolality of the medium containing different percentages of vehicle or marketed e-liquids.**

12 The osmolality of solutions was determined by using freezing point depression. The quantification
13 range of this system goes from 0 to 2000 mOsm/L H₂O. A correlation is observed between osmolality
14 and concentrations from 0.2 to 10 % of each mixture (V/V in optimal MCDB medium). The
15 osmolality was above the limit of quantification for concentrations above 10%. Mint-eucalyptus
16 flavour in a PG/VG ratio of 76/24 showed a different slope certainly due to the higher menthol
17 freezing point compared to PG and VG freezing points.

18

19 **SUPPLEMENTARY DATA 3:**

20 **BAX/BCL-2 ratio in NCI-H441 epithelial cells after 24-hour exposure to vehicle (PG/VG 76/24)**
21 **or flavoured e-liquids in a 76/24 ratio.** No significant increase in BAX/BCL-2 ratio was observed
22 for concentrations between 0.2 and 2.5%. EL1 and EL2 contain blond tobacco flavour, 6 mg/mL of
23 nicotine and ratios of 50/50 and 76/24 of PG/VG, respectively. Histograms represent mean ± SD from
24 at least three independent experiments. Comparisons between different exposures *versus* untreated

- 1 cells were performed using a 2-factors ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Šídák's multiple
- 2 comparisons test.
- 3

IV. Article 2 : Étude de l'effet de la nicotine sur un modèle cellulaire de barrière alvéolo-capillaire

1) Objectifs de l'article et résultats obtenus

La nicotine produit des effets psychostimulants, mais agit aussi sur le système de la récompense. En favorisant ces fonctions cognitives à l'origine d'une diminution du stress et de l'anxiété, les utilisateurs de cigarettes combustibles et, plus récemment, de cigarettes électroniques sont enclins à pérenniser leur consommation de nicotine. L'inhalation de la fumée de cigarette classique ou de l'aérosol produit par la e-cigarette entraîne un impact délétère sur la santé pulmonaire, en produisant un stress oxydant et en perturbant les mécanismes pro- et anti-inflammatoires, ce qui peut conduire à des maladies chroniques telles que la BPCO (Carnevale et al. 2016; Osei et al. 2019). Cependant, peu d'études se sont intéressées aux effets pulmonaires spécifiques de la nicotine. Le principal lieu de dépôt et d'absorption de la nicotine contenue dans la fumée de tabac ou l'aérosol de cigarette électronique est la surface alvéolaire du poumon où le flux sanguin élevé facilite son absorption rapide. Dans cette partie du projet, des études dose-effet de la nicotine ont été effectuées sur le modèle de barrière alvéolo-capillaire préalablement validé pour investiguer les mécanismes rencontrés dans la BPCO tels que le stress oxydant, l'inflammation, la rupture de la barrière et la mort cellulaire dans les poumons. Dans l'article qui suit, nous avons montré que :

La nicotine altère l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire, entraînant une diminution de la résistance électrique.

Cette perte d'intégrité membranaire est due en partie à une mort cellulaire par nécrose, 50 % de l'augmentation de la LDH est observée après une concentration de 66,8 μM de nicotine appliquée du côté apical du modèle de co-culture.

L'apoptose ne semble pas être le mécanisme majoritaire de mort cellulaire induite par l'exposition à la nicotine dans les conditions testées, le ratio Bax/Bcl-2 n'étant pas significativement modifié lorsque les monocultures sont exposées à des concentrations croissantes de nicotine.

L'autophagie était également altérée, avec une augmentation de LC3B-II, marqueur de l'autophagie et de puncta LC3 dans les cellules.

Une des pistes mécanistiques pouvant expliquer l'autophagie dans les cellules épithéliales est la production accrue de ROS observée à partir de 0,25 μM de nicotine et la libération de

différents marqueurs pro-inflammatoires augmentée pendant les phases précoces (4 et 8 heures pour l'IL-6, l'IL-18, TNF α) et tardives (24 heures pour MCP-1) de l'exposition.

Les résultats révèlent des éléments caractéristiques de la physiopathologie de la BPCO produits après exposition directe à la nicotine seule et attirent l'attention sur les liquides pour cigarettes électroniques contenant de la nicotine, qui sont donc également susceptibles de déclencher ces processus pulmonaires délétères.

2) Article

En préparation pour soumission à *Food and Chemical Toxicology*.

Nicotine alters the functions of an alveolar-capillary cell model with features of COPD: integrity loss, oxidative stress, inflammation and cell death

Amelia-Naomi Sabo^{1,2}, Emma Filaudeau², Sylvia Da Silva², Guillaume Becker^{2,3}, Laurent Monassier², Véronique Kemmel^{1,2*}

¹ Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neurocardiovasculaire, Unité de recherche 7296, Faculté de Médecine de Maïeutique et des Métiers de la Santé, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg (CRBS), 67085, Strasbourg, France; amelia-naomi.sabo@chru-strasbourg.fr (A.N.S.), emma.filaudeau@etu.unistra.fr (E.F.), sylvia.dasilva@unistra.fr (S.D.S.), guillaume.becker@chru-strasbourg.fr (G.B.), laurent.monassier@unistra.fr (L.M), veronique.kemmel@chru-strasbourg.fr (V.K.)

² Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67200, Strasbourg, France; amelia-naomi.sabo@chru-strasbourg.fr (A.N.S.), veronique.kemmel@chru-strasbourg.fr (V.K.)

³ Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Service Pharmacie, 67200, France; guillaume.becker@chru-strasbourg.fr (G.B.)

***Address all correspondence to:**

Véronique Kemmel : veronique.kemmel@chru-strasbourg.fr ; Tel.: +33 (0) 3 88 12 75 33 (V.K.)

Number of text pages: 21

Number of tables: 0

Number of figures: 5

Number of references: 38

Number of words in the Abstract: 199

Nonstandard abbreviations used in the paper, in alphabetical order:

AUC: area under the curve

BrdU: bromodeoxyuridine

COPD: chronic obstructive pulmonary disease

HRP: horseradish peroxidase

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfohenyl)-2H-tetrazolium

PG: propylene glycol

ROS: reactive oxygen species

TEER: Trans-Epithelial/Endothelial Electric Resistance

VG: vegetable glycerine

ABSTRACT

no more than 200 words a single paragraph.

Nicotine is an alkaloid responsible for the pleasurable effects sought by users of combustible cigarettes and, more recently, electronic cigarettes. Inhalation of the aerosol produced by these systems is known to have a deleterious impact on lung health, producing oxidative stress and disrupting the pro- and anti-inflammatory mechanisms, which can lead to chronic diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD). However, there is still a need to understand the specific pulmonary effects of nicotine. Here, nicotine dose-effect studies were performed in an alveolar-capillary barrier model to investigate pulmonary oxidative stress, inflammation, barrier disruption, and cell death. The results showed that nicotine impaired barrier integrity resulting in a trans-barrier electrical resistance drop. In epithelial cells, increased production of mitochondrial oxidative stress was observed from 0.25 μ M of nicotine and different pro-inflammatory markers were increased during the early (4 and 8 hours) and late (24 hours) phases of exposure. Necrosis (LDH), but not apoptosis (BAX/BCL-2 ratio) marker, was significantly higher compared to untreated control. Autophagy was also impaired, with increased LC3 puncta in cells. Results reveal features of COPD and draw attention to liquids for electronic cigarettes containing nicotine which are therefore also likely to trigger these deleterious processes.

GRAPHICAL ABSTRACT

KEYWORDS

Number: 6

Nicotine, alveolar-capillary barrier, COPD, oxidative stress, inflammation, death

1 **1. Introduction**

2

3 Nicotine is the main alkaloid found in more than half of the 75 known species of plants in the
4 *Nicotiana* genus. It is the molecule responsible for tobacco and electronic nicotine delivery systems
5 (ENDS) addiction and determines smoking habits. ENDS produce an aerosol from a liquid (named
6 e-liquid) by heating a resistance. More than 98% of manufactured e-liquids sold contain nicotine in
7 various flavoured and unflavoured propylene glycol (PG)/vegetable glycerine (VG) ratios (Marynak
8 et al. 2017). However, the do-it-yourself mentality encourages users to prepare e-liquids at home, but
9 this practice involves less quality control and incorrect mixing that can trigger higher user exposure
10 to nicotine.

11 After smoking or vaping, nicotine is deposited mainly on the alveolar surface of the lung where the
12 high blood flow facilitates its rapid absorption. Thus, after smoking one cigarette, nicotine
13 concentration in the alveolar lining fluid is about 6 to 60 μM (Clunes et al. 2008; Hoshino et al. 2001)
14 and, on average, 1 mg of nicotine is absorbed (Benowitz et al. 1988) which triggers maximum
15 concentration of nicotine in venous blood from 12 to 50 ng/mL (Benowitz et al. 1988; Hajek et al.
16 2020; Henningfield 1993). In e-liquids, nicotine concentration varies between 0 and 20 mg/mL in the
17 European Union, and, to date, there is no nicotine cap for e-cigarettes in the United States. Nicotine
18 level in vapers' sputum is around 50 μM , 30 minutes after vaping e-liquids containing 3 to 12 mg/mL
19 of nicotine (Ghosh et al. 2019). However, several factors can modify the amount of nicotine delivered
20 from e-cigarettes as temperature settings on the device, users' habits, or a higher proportion of PG in
21 the e-liquid (EL-Hellani et al. 2016; Farsalinos et al. 2015; Fearon et al. 2017).

22 It has been shown that smoking increases the production of reactive oxygen species (ROS), triggering
23 an imbalance between the oxidant and the antioxidant elements in lung tissue. Moreover, smoking
24 increases airway inflammation and destroys the structure of the airways and the alveolar wall, which
25 promote the progression of lung tissue lesions leading to chronic obstructive pulmonary disease

1 (COPD). E-cigarette aerosol exposure has also been associated with many adverse short- and long-
2 term health consequences, including cardiovascular and lung diseases (Antoniewicz et al. 2016;
3 Carnevale et al. 2016; Chaumont et al. 2018; Osei et al. 2019). However, smoke and e-cigarette
4 aerosol contain many different irritants in addition to nicotine and the specific role of nicotine in
5 COPD has been poorly explored (Geiser et al. 2000; Katsura et al. 2019; Ramalingam et al. 2021). It
6 is therefore imperative to identify the impact of nicotine exposure on lung health. This study describes
7 nicotine effects on a cellular model of the alveolar capillary model.

8 **2. Material and methods**

9 **2.1 Cell lines and alveolo-capillary barrier model**

10 The NCI-H441 cell line (ATCC® HTB-174™) was maintained in RPMI-1640 medium (#21875091,
11 Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) supplemented with fetal bovine serum (10%)
12 (#10270106, Thermo Fisher Scientific) and penicillin-streptomycin (0.5%) (#15140122, Thermo
13 Fisher Scientific). The HULEC-5a cell line (ATCC® CRL-3244™) was grown in MCDB131 medium
14 (#10372019, Thermo Fisher Scientific) supplemented with human EGF (10 ng/mL) (#E9644, Sigma-
15 Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), hydrocortisone (1 µg/mL) (#H0888, Sigma-Aldrich),
16 glutamine (10 mM) (#25030024, Thermo Fisher Scientific), fetal bovine serum (10%) and penicillin-
17 streptomycin (0.5%). Cells were cultured and passed twice a week, without a passage number higher
18 than 20.

19 The different steps of the co-culture model, as well as its validation were previously described by us
20 (*in press*). Briefly, the co-culture consisted by seeding of endothelial cells (5×10^4 cells) on the lower
21 surface of an inverted insert for 24-well plates, incubation for 4 h at 37°C and 5% CO₂, then the insert
22 was inverted and placed in 24-well plates filled with HULEC-5a medium for 2 days. The next step
23 was the seeding of NCI-H441 (5×10^4 cells) on the upper surface of the insert membranes. Medium
24 was replaced by fresh 'optimised medium' containing MCDB131 medium supplemented with human

1 EGF (10 ng/mL), hydrocortisone (1 µg/mL), glutamine (10 mM), heparin (25 µg/mL), fetal bovine
2 serum (10%) and penicillin-streptomycin solution (0.5%), every other day for the duration of the
3 culture. The two cell lines grew to confluence simultaneously over 8 days. All experiments were
4 conducted on day 8 for co-cultures having a Trans-Epithelial/Endothelial Electric Resistance (TEER)
5 value within 300 and 500 Ω.cm².

6 **2.2 Nicotine exposure on co-culture model or monolayers of epithelial or** 7 **endothelial cells**

8 The co-culture model or the monolayers of NCI-H441 or HULEC-5a were exposed to increasing
9 concentrations of nicotine from 0.1 µM to 1 mM (equivalent to 16,1 µg/L to 161 mg/L). Different
10 concentrations were applied in the upper compartment at day 8 of the co-culture or at day 2 to 4 in
11 monolayers media and different parameters were measured after 4, 6, 8, 24 or 48 hours, depending
12 on the parameters. When nicotine was applied to the upper compartment containing 0.2 ml of
13 medium, the molecule diffused through the barrier to the lower compartment containing 0.8 ml of
14 medium. In total, the nicotine concentration was diluted 1:4 when the total volume of medium was
15 considered. This dilution was applied in the experiments with nicotine exposure of monolayer
16 cultures.

17 **2.3 Assessment of membrane integrity fluctuation after nicotine exposure by** 18 **measuring trans-epithelial/endothelial electric resistance**

19 TEER indicating the paracellular permeability of the NCI-H441/HULEC-5a co-culture was measured
20 with standard STX2 electrodes connected to the Evom2[®] epithelial ohmmeter (World Precision
21 Instruments, Sarasota, Florida, USA). TEER measures were registered 6, 24 and 48 hours after
22 nicotine exposure to follow barrier integrity fluctuations. As TEER decreased, paracellular
23 permeability increased, demonstrating the failure of barrier capacity. TEER values for an insert

1 without cells (blank) were subtracted from the TEER values measured with the co-culture. The result
2 was multiplied by the total membrane surface area (0.3 cm^2) to obtain the resistance value in $\Omega \cdot \text{cm}^2$.
3 As TEER decreased, paracellular permeability increased, demonstrating the failure of barrier
4 capacity.

5 **2.4 Analysis of cell viability after nicotine exposure**

6 **2.5.1. Cells viability analysed by MTS assay**

7 The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
8 (MTS) (#ab197010, Abcam) assay was used to evaluate cell viability in the two compartments of the
9 model. 48-hours after exposure to nicotine concentrations, the media of the upper and lower
10 compartments were removed, and the co-culture was incubated with fresh medium supplemented
11 with MTS for 3 hours at 37°C and 5% CO_2 . Subsequently, $100 \mu\text{L}$ of the upper and lower media were
12 placed on a 96-well plate and the absorbance of the formazan dye, due to the reduction of the MTS,
13 was measured at 490 nm. The results were expressed as a percentage of the unexposed control.

14 **2.5.2. Cell multiplication after nicotine exposure assessed by BrdU assay**

15 The ELISA Bromodeoxyuridine (BrdU) assay (#ab126556, Abcam) was used to detect epithelial and
16 endothelial cells proliferation after exposure to nicotine. Cells were seeded in monolayers on 96-well
17 plates (10^4 cells/well). To consider a possible dilution effect of nicotine when applied on the upper
18 compartment of the co-culture compared to monolayers, nicotine concentrations of from 2.5 nM to
19 $6.25 \mu\text{M}$ were added after 24 hours of culture. Nicotine effect was measured after 24 and 72 hours of
20 exposure by detecting the incorporation of BrdU (1:500 of the stock solution, added 24 hours prior
21 to the end of the experiment) into the newly synthesised DNA of actively proliferating cells, read by
22 a spectrophotometric plate reader set at a dual wavelength of 450/550 nm. The results were expressed
23 as a percentage of the untreated control.

1 **2.5 Evaluation of the superoxide production by the alveolar epithelial cells**

2 The mitochondria-specific fluorescent probe, MitoSOX Red (#M36008, Thermo Fisher Scientific),
3 was used to determine the levels of mitochondrial superoxide produced by alveolar epithelial cells
4 after exposure to increasing concentrations of nicotine.

5 For this, cells were seeded at 10^5 cells/well on a black 96-well plate and incubated at 37°C and 5%
6 of CO₂ for 48 hours. On the day of the experiment, cells were washed twice in HBSS (#14025092,
7 Thermo Fisher Scientific) and incubated for 30 minutes with MitoSOX Red® (5 µM in HBSS). Cells
8 were washed 3 times in HBSS and basal fluorescence was recorded at 510/580 nm using a Varioskan
9 LUX plate reader (Thermo Fisher Scientific). Nicotine was immediately added to the cells (2.5 nM
10 to 50 µM) and the fluorescence was read every minute over a period of 60 minutes. Results were
11 expressed as a percentage of basal fluorescence. The kinetics of superoxide production was assessed
12 by the area under the curve (AUC) of the MitoSOX Red® fluorescence intensity measurement over
13 the 60-minute period.

14 **2.6 Evaluation of cytokines production by the alveolar epithelial cells**

15 NCI-H441 were seeded on 12-well plates (2×10^5 cells/well) and treated on day 3 with 6.25 µM of
16 nicotine. Impact of nicotine was tested on a panel of 20 cytokines released by the alveolar epithelial
17 cells during the early (4 and 8 hours) and late (24 hours) phases of exposure. Supernatant volumes of
18 400 µL were stored at -70°C until analysis. All samples were measured upon first thaw. Cytokine
19 concentrations were measured using the Human Th1/Th2 Cytokine & Chemokine 20-Plex
20 ProcartaPlex Panel 1 which enables exploration of immune function by analysing 20 protein targets
21 in a single well using the MAGPIX® Luminex instrument. The following Th1/Th2 cytokines:
22 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon gamma (IFN-γ), IL-1β, IL-
23 2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-18, tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and
24 chemokines: eotaxin-1 (CCL11), growth-regulated oncogene-alpha (GRO-α, CXCL1), interferon

1 gamma-induced protein 10 (IP-10, CXCL10), monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 (CCL2),
2 macrophage inflammatory proteins (MIP-1 α (CCL3) and MIP-1 β (CCL4)), Regulated upon
3 Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES, CCL5) and stromal cell-derived factor
4 1 alpha (SDF1- α , CXCL12) were analysed.

5 **2.7 Investigation of cellular death pathway**

6 **2.8.1. Necrotic cytotoxicity measured by LDH assay**

7 The LDH assay was used to assess the level of plasma membrane damage in the upper and lower
8 insert cell populations, following nicotine exposure (#ab65393, Abcam). This test is based on an
9 enzymatic reaction of the LDH released from the cell with lactate to generate NADH, which then
10 reacts with a water-soluble tetrazolium salt to generate an orange dye correlated directly with the
11 number of lysed cells. After 48-hour exposure to the e-liquid components and mixtures, 10 μ L of the
12 upper and lower media were placed on a 96-well plate and 100 μ L of the WST were added before
13 incubation at room temperature for 30 minutes. The absorbance of the orange dye was measured by
14 a plate reader at 450 nm. The results were expressed as a percentage of the untreated control.

15 **2.8.2 Investigation of apoptosis (BAX/BCL-2 ratio) and autophagy (LC3II) after nicotine** 16 **exposure**

17 2.8.2.1 Western blot

18 After 24 hours of exposure of NCI-H441 and HULEC-5a monocultures to nicotine (2.5 nM to 6.25
19 μ M), two cell death pathways were investigated by western blot: apoptosis by the Bax/Bcl-2 ratio
20 and autophagy by the autophagosome marker LC3B-II (16 kDa band). NCI-H441 were seeded on 6-
21 well plates (0.5×10^6 cells/well) and treated with the mixtures on day 4. On day 5, cells were lysed,
22 and western blot was performed.

23 Proteins were extracted with the lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors
24 and denatured using a solution containing β -mercaptoethanol (5 minutes at 95°C). Samples

1 containing 20 µg of protein were then separated using 10% SDS-PAGE and transferred onto a
2 polyvinylidene fluoride membrane using a Trans-blot Turbo system (Bio-Rad). One hour incubation
3 in a non-fat milk powder solution (10% in phosphate buffered saline with 0.1% Tween 20 detergent)
4 blocked non-specific sites. Then, the membranes were incubated overnight with the primary antibody
5 specific for the target being tested (diluted according to the supplier's recommendations, usually
6 1:1,000). The next day, the membranes were washed and incubated for 1 hour at room temperature
7 with the secondary antibodies (diluted 1:10,000) conjugated to a horseradish peroxidase (HRP).
8 Revealing of the bands of interest was done by chemiluminescence after 3 minutes of incubation with
9 the HRP substrate (Luminata™) using the ChemiDoc XRS+ detection system (Bio-Rad). The
10 quantification of band intensity was performed by Image Lab™ 6.0 Software (Bio-Rad) relative to
11 total protein in each lane revealed by stain-free method.

12 Rabbit Bax (#ab32503), Bcl-2 (#ab182858) and LC3B (#ab192890) antibodies were obtained from
13 Abcam.

14 2.8.2.2 Immunofluorescence staining

15 LC3B was also immunostained after 24-hour exposure of NCI-H441 and HULEC-5a cells to nicotine
16 (2.5 nM to 6.25 µM). Cells were seeded on 8-well format of Lab-Tek chamber slides (1 x 10⁶
17 cells/well) and treated with nicotine on the second day. After 24 hours, cells were fixed with 4%
18 paraformaldehyde for 15 min at room temperature, then non-specific sites blocked with 5% goat
19 serum in phosphate buffered saline Triton X-100 0.3% for 1 hour at room temperature. After this,
20 cells were incubated at 4°C overnight with the LC3B primary antibody (1:100, #ab192890) in 1%
21 bovine serum albumin. The next day, cells were extensively washed and then incubated with the
22 second antibody (Alexa fluor-488, #AP132JA4, Sigma-Aldrich) for 2 hours in 1% bovine serum
23 albumin. Aqueous mounting medium containing DAPI counterstained the nuclei. The cells were
24 observed by confocal fluorescent microscopy (Zeiss LSM 800).

1 **2.8 Statistical analysis**

2 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9[®] (GraphPad Software, San Diego, CA,
3 USA). Differences between groups were analysed using one-way or two-way ANOVA tests and a p-
4 value of less than 0.05 was required to consider statistical significance. Data from three or more
5 independent experiments are reported as mean ± standard deviation or otherwise specified.

6 **3. Results**

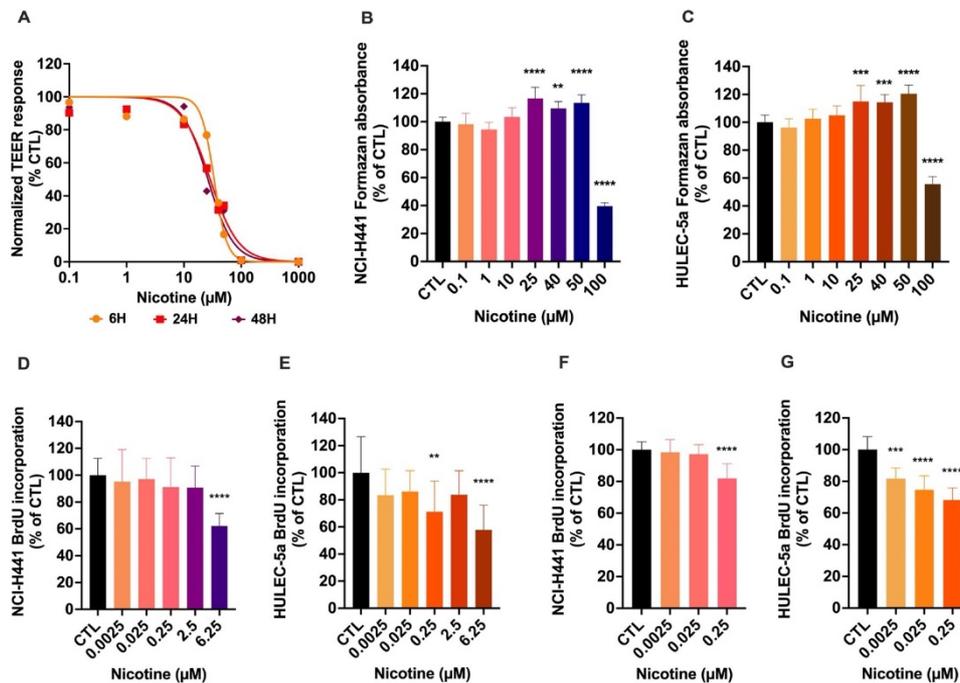
7 **3.1 Nicotine impaired barrier integrity and cell viability**

8 On day 8, the co-culture was exposed to increasing concentrations of nicotine. TEER measurements
9 at 6, 24 and 48 hours decreased as nicotine concentrations increased, resulting in 50% impairment of
10 membrane integrity at 33.7 μM, 28.7 μM and 26.3 μM, respectively (Figure 1A). To understand
11 whether the decrease in TEER was due to cell death, MTS assay was performed on the upper and
12 lower compartments of the co-culture post-exposure to increasing concentrations of nicotine.

13 In the upper compartment of the co-culture (NCI-H441 cells), the cell viability was reduced by 60.4%
14 after exposure of 100 μM of nicotine, but formazan absorbance increased after 25, 40 or 50 μM of
15 nicotine during 48 hours of exposure (Figure 1B). With a similar pattern, in the lower compartment
16 of the co-culture (HULEC-5a) formazan absorbance increased from 25 to 50 μM to nicotine exposure
17 then decreased by 44.4% after 100 μM of nicotine applied in the upper compartment.

18 The conversion of MTS is carried out by NAD(P)H-dependent dehydrogenase enzymes only in
19 metabolically active cells. As the MTS results showed significant enzymatic activity, the BrdU assay
20 was performed to study cell proliferation. In contrast to the MTS assay, a slowing of cell proliferation
21 was observed in NCI-H441 and HULEC-5a monolayers exposed for 24 hours to nicotine. In NCI-
22 H441 and HULEC-5a monolayers, 6.25 μM nicotine induced -37.9 and -42.3% proliferation
23 compared to untreated cells, respectively, $p < 0.0001$ (Figure 1D-E). After 72 hours of nicotine
24 exposure, much lower concentrations of nicotine significantly inhibited cell proliferation: 0.25 μM

1 for NCI-H441 and 2.5 nM for HULEC-5a (F-G). Thus, we can conclude that nicotine induces
 2 mitochondrial enzymatic activation in cells, while reducing cell proliferation.



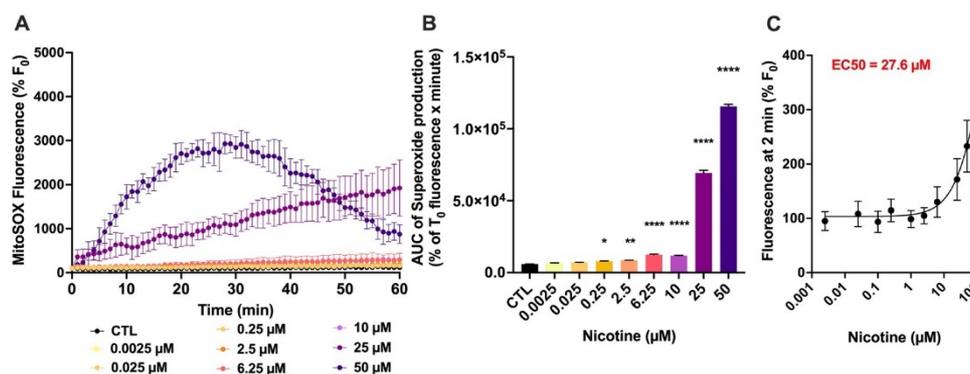
3
 4 **Figure 1** – (A) Effects of increasing nicotine concentrations on barrier resistance after 6-, 24- and 48-hour exposure modelised using
 5 a logarithmic (agonist) response versus the normalised Trans-Epithelial/Endothelial Electric Resistance (TEER) response model. (B-
 6 C) Effects of increasing concentrations of nicotine on NAD(P)H-dependent dehydrogenases activity in the upper (NCI-H441, B) and
 7 the lower (HULEC-5a, C) compartments of the co-culture model measured by the formazan absorbance. (D-G) Effects of nicotine on
 8 NCI-H441 (D and F) and HULEC-5a (E and G) monolayers cell proliferation using the BrdU assay after exposure to 24 hours (D-E)
 9 and 72 hours of nicotine (F-G). Histograms represent mean \pm SD from at least three independent experiments. Comparison between
 10 different exposures versus untreated cells was performed using a 1-factor ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Dunnett's multiple
 11 comparison test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

12 **3.2 Nicotine induced oxidative stress in a dose-dependent manner**

13 To confirm the role of mitochondria in the effects of nicotine, mitochondrial superoxide production
 14 was measured by MitoSOX Red[®] in alveolar epithelial cells, the first cells affected after exposure to
 15 nicotine in the physiological alveolar capillary barrier.

16 AUC results of mitochondrial superoxide production showed that nicotine significantly increased
 17 oxidative stress at concentrations above 0.25 μM in NCI-H441 cells ($p = 0.0233$) (Figure 2A). As the
 18 nicotine concentration increased, the kinetics of superoxide anion production became faster and more

1 prominent (Figure 2B). Furthermore, the MitoSOX fluorescence time curve for 50 μM nicotine
 2 showed a rapid increase in superoxide anion production with a peak around 30 min after exposure
 3 which was followed by a decrease. This decrease in superoxide anion production by mitochondria
 4 can be explained by the death of NCI-H441 cells.

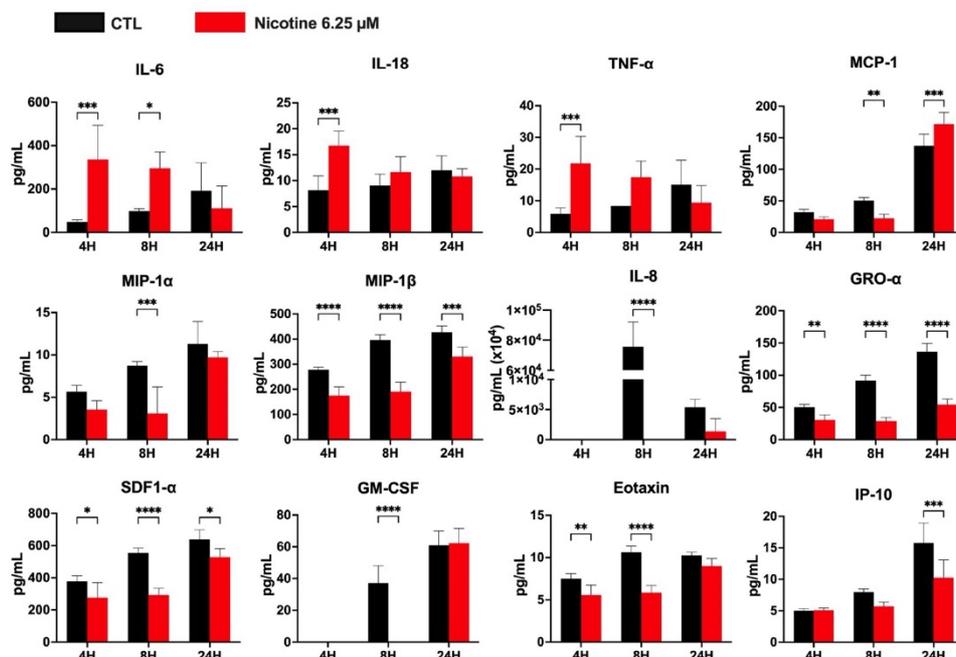


5
 6 **Figure 2** – Effects of increasing concentrations of nicotine on mitochondrial oxidative stress of alveolar NCI-H441 epithelial
 7 monolayers. (A) Kinetics of MitoSOX fluorescence revealing superoxide production were followed for 60 minutes after nicotine
 8 deposition. (B) Total fluorescence measured by the area under the curve (AUC) of superoxide production for 1 hour was dependent on
 9 the nicotine dose. (C) Dose-effect curve of increasing nicotine concentrations on mitochondrial superoxide production after 2 minutes
 10 of exposure modelised using a logarithmic (agonist) response versus the MitoSOX fluorescence response model. Histograms represent
 11 mean \pm SD from at least three independent experiments of triplicates. Comparisons between different concentrations *versus* untreated
 12 cells were performed using a 1-factor ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.05$; ** $p <$
 13 0.01; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

14 3.3 Nicotine induced multiple inflammatory cytokines

15 The alveolar epithelium is the first line of protection against respiratory stressors, with alveolar type
 16 II cells being key cells of the alveolar epithelium, as they have immunomodulatory functions (Ruaro
 17 et al. 2021). A total of 20 cytokines were measured in cell supernatant collected from NCI-H441
 18 monolayers treated with 6.25 μM of nicotine for 4, 8 and 24 hours. First, nicotine did not alter the
 19 secretion of 8 out of 20 cytokines and chemokines. Thus, IL-5 and RANTES levels were not different
 20 from those of untreated cells after 4, 8 or 24 hours of exposure. Six out of 20 cytokines were below
 21 the lower limit of quantification (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-12p70, IL-13). More interestingly, the
 22 levels of twelve cytokines were consistently different from those released by untreated cells in both
 23 the early and late phases: three were higher (IL-6, IL-18, and TNF- α) and seven were lower (MCP-

1 1, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , GRO- α , SDF1- α , GM-CSF and eotaxin-1) in the early phase, while one
 2 was higher (MCP-1) and four that were lower (GRO- α , SDF1- α , IP-10, MIP-1 β) in the late phase
 3 (Figure 3).



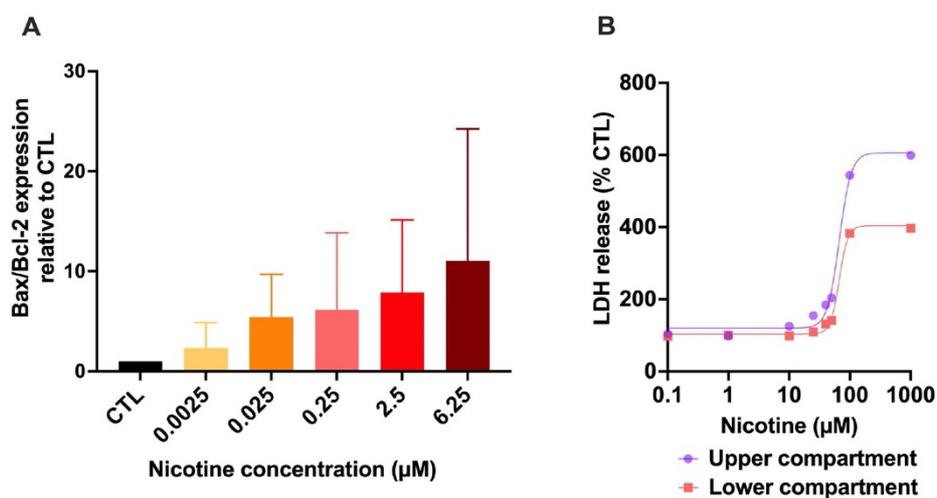
4
 5 **Figure 3** – Effects of 6.25 μ M nicotine concentration on a panel of 20 cytokines using the ProcartaPlex Panel 1 (MAGPIX Luminex
 6 technology). Three exposure times were investigated: 4, 8 and 24 hours. Comparisons between different exposures *versus* untreated
 7 cells were performed using a 2-factors ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Šidák's multiple comparisons test. * $p < 0.05$; ** $p <$
 8 0.01 ; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

9 3.4 Nicotine induced epithelial cell death in a dose-dependent manner

10 3.4.1. Nicotine induced necrotic but not apoptotic cytotoxicity

11 To assess the impact of nicotine on the induction of apoptotic process, the ratio Bax/Bcl-2 was
 12 measured. When NCI-H441 cells were exposed to increasing concentrations of nicotine, there was a
 13 trend towards an increase in the Bax/Bcl-2 ratio, without statistical significance, showing that
 14 apoptosis is not the main mechanism of cell death induction in NCI-H441 cells 24 hours after
 15 exposition to nicotine (Figure 4A).

1 LDH release was measured in the upper and lower compartment after 48 hours of nicotine exposure.
 2 The 66.8 μM nicotine concentration induced 50% cell lysis in the upper and lower compartments of
 3 the coculture, showing that cell necrosis occurred at concentrations about twice as high as the loss of
 4 barrier integrity (Figure 4B).

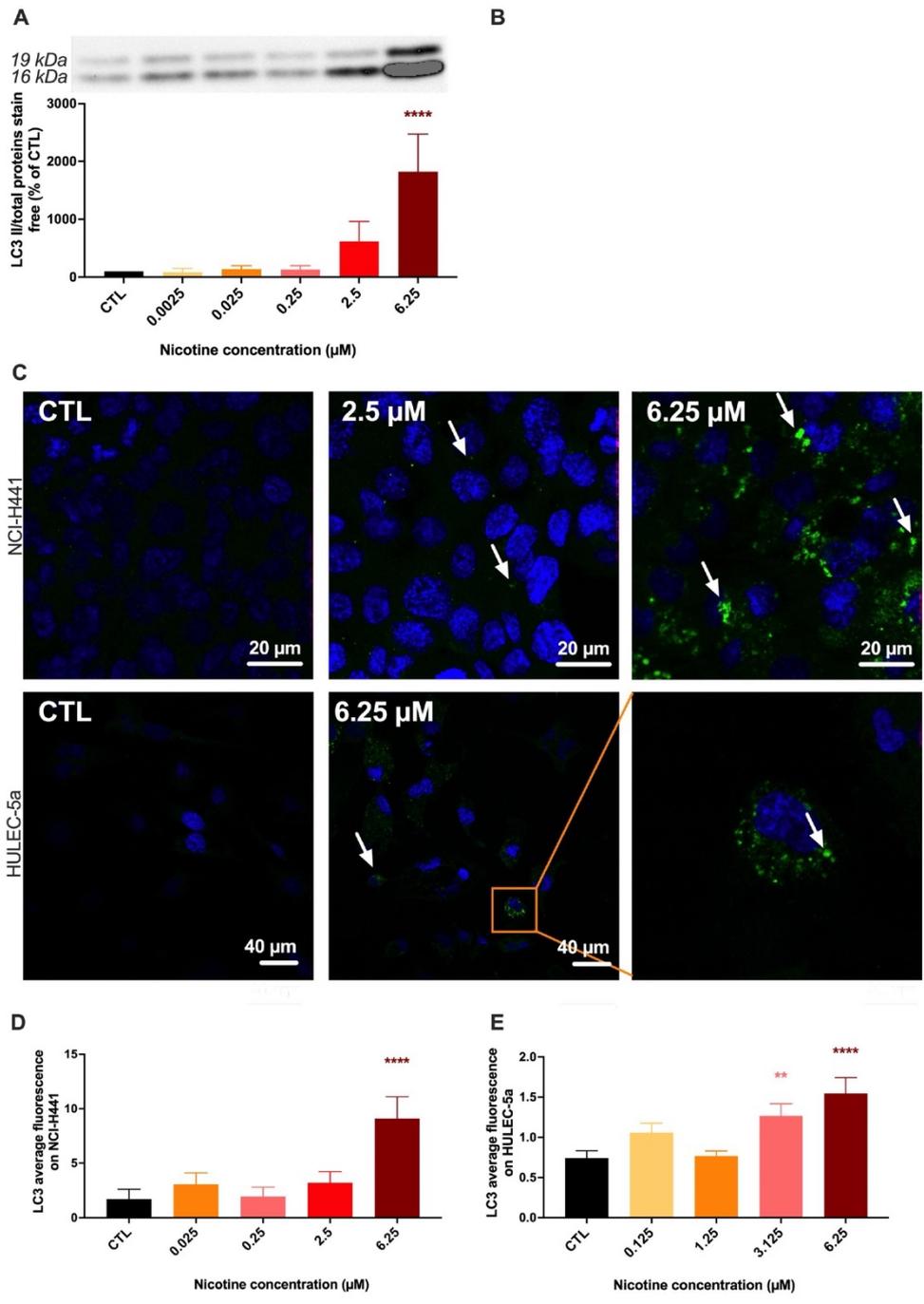


5
 6 **Figure 4 – (A)** Effect of nicotine on apoptotic Bax/Bcl-2 ratio quantified by Western blot. Histogram represents mean \pm SD from at
 7 least three independent experiments. Comparison between different exposures versus untreated cells was performed using a 1-factor
 8 ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.
 9 **(B)** Effects of increasing concentrations of nicotine on LDH release in the upper (NCI-H441, purple) and the lower (HULEC-5a, red)
 10 compartments of the co-culture model. The curve was modelised using a logarithmic (agonist) response versus the normalised LDH
 11 activity response model.

12 3.4.1. Nicotine induced autophagy process

13 To assess the impact of nicotine on the induction of autophagic processes, the expression of LC3B-
 14 II was measured.
 15 LC3B-II protein expression showed an increasing trend for the 2.5 μM concentration ($p = 0.0578$)
 16 which became statistically significant for the 6.25 μM concentration ($p < 0.0001$) in NCI-H441 cells
 17 in western blot (Figure 5 A). Immunostainings of LC3B showed the presence of green intracellular
 18 puncta as nicotine concentration increased, indicating the presence of autophagosomes forming
 19 punctate structures. Thus, nicotine caused an activation of the autophagic processes in NCI-H441
 20 cells in a concentration-dependent manner.

1 Immunostainings of LC3 after exposure of HULEC-5a to increasing concentrations of nicotine are
2 illustrated in (Figure 5 C). Presence of LC3 puncta also increased in a dose-concentration manner and
3 average fluorescence became statistically significant for concentration above 3.125 μ M in endothelial
4 cells compared to untreated cells.



1

14

1 **Figure 5** – Effect of nicotine on autophagy marker LC3B. **(A-B)** Quantification by Western blot of LC3B-II relative to total proteins
2 using a stain-free technology after increasing concentrations of nicotine on NCI-H441 **(A)** and HULEC-5a **(B)**. **(C)** Immunostainings
3 of LC3B in NCI-H441 cells and HULEC-5a cells after exposure to control, 2.5 and 6.25 μM of nicotine. Arrows illustrate LC3 puncta.
4 The orange square illustrates a zoom on a cell after exposure to 6.25 μM of nicotine. Nuclei were counterstained with DAPI. Cells
5 treated with the secondary antibody and no primary antibody were used as control (data not shown). **(D-E)** Quantification of the average
6 fluorescence intensity values obtained from LC3B immunostainings after different nicotine concentrations in NCI-H441 **(D)** and
7 HULEC-5a **(E)** cells. Histograms represent mean \pm SD from at least three independent experiments. The values were obtained using
8 ImageJ software. Comparison between different exposures versus untreated cells was performed using a 1-factor ANOVA test ($\alpha =$
9 0.05) followed by a Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

10 **4. Discussion**

11 In this work, the effects of nicotine, the active chemical ingredient of a variety of devices including
12 tobacco and electronic cigarette, on a functionally and phenotypically validated cell model of the
13 alveolar-capillary barrier were revealed. It defined that the cell responses induced by nicotine
14 exposure are deleterious to lungs as they involve inflammation, oxidative stress, and cell death
15 leading to the loss of barrier integrity.

16 Nicotine induced a decrease in TEER after 4, 24 and 48 hours of exposure, the concentrations
17 triggering 50% of TEER drop being of 33.7 μM , 28.7 μM and 26.3 μM , respectively, showing that
18 nicotine alters the barrier integrity. Cell necrosis with LDH release occurred at higher concentrations
19 than loss of barrier integrity, with 50% of cell necrosis after 48 hours of exposure to 66.8 μM of
20 nicotine, in the upper and lower compartments. Considering a dilution factor of 1:5 due to the rapid
21 passage of nicotine from the upper compartment of deposition to the lower compartment, lower
22 concentrations of nicotine were applied to monolayers grown in standard well plates. Proliferation of
23 HULEC-5a and NCI-H441 cells was slowed after 0.0025 and 0.25 μM nicotine, respectively,
24 showing that nicotine remaining residually in the alveoli is detrimental to barrier cell turnover.

25 The nicotine concentration in serum has been well studied, but less information exists about nicotine
26 levels in lungs immediately after smoking or even more after vaping. Published reports have
27 estimated that the concentration of nicotine in the alveolar lining fluid was about 6 to 60 μM after
28 smoking one cigarette (Clunes et al. 2008; Hoshino et al. 2001) and a recent study found that vaping
29 lead to a similar level of nicotine as seen in smokers' sputum which was around 50 μM , 30 minutes
30 after vaping (Ghosh et al. 2019). However, the amount of nicotine delivered varies according to a

1 large variety of parameters as the generation of the device or the user vaping habits (Behar, Hua, and
2 Talbot 2015). Thus, it is likely that much higher levels of nicotine are initially present in alveoli,
3 exposing cells to brief but possibly deleterious effects, as demonstrated by our results of the
4 superoxide anion production in a dose-dependent manner on alveolar cells measured for one hour.
5 Nicotine effect on oxidative stress is not completely clear, as contradictory data have been published,
6 with sometimes a dual effect highlighted depending on nicotine concentration. It has been reported
7 that nicotine has antioxidant properties at lower doses (10 μM), whereas higher concentration (10
8 mM) induces ROS production on rat pheochromocytoma cells (Guan 2003). We tested concentrations
9 from 2.5 nM to 50 μM in alveolar epithelial cells and identified a dose-dependent specific
10 mitochondrial production of superoxide anion, with production being statistically higher than the
11 untreated cells for concentrations above 0.25 μM , thus not supporting the threshold hypothesis. Other
12 studies have found similar results, confirming the absence of a threshold for nicotine-induced
13 oxidative stress, the increase in ROS levels from 1 μM and the cell death associated with ROS (Barr
14 et al. 2007; Demiralay, Gürsan, and Erdem 2006; Zanetti et al. 2014). In a recent *in vivo* publication,
15 the antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase were decreased in
16 nicotine treatment group in rat brain and testis compared to control group (Saad et al. 2020).
17 The production of excess ROS disturbs the counterbalancing power of cellular detoxification systems
18 and is known to be detrimental to the airways, triggering the expression and release of pro-
19 inflammatory cytokines and activating signaling cascades related to this inflammation. Alveolar cell
20 inflammation was also evident in this study. Nicotine exposition markedly increased pro-
21 inflammatory cytokines TNF- α , IL-18 and IL-6 at early stages of exposure and MCP-1 at late stage.
22 In response to pulmonary irritants, alveolar type II cells can produce cytokines and chemokines, such
23 as TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α , GRO- α and GM-CSF (Geiser et al. 2000; Katsura et al.
24 2019; Ramalingam et al. 2021). Pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-1 β are
25 responsible for early responses and amplify inflammatory reactions. Although TNF- α and IL-6 were

1 increased in our study, IL-1 β which plays a role in alveolar epithelial repair (Geiser et al. 2000)
2 remained below the limit of quantification of our method. IL-18 has been shown to trigger a diversity
3 of actions, including stimulation of T cell proliferation and promotion of Th1-type responses.
4 High levels of MCP-1 and GRO- α were found in sputum from patients with COPD compared with
5 non-smokers and healthy smokers, correlated with increased number of macrophages in their lungs
6 (Traves 2002). In our study, secretion of MCP-1 was increased, but that of GRO- α was decreased
7 after 24 hours of nicotine exposure. MCP-1 is a chemokine which exerts its effects via CCR2
8 receptors in the recruitment of inflammatory cells as monocytes, lymphocytes B and T, when GRO-
9 α is involved in the recruitment of monocytes and neutrophils. The nicotine-induced upregulation of
10 MCP-1 was shown to pass through the modulation of ERK1/2/AP-1 signaling (Liu et al. 2017). IL-5
11 and RANTES, which are involved in eosinophil recruitment with eotaxins, was not modified by
12 nicotine exposure and despite a lower production of eotaxin in the early stages of exposure compared
13 to the control, the concentration was not different after 24 hours of exposure, showing that the
14 immune recruitment pathway of eosinophils does not seem to be activated by nicotine, comforting
15 previous publications (Tilp et al. 2016). Although IL-12 has been shown to be secreted by airway
16 epithelium during inflammation in a more complex environment of mice lungs (Walter et al. 2001),
17 it is mostly produced by activated hematopoietic phagocytic cells and dendritic cell which become
18 activated upon it (Trinchieri 2003). IL-12 is also a potent inducer of IFN- γ production from T cells,
19 natural killer cells, and other cell types (Trinchieri 2003). In our alveolar epithelial cell model, IFN-
20 γ levels were below the limit of quantification. Alveolar epithelial cells have not been shown to
21 produce IL-2, IL-4 and IL-13, which is consistent with their concentrations below the limit of
22 quantification after exposure of NCI-H441 cells to nicotine (Junttila 2018; Nelson 2004).
23 Inflammatory mediators and ROS create a dysfunctional cycle which promotes cell death. In this
24 study, three types of cellular death were analysed after nicotine exposure: autophagy, apoptosis and
25 necrosis. There is now considerable interest in autophagy in lung diseases, in which autophagy may

1 be either a protective homeostatic mechanism as it clears cellular components damaged by oxidative
2 stress or inflammation, nor even deleterious due to autophagic activation of fibrosis (Hill and Wang
3 2021). As nicotine increased mitochondrial oxidative stress in our study, we hypothesized that the
4 high level of ROS could trigger the accumulations of deleterious cellular components which further
5 activate autophagy and eventually lead to alveolar pathological remodelling encountered in COPD
6 (Bodas et al. 2016; Bodas and Vij 2017; Fujii et al. 2012). Constitutive autophagy is a self-clearance
7 pathway of oxidised cytoplasmic components, whereas induced autophagy provides protection
8 against oxidative stress. Autophagy-related proteins mediate autophagosome formation. Conjugation
9 of LC3-I to phosphatidylethanolamine results into the lipidated active form, LC3-II. The activation
10 takes place in the initial stages of vesicle formation and ends with the binding of LC3-II to the double
11 membrane of the autophagosome. Immuno-blotting of LC3B-II was performed to evaluate the
12 activation of the autophagic pathway. Significant increase of LC3B-II was observed after 24 hours
13 of nicotine exposure (6.25 μ M) in alveolar epithelial cells. In literature, previous studies reported that
14 treatment with nicotine (1.25, 2.5 and 5 mM) of normal human bronchial epithelium for 6 hours
15 induced aggresome formation via ubiquitinated-protein accumulation in the insoluble protein-fraction
16 (Bodas et al. 2016). On cardiomyocytes, nicotine concentration of 1 μ M enhanced autophagy and
17 inhibited apoptosis, whereas, and at higher concentrations (5, 10 and 15 mM) nicotine inhibited the
18 expressions of P62 and LC3-II and increased apoptosis (Xing et al. 2020). Damaged mitochondria by
19 stress enter in mitophagy until the damage becomes excessive, where deleterious cellular components
20 activate programmed cell death via apoptotic signaling (Wanderoy et al. 2020). In the present work,
21 it was demonstrated that nicotine concentrations up to 6.25 μ M tended to increase apoptosis without
22 a statistically significant Bax/Bcl-2 ratio increase. In a previously cited study, nicotine induced
23 apoptosis at 1000-fold higher concentrations (Xing et al. 2020), suggesting that higher concentrations
24 of nicotine disrupt the oxidative/antioxidative balance of the cell and trigger the mechanism of
25 apoptosis. Another study on human podocytes confirms this hypothesis: cells treated with 0.1, 1 and

1 10 μM of nicotine for 24 hours were not observed to be apoptotic. After 48 hours of exposure,
2 different ratios of apoptotic cells were identified: lower concentration of 0.1 μM did not have a
3 significant impact in apoptotic cell, whereas higher concentrations of 1 and 10 μM dramatically
4 increased the ratio of apoptotic cell. These results indicate that nicotine induces apoptosis in a time
5 and dose-dependent manner (Lan et al. 2016).

6 Finally, in this work, nicotine caused necrosis as a concentration of 66.8 μM nicotine induced a 50%
7 LDH release in the upper and lower compartments of the co-culture, after 48 hours of exposure.
8 Considering nicotine rapid cross of the alveolar-capillary model and dilution in the lower
9 compartment, we can affirm that a 5-fold decreased concentration of nicotine (13.4 μM or 2.2 mg/L)
10 is necessary and sufficient to increase cell necrosis. As discussed above, this high level of nicotine
11 concentration is present only temporary in smokers or vapers alveolar lining, thus necrosis may not
12 be the main mechanism of cell death on normal nicotine delivery systems users.

13 In conclusion, the nicotine amount present in e-cigarette aerosol exposes the alveoli to sufficiently
14 long timelapse that may trigger oxidative stress and inflammation. Its rapid cross of the alveolar
15 barrier and its dilution in the systemic circulation, limit its long-term effects. However, intensive
16 vaping could be more deleterious as it increases residual nicotine concentration in alveoli and trigger
17 autophagy and necrotic pathways of cell death.

18 **5. Conclusion**

19 In the literature, there are numerous scientific studies on the effects of tobacco and other nicotine
20 delivery devices, but few data specifically target nicotine, the molecule responsible for nicotine
21 addiction. Thus, the role of nicotine in the development of lung diseases such as COPD is unclear.
22 The present work describes the specific deleterious effects of nicotine on a model of the alveolar-
23 capillary barrier. Thus, nicotine induces phenomena characteristic of COPD: it increases oxidative
24 stress, causes an increase in markers of inflammation, opens the barrier and induces cell death at

- 1 concentrations found in the lungs of a smoker. We draw attention to electronic devices containing
- 2 nicotine which are therefore also likely to trigger these deleterious processes.

1 Acknowledgments. The authors gratefully thank Pascal KESSLER from the PIC-STRA Imaging
2 Platform (CRBS, Strasbourg), Chloé GOMMENGINGER and Laetitia BEAL from the CNR
3 toxoplasmose/Mycologie (Strasbourg) for their assistance.

4

5 Authorship Contributions

6 Amelia-Naomi Sabo: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation;
7 Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Emma Filaudeau: Formal
8 analysis; Investigation; Methodology; Validation; Writing - review & editing. Sylvia Da Silva:
9 Investigation; Methodology; Writing - review & editing. Guillaume Becker: Investigation;
10 Methodology; Writing - review & editing. Laurent Monassier: Funding acquisition; Resources;
11 Supervision; Writing - original draft; Writing - review & editing. Véronique Kimmel:
12 Conceptualization; Funding acquisition; Methodology; Resources; Supervision; Writing - original
13 draft; Writing - review & editing.

14

1 6. References

- 2 Antoniewicz, Lukasz, Jenny A. Bosson, Jeanette Kuhl, Samy M. Abdel-Halim, Anna Kiessling, Fariborz Mobarrez, and Magnus
3 Lundbäck. 2016. 'Electronic Cigarettes Increase Endothelial Progenitor Cells in the Blood of Healthy Volunteers'.
4 *Atherosclerosis* 255:179–85. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.09.064.
- 5 Barr, Johnny, Chidananda S. Sharma, Shubhashish Sarkar, Kimberly Wise, Liang Dong, Adaikkappan Periyakaruppan, and
6 Govindarajan T. Ramesh. 2007. 'Nicotine Induces Oxidative Stress and Activates Nuclear Transcription Factor Kappa B in
7 Rat Mesencephalic Cells'. *Molecular and Cellular Biochemistry* 297(1–2):93–99. doi: 10.1007/s11010-006-9333-1.
- 8 Behar, Rachel Z., My Hua, and Prue Talbot. 2015. 'Puffing Topography and Nicotine Intake of Electronic Cigarette Users' edited by
9 C. Bullen. *PLOS ONE* 10(2):e0117222. doi: 10.1371/journal.pone.0117222.
- 10 Benowitz, N. L., H. Porchet, L. Sheiner, and P. Jacob. 1988. 'Nicotine Absorption and Cardiovascular Effects with Smokeless
11 Tobacco Use: Comparison with Cigarettes and Nicotine Gum'. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 44(1):23–28. doi:
12 10.1038/clpt.1988.107.
- 13 Bodas, Manish, Colin Van Westphal, Rhett Carpenter-Thompson, Dillip K. Mohanty, and Neeraj Vij. 2016. 'Nicotine Exposure
14 Induces Bronchial Epithelial Cell Apoptosis and Senescence via ROS Mediated Autophagy-Impairment'. *Free Radical
15 Biology and Medicine* 97:441–53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.017.
- 16 Bodas, Manish, and Neeraj Vij. 2017. 'Augmenting Autophagy for Prognosis Based Intervention of COPD-Pathophysiology'.
17 *Respiratory Research* 18(1):83. doi: 10.1186/s12931-017-0560-7.
- 18 Carnevale, Roberto, Sebastiano Sciarretta, Francesco Violi, Cristina Nocella, Lorenzo Loffredo, Ludovica Perri, Mariangela Peruzzi,
19 Antonino G. M. Marullo, Elena De Falco, Isotta Chimenti, Valentina Valenti, Giuseppe Biondi-Zoccai, and Giacomo Frati.
20 2016. 'Acute Impact of Tobacco vs Electronic Cigarette Smoking on Oxidative Stress and Vascular Function'. *CHEST*
21 150(3):606–12. doi: 10.1016/j.chest.2016.04.012.
- 22 Chaumont, Martin, Alfred Bernard, Stéphanie Pochet, Christian Mélot, Charaf El Khattabi, Florence Reye, Karim Zouaoui
23 Boudjeltia, Pierre Van Antwerpen, Cédric Delporte, and Philippe van de Borne. 2018. 'High-Wattage E-Cigarettes Induce
24 Tissue Hypoxia and Lower Airway Injury: A Randomized Clinical Trial'. *American Journal of Respiratory and Critical
25 Care Medicine* 198(1):123–26. doi: 10.1164/rccm.201711-2198LE.
- 26 Clunes, L. A., A. Bridges, N. Alexis, and R. Tarran. 2008. 'In Vivo Versus In Vitro Airway Surface Liquid Nicotine Levels
27 Following Cigarette Smoke Exposure'. *Journal of Analytical Toxicology* 32(3):201–7. doi: 10.1093/jat/32.3.201.
- 28 Demiralay, Rezan, Nesrin Gürsan, and Havva Erdem. 2006. 'The Effects of Erdosteine, N-Acetylcysteine, and Vitamin E on
29 Nicotine-Induced Apoptosis of Pulmonary Cells'. *Toxicology* 219(1–3):197–207. doi: 10.1016/j.tox.2005.11.020.
- 30 EL-Hellani, Ahmad, Rola Salman, Rachel El-Hage, Soha Talih, Nathalie Malek, Rima Baalbaki, Nareg Karaoghlanian, Rima
31 Nakkash, Alan Shihadeh, and Najat A. Saliba. 2016. 'Nicotine and Carbonyl Emissions From Popular Electronic Cigarette
32 Products: Correlation to Liquid Composition and Design Characteristics'. *Nicotine & Tobacco Research* ntw280. doi:
33 10.1093/ntr/ntw280.
- 34 Farsalinos, Konstantinos E., Alketa Spyrou, Christos Stefanopoulos, Kalliroi Tsimopoulou, Panagiota Kourkovei, Dimitris Tsiapras,
35 Stamatis Kyrzopoulos, Konstantinos Poulas, and Vassilis Voudris. 2015. 'Nicotine Absorption from Electronic Cigarette
36 Use: Comparison between Experienced Consumers (Vapers) and Naïve Users (Smokers)'. *Scientific Reports* 5(1):11269.
37 doi: 10.1038/srep11269.
- 38 Fearon, Ian M., Alison Eldridge, Nathan Gale, Christopher J. Shepperd, Mike McEwan, Oscar M. Camacho, Mitch Nides, Kevin
39 McAdam, and Christopher J. Proctor. 2017. 'E-Cigarette Nicotine Delivery: Data and Learnings from Pharmacokinetic
40 Studies'. *American Journal of Health Behavior* 41(1):16–32. doi: 10.5993/AJHB.41.1.2.
- 41 Fujii, Satoko, Hiromichi Hara, Jun Araya, Naoki Takasaka, Jun Kojima, Saburo Ito, Shunsuke Minagawa, Yoko Yumino, Takeo
42 Ishikawa, Takanori Numata, Makoto Kawaiishi, Jun Hirano, Makoto Odaka, Toshiaki Morikawa, Stephen Nishimura,
43 Katsutoshi Nakayama, and Kazuyoshi Kuwano. 2012. 'Insufficient Autophagy Promotes Bronchial Epithelial Cell
44 Senescence in Chronic Obstructive Pulmonary Disease'. *Oncotarget* 1(5):630–41. doi: 10.4161/onci.20297.
- 45 Geiser, Thomas, Pierre-Henri Jarreau, Kamran Atabai, and Michael A. Matthay. 2000. 'Interleukin-1 β Augments In Vitro Alveolar
46 Epithelial Repair'. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279(6):L1184–90. doi:
47 10.1152/ajplung.2000.279.6.L1184.
- 48 Ghosh, Arunava, Raymond D. Coakley, Andrew J. Ghio, Marianne S. Muhlebach, Jr Charles R. Esther, Neil E. Alexis, and Robert
49 Tarran. 2019. 'Chronic E-Cigarette Use Increases Neutrophil Elastase and Matrix Metalloprotease Levels in the Lung'.

- 1 *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. doi: 10.1164/rccm.201903-06150C.
- 2 Guan, Z. 2003. 'Dual Effects of Nicotine on Oxidative Stress and Neuroprotection in PC12 Cells'. *Neurochemistry International*
3 43(3):243–49. doi: 10.1016/S0197-0186(03)00009-3.
- 4 Hajek, Peter, Kate Pittaccio, Francesca Pesola, Katie Myers Smith, Anna Phillips-Waller, and Dunja Przulj. 2020. 'Nicotine Delivery
5 and Users' Reactions to Juul Compared with Cigarettes and Other E-cigarette Products'. *Addiction* add.14936. doi:
6 10.1111/add.14936.
- 7 Henningfield, J. 1993. 'Higher Levels of Nicotine in Arterial than in Venous Blood after Cigarette Smoking'. *Drug and Alcohol*
8 *Dependence* 33(1):23–29. doi: 10.1016/0376-8716(93)90030-T.
- 9 Hill, Charlotte, and Yihua Wang. 2021. 'Autophagy in Pulmonary Fibrosis: Friend or Foe?' *Genes & Diseases* S2352304221001161.
10 doi: 10.1016/j.gendis.2021.09.008.
- 11 Hoshino, Yuma, Tadashi Mio, Sonoko Nagai, Hiroyuki Miki, Isao Ito, and Takateru Izumi. 2001. 'Cytotoxic Effects of Cigarette
12 Smoke Extract on an Alveolar Type II Cell-Derived Cell Line'. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and*
13 *Molecular Physiology* 281(2):L509–16. doi: 10.1152/ajplung.2001.281.2.L509.
- 14 Junttila, Ilkka S. 2018. 'Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes'. *Frontiers*
15 *in Immunology* 9:888. doi: 10.3389/fimmu.2018.00888.
- 16 Katsura, Hiroaki, Yoshihiko Kobayashi, Purushothama Rao Tata, and Brigid L. M. Hogan. 2019. 'IL-1 and TNF α Contribute to the
17 Inflammatory Niche to Enhance Alveolar Regeneration'. *Stem Cell Reports* 12(4):657–66. doi:
18 10.1016/j.stemcr.2019.02.013.
- 19 Lan, Xiqian, Rivka Lederman, Judith M. Eng, Seyedeh Shadafarin Marashi Shoshtari, Moin A. Saleem, Ashwani Malhotra, and
20 Pravin C. Singhal. 2016. 'Nicotine Induces Podocyte Apoptosis through Increasing Oxidative Stress' edited by S. E. Dryer.
21 *PLOS ONE* 11(12):e0167071. doi: 10.1371/journal.pone.0167071.
- 22 Liu, Liping, Hongxian Wu, Qunan Cao, Zhenzhen Guo, Anmin Ren, and Qiuyan Dai. 2017. 'Stimulation of Alpha7 Nicotinic
23 Acetylcholine Receptor Attenuates Nicotine-Induced Upregulation of MMP, MCP-1, and RANTES through Modulating
24 ERK1/2/AP-1 Signaling Pathway in RAW264.7 and MOVAS Cells'. *Mediators of Inflammation* 2017:1–12. doi:
25 10.1155/2017/2401027.
- 26 Marynak, Kristy L., Doris G. Gammon, Todd Rogers, Ellen M. Coats, Tushar Singh, and Brian A. King. 2017. 'Sales of Nicotine-
27 Containing Electronic Cigarette Products: United States, 2015'. *American Journal of Public Health* 107(5):702–5. doi:
28 10.2105/AJPH.2017.303660.
- 29 Nelson, Brad H. 2004. 'IL-2, Regulatory T Cells, and Tolerance'. *The Journal of Immunology* 172(7):3983–88. doi:
30 10.4049/jimmunol.172.7.3983.
- 31 Osei, Albert D., Mohammadhassan Mirbolouk, Olusola A. Orimoloye, Omar Dzaye, S. M. Ifekhar Uddin, Emelia J. Benjamin,
32 Michael E. Hall, Andrew P. DeFilippis, Andrew Stokes, Aruni Bhatnagar, Khurram Nasir, and Michael J. Blaha. 2019.
33 'Association Between E-Cigarette Use and Cardiovascular Disease Among Never and Current Combustible-Cigarette
34 Smokers'. *The American Journal of Medicine* 132(8):949-954.e2. doi: 10.1016/j.amjmed.2019.02.016.
- 35 Ramalingam, Anand, Siti Balkis Budin, Norsyahida Mohd Fauzi, Rebecca H. Ritchie, and Satirah Zainalabidin. 2021. 'Targeting
36 Mitochondrial Reactive Oxygen Species-Mediated Oxidative Stress Attenuates Nicotine-Induced Cardiac Remodeling and
37 Dysfunction'. *Scientific Reports* 11(1):13845. doi: 10.1038/s41598-021-93234-4.
- 38 Ruaro, Barbara, Francesco Salton, Luca Braga, Barbara Wade, Paola Confalonieri, Maria Concetta Volpe, Elisa Baratella, Serena
39 Maiocchi, and Marco Confalonieri. 2021. 'The History and Mystery of Alveolar Epithelial Type II Cells: Focus on Their
40 Physiologic and Pathologic Role in Lung'. *International Journal of Molecular Sciences* 22(5):2566. doi:
41 10.3390/ijms22052566.
- 42 Saad, Anouar Ben, Ilhem Rjeibi, Noura Brahmi, Elimame Elaloui, and Nacim Zouari. 2020. 'Nicotine-Induced Oxidative Stress,
43 Testis Injury, AChE Inhibition and Brain Damage Alleviated by Mentha Spicata'. *Inflammopharmacology* 28(4):939–48.
44 doi: 10.1007/s10787-019-00650-0.
- 45 Tilp, C., H. Bucher, H. Haas, M. J. Duechs, E. Wex, and K. J. Erb. 2016. 'Effects of Conventional Tobacco Smoke and Nicotine-
46 Free Cigarette Smoke on Airway Inflammation, Airway Remodelling and Lung Function in a Triple Allergen Model of
47 Severe Asthma'. *Clinical & Experimental Allergy* 46(7):957–72. doi: 10.1111/cea.12665.
- 48 Traves, S. L. 2002. 'Increased Levels of the Chemokines GRO α and MCP-1 in Sputum Samples from Patients with COPD'.

1 *Thorax* 57(7):590–95. doi: 10.1136/thorax.57.7.590.

2 Trinchieri, Giorgio. 2003. 'Interleukin-12 and the Regulation of Innate Resistance and Adaptive Immunity'. *Nature Reviews*
3 *Immunology* 3(2):133–46. doi: 10.1038/nri1001.

4 Walter, Michael J., Naohiro Kajiwara, Peter Karanja, Mario Castro, and Michael J. Holtzman. 2001. 'Interleukin 12 P40 Production
5 by Barrier Epithelial Cells during Airway Inflammation'. *Journal of Experimental Medicine* 193(3):339–52. doi:
6 10.1084/jem.193.3.339.

7 Wanderoy, Simone, J. Tabitha Hees, Ramona Klesse, Frank Edlich, and Angelika B. Harbauer. 2020. 'Kill One or Kill the Many:
8 Interplay between Mitophagy and Apoptosis'. *Biological Chemistry* 402(1):73–88. doi: 10.1515/hsz-2020-0231.

9 Xing, Ruinan, Xiaoli Cheng, Yanping Qi, Xiaoxiang Tian, Chenghui Yan, Dan Liu, and Yaling Han. 2020. 'Low-Dose Nicotine
10 Promotes Autophagy of Cardiomyocytes by Upregulating HO-1 Expression'. *Biochemical and Biophysical Research*
11 *Communications* 522(4):1015–21. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.086.

12 Zanetti, Filippo, Marta Giacomello, Yves Donati, Stephanie Carnesecchi, Maud Frieden, and Constance Barazzone-Argiroffo. 2014.
13 'Nicotine Mediates Oxidative Stress and Apoptosis through Cross Talk between NOX1 and Bcl-2 in Lung Epithelial
14 Cells'. *Free Radical Biology and Medicine* 76:173–84. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.002.

15

16

Conclusion et perspectives

Les travaux menés durant cette thèse universitaire étaient déclinés en 3 objectifs principaux :

- Le premier, chez l'Homme, était de comparer la pharmacocinétique de la nicotine et la formation d'espèces pro-oxydantes après vapotage de deux e-liquides qui diffèrent par leur ratio PG/VG chez des sujets adultes sains maîtrisant l'acte de vapotage.
- Le deuxième, chez l'animal, consistait à valider un modèle murin sensible à l'exposition chronique à la cigarette classique qui développe une inflammation chronique des voies respiratoires et qui pourrait être utilisé comme contrôle positif pour l'exposition aux e-cigarettes.
- Le troisième, *in vitro*, était d'étudier les effets pulmonaires des principaux composants des e-liquides et de cinq e-liquides commercialisés, aromatisés avec et sans nicotine, sur un nouveau modèle cellulaire robuste de barrière alvéolo-capillaire. Leurs effets sur l'intégrité membranaire, le stress oxydant, l'inflammation et la mort cellulaire ont été plus particulièrement étudiés.

Dans la première partie, les premiers résultats de l'étude clinique VAPexp'AIR ont permis de décrire la cinétique d'absorption de la nicotine à partir de deux liquides qui diffèrent par leur ratio en PG/VG. Ainsi, des résultats cliniques montrent que la proportion des principaux composants servant de véhicule à la molécule de nicotine peut avoir un impact sur l'aérosolisation de la nicotine, donc, par conséquent, sur son absorption pulmonaire. Une quantité plus importante de nicotine a été consommée à partir du e-liquide enrichi en PG, par rapport au e-liquide ayant une proportion égale de PG et de VG. En conséquence, une forte tendance à l'augmentation de la C_{\max} de nicotine a été observée après l'inhalation du e-liquide contenant une proportion de PG/VG à 76/24 en comparaison à une consommation par le même sujet du e-liquide avec une proportion de PG/VG à 50/50. Deuxièmement, cette étude montre qu'un dispositif dit de 3^{ème} génération délivre une quantité moyenne de nicotine de 1,2 mg à partir d'un liquide ayant une concentration de nicotine à 6 mg/mL, cette valeur étant semblable

à celle délivrée à partir d'une cigarette classique (0,9 à 2,1 mg) (Digard et al. 2013). Ainsi, ces dispositifs peuvent satisfaire les utilisateurs en termes de gestuelle, de sensation face au besoin de fumer et d'effets cognitifs recherchés lors de la prise nicotinique (Gravelly et al. 2020; Voos et al. 2019). Dans l'étude VAPexp'AIR, les raisons de l'utilisation des e-cigarettes et la satisfaction des utilisateurs n'ont pas été évaluées. La satisfaction à l'égard d'un produit de drogue récréative est susceptible d'influencer l'utilisation du produit (Saddleson et al. 2016) puisqu'elle est associée au potentiel d'abus du produit. Selon le dernier rapport du *Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks* (SCHEER), il existe des preuves solides que la nicotine dans les e-liquides est impliquée dans le développement de la dépendance et que les arômes ont une contribution pertinente pour l'attrait de l'utilisation de la cigarette électronique et son initiation (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. 2022). Le problème du développement d'une dépendance et le rôle attractif des arômes sont encore plus d'actualité depuis l'arrivée sur le marché français, fin 2021, de nouveaux produits électroniques jetables appelés « Puffs » qui ont gagné en popularité chez les enfants et les adolescents. Leurs conditionnements colorés avec des images de dessins animés, leurs goûts fruités et leur médiatisation sur les réseaux sociaux permettent d'attirer un public bien plus jeune, faisant craindre une épidémie pédiatrique voire des phénomènes de « passerelle » (e-cigarette vers cigarette classique). Bien que la vente de e-cigarettes soit normalement interdite aux mineurs, il semble plutôt facile de se procurer des « puffs » vendues sur internet ou dans des magasins spécialisés dans le vapotage. Les puffs contiennent de la nicotine à des concentrations soumises à la même limite européenne que les autres dispositifs électroniques, mais des puffs avec des concentrations de nicotine plus élevées peuvent être achetées sur des sites internet localisés à l'étranger.

Selon le dernier rapport de l'Observatoire Français des Drogues et des Tendances addictives, en 2021, les ventes de cigarettes ont diminué de 6,9 % tandis que la part de marché des autres

produits du tabac a augmenté de 4,8 % (site consulté le 07/10/2022, <https://www.ofdt.fr/publications/collections/bilans/tabagisme-et-arret-du-tabac-en-2021/>). Ces derniers représentent désormais 5,6 % des volumes vendus (chiffre le plus haut jamais enregistré). Cette baisse exceptionnelle des ventes de tabac pourrait s'expliquer par l'augmentation des prix de vente du paquet de cigarettes, l'augmentation de la perception de dangerosité du tabac dans la population, mais également l'essor prononcé des autres produits du tabac comme la cigarette électronique ou la chicha chez les fumeurs. La cigarette électronique est valorisée d'abord par les fumeurs, mais aussi par une partie des professionnels de santé qui y voient un outil rendant possible une avancée inédite dans la lutte contre le tabagisme, alors que d'autres mettent en garde contre une menace sanitaire liée à la banalisation d'un produit suscitant de nouvelles addictions dont les effets à long-terme sont inconnus.

Ainsi, la question de l'utilisation de la cigarette électronique pour diminuer la consommation de tabac dans une optique de réduire le risque sur la santé, voire comme un outil de sevrage tabagique, reste ouverte.

La stratégie de réduction du risque de nuire attribuée à l'utilisation de la e-cigarette est basée sur la substitution de la dépendance à un objet qui est la cigarette à un autre objet qui est la cigarette électronique et qui est capable de concurrencer la cigarette, tant sur le plan pharmacologique, comportemental que sensoriel, sans reproduire les effets nocifs de la cigarette. Cette stratégie est considérée par beaucoup d'experts comme une voie d'avenir. Cependant, les études de santé publique sur les conséquences réelles d'une telle stratégie sont rares. Une méta-analyse basée sur 141 études a montré que fumer seulement une cigarette par jour comporte un risque de développer une maladie coronarienne et un accident vasculaire cérébral d'environ la moitié de celui des personnes qui fument un paquet par jour. Ainsi, réduire la consommation tabagique n'équivaut pas à l'élimination du risque pour les maladies cardiovasculaires induites par le tabac (Hackshaw et al. 2018). Dans ce cas, une utilisation de

e-cigarette qui serait couplée à une consommation, même moindre, de tabac ne saurait être satisfaisante d'un point de vue de réduction des risques.

De plus, selon l'avis du Haut Conseil de santé publique (HCSP) du 26 novembre 2021 relatif aux bénéfices-risques de la e-cigarette (consulté en ligne le 07/10/2022 : <https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/AvisRapportsDomaine?clefr=1138>), les connaissances fondées sur les preuves sont insuffisantes pour proposer la e-cigarette comme aide au sevrage tabagique dans la prise en charge des fumeurs par les professionnels de santé. En effet, des traitements médicamenteux ayant prouvé leur efficacité doivent être proposés par les personnels de santé, sauf dans le cas où les personnes ont une acceptation faible des traitements de référence, mais adhèrent aux e-cigarettes (Annexe 7). Ainsi, pour une personne qui, en l'absence de e-cigarettes, ne prendrait pas d'autres traitements dans le cadre d'un sevrage tabagique, l'utilisation de e-cigarettes pourrait représenter une opportunité *versus* l'absence de prise en charge. Toutefois, dans cette population spécifique, des études cliniques sont à promouvoir de manière à trancher la question récurrente de l'intérêt du vapotage dans l'arrêt du tabagisme. Par ailleurs, pour ces patients, il est indispensable de proposer des produits sécurisés sur la base d'études pré-cliniques fiables dans le but que les e-cigarettes soient réglementées et évaluées comme les thérapeutiques expérimentales dans une série bien définie et transparente de modèles animaux.

Pour essayer d'apporter quelques éléments de réponse concernant les effets de la cigarette électronique sur la santé humaine, la suite du projet a consisté à développer des outils pré-cliniques chez la souris et *in vitro* grâce à la modélisation de la barrière alvéolo-capillaire.

Ainsi, dans la deuxième partie du projet, un modèle d'inflammation pulmonaire chronique après exposition à la fumée de cigarette a été développé chez la souris, du même type que celle retrouvée dans la BPCO. Les modèles animaux de BPCO sont indispensables puisque cette pathologie est liée à la toxicité chronique et ses composantes mettent de nombreuses années à

se développer, de sorte que les effets réels peuvent ne pas être connus avant des décennies. Le modèle développé présente des caractéristiques pathologiques de la maladie telles que le recrutement des cellules immunitaires (polynucléaires neutrophiles, macrophages, lymphocytes T et polynucléaires éosinophiles) dans les voies aériennes inférieures ou encore l'emphysème pulmonaire. Cependant, d'autres éléments physiopathologiques de la BPCO n'ont pas pu être modélisés comme la présence de marqueurs d'inflammation chronique (IL-1 β , IL-6, TNF- α ...). En conséquence, ce modèle murin nécessite davantage d'ajustements avant son utilisation comme contrôle positif lors de l'exposition à l'aérosol de cigarette électronique. En effet, si une étude comparative est faite entre la cigarette classique et la e-cigarette, il est intéressant de mesurer l'impact de leurs expositions sur le poumon, mais aussi sur d'autres organes visés par la toxicité à long terme de la cigarette classique.

Les premières études sur les effets respiratoires des souris exposées à la e-cigarette montrent l'irritabilité et l'inflammation des voies respiratoires, avec augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles et hypersécrétion de mucus, une susceptibilité accrue aux infections bactérienne et virales (Miyashita et al. 2018; Sussan et al. 2015), et plus préoccupant encore, une présence accrue de marqueurs de l'apoptose dans les cellules alvéolaires et une augmentation des espaces alvéolaires suggérant l'emphysème (Garcia-Arcos et al. 2016), bien que les résultats ne soient pas cohérents avec d'autres études de la littérature (Larcombe et al. 2017; K. M. Lee et al. 2018).

Enfin, une étude a montré que l'exposition à l'aérosol des e-cigarettes était associée à des lésions de l'ADN et des défauts de réparation, que l'on pense survenir par le biais du métabolisme *in situ* de la nicotine en nitrosamines, bien que les e-cigarettes aient été largement présentées comme présentant un risque négligeable de malignité par rapport au tabac (H.-W. Lee et al. 2018). Ces études sont peu nombreuses, présentent souvent des résultats très différents et sans standardisation des modèles animaux, rendant les conclusions difficiles et mettant en évidence

le besoin colossal de mettre en place des modèles animaux reproductibles et transposables à l'homme. Quelques pistes de recherche chez l'animal seraient de définir le rôle spécifique de la nicotine inhalée sur la toxicité pulmonaire, l'effet du vapotage sur les populations présentant des affections telles la BPCO ou encore le rôle des macrophages pulmonaires dans les maladies pulmonaires associées aux e-cigarettes.

Dans la troisième partie de ces travaux, nous avons pu démontrer que l'exposition aux liquides pour cigarette électronique n'est pas sans conséquences cellulaires sur la barrière alvéolo-capillaire *in vitro*. En effet, les principaux composants des e-liquides, que ce soient les véhicules ou la nicotine, et les e-liquides aromatisés commercialisés, sont tous à l'origine de phénomènes aboutissant à la mort cellulaire. Cependant, le modèle cellulaire mis en place est capable de discriminer la toxicité aiguë des différents e-liquides ayant des arômes différents, et ce modèle peut être utilisé pour fournir aux entreprises et aux organismes de contrôle des outils simples pour le screening préliminaire des produits commercialisables. Ainsi, dans l'échelle de toxicité, les e-liquides commercialisés sous les noms « Menthe-Eucalyptus » et « Fruits rouges », mais également la nicotine, ont l'impact le plus délétère sur la barrière alvéolo-capillaire et induisent des mécanismes pathologiques retrouvés dans la BPCO (stress oxydant, inflammation, mort cellulaire par autophagie...). Cependant, la présente étude ne s'est pas intéressée aux substances chimiques aromatiques présentes dans les e-liquides et responsables des effets cytotoxiques observés. De plus, elle a évalué la toxicité des e-liquides, sous forme liquide dans le milieu de culture et non sous forme d'aérosol.

De nombreuses études complémentaires sont donc nécessaires afin de pouvoir faire un tri efficace entre les molécules aromatiques considérées comme toxiques et celles utilisables dans les e-liquides. Dans les perspectives de ce travail, nous voulons mettre en place des méthodes analytiques permettant l'identification d'éléments potentiellement toxiques présents dans le e-liquide qui, par le processus d'aérosolisation, conduisent à la formation de nouvelles espèces et

étudier l'effet de ces dernières sur les processus cellulaires à l'origine de toxicités. Ces méthodes nécessiteront l'analyse chimique par chromatographie des e-liquides (LC/MS) et des composés volatiles présents dans l'aérosol produit (TD-GC/MS), avant l'exposition de l'aérosol sur le modèle cellulaire grâce à une machine génératrice d'aérosol de type VITROCELL®. Enfin, l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans la toxicité de certains composés préalablement identifiés permettra de comprendre et de prédire les relations structure/activité entre ces molécules et leurs cibles. Dans ce cadre, l'implication de la sérotonine et des différents acteurs du système sérotoninergique sera évaluée.

Bien que notre modèle de co-culture présente les principales caractéristiques de la barrière alvéolo-capillaire, il ne contient pas les cellules pivot de la réponse inflammatoire locale : les macrophages alvéolaires. La lignée monocyttaire THP-1 qui, en fonction des conditions de culture, peut se différencier en macrophages M0 puis se polariser en macrophages de type M1 ou M2, est disponible dans notre laboratoire. La différenciation monocyte-macrophage et la polarisation des macrophages au repos (M0) vers les différents sous-types macrophagiques ont déjà été validées dans notre laboratoire. Une autre perspective de travail sera l'ajout des monocytes THP-1 du côté basolatéral du modèle alvéolo-capillaire afin d'étudier le recrutement des monocytes et leur différenciation en macrophage lors de leur intégration au tissu alvéolaire, alors que l'ajout des sous-types macrophagiques du côté apical permettra l'étude des phénomènes inflammatoires et de la réponse immunitaire de manière plus complexe que le modèle composé uniquement de deux lignées.

Seules des études indépendantes et bien argumentées aboutiront à l'acceptation de l'utilisation de e-liquides contrôlés dans le cadre de la substitution tabagique. Ceci signifie que les composants des e-liquides ont été validés pour une utilisation sûre dans des indications qu'il reste à définir par des essais cliniques ayant montré la supériorité de la e-cigarette dans la prise en charge des patients comparée aux autres stratégies thérapeutiques déjà existantes.

Devant le manque de consensus scientifique sur l'efficacité et l'innocuité pour la santé de la e-cigarette, de nombreuses pistes de recherche pré-clinique et clinique évoquées plus haut restent à être investiguées.

Au terme de ces travaux, il existe des arguments cliniques pour émettre l'hypothèse que la cigarette électronique est un outil intéressant en termes de délivrance de nicotine par rapport au tabac. Cependant, des aspects biologiques, cellulaires et biochimiques suffisamment pertinents tirent des sonnettes d'alarme sur l'utilisation de certains e-liquides non-préalablement testés et suggèrent de continuer à faire preuve de prudence dans l'utilisation des e-cigarettes que ce soit à des fins récréatives ou de sevrage tabagique.

Bibliographie

- Abraham, William M. 2008. 'Modeling of Asthma, COPD and Cystic Fibrosis in Sheep'. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 21(5):743–54. doi: 10.1016/j.pupt.2008.01.010.
- Adamson, I. Y., and D. H. Bowden. 1974. 'The Type 2 Cell as Progenitor of Alveolar Epithelial Regeneration. A Cytodynamic Study in Mice after Exposure to Oxygen'. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 30(1):35–42.
- Agustí, Alvar, Lisa D. Edwards, Stephen I. Rennard, William MacNee, Ruth Tal-Singer, Bruce E. Miller, Jørgen Vestbo, David A. Lomas, Peter M. A. Calverley, Emiel Wouters, Courtney Crim, Julie C. Yates, Edwin K. Silverman, Harvey O. Coxson, Per Bakke, Ruth J. Mayer, Bartolome Celli, and for the Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) Investigators. 2012. 'Persistent Systemic Inflammation Is Associated with Poor Clinical Outcomes in COPD: A Novel Phenotype'. *PLOS ONE* 7(5):e37483. doi: 10.1371/journal.pone.0037483.
- Ahijevych, Karen, and Bridgette E. Garrett. n.d. *Menthol Pharmacology and Its Potential Impact on Cigarette Smoking Behavior. Nicotine Tob Res 2004*.
- Allen, Joseph G., Skye S. Flanigan, Mallory LeBlanc, Jose Vallarino, Piers MacNaughton, James H. Stewart, and David C. Christiani. 2016. 'Flavoring Chemicals in E-Cigarettes: Diacetyl, 2,3-Pentanedione, and Acetoin in a Sample of 51 Products, Including Fruit-, Candy-, and Cocktail-Flavored E-Cigarettes'. *Environmental Health Perspectives* 124(6):733–39. doi: 10.1289/ehp.1510185.
- Al-Saleh, Iman, Rola Elkhatib, Tahreer Al-Rajoudi, Ghofran Al-Qudaihi, Pulicat Manogarannogaran, Chafica Eltabache, Aminah Alotaibi, Abdulrahman Bin Mummer, and Saad Almugbel. 2020. 'Cytotoxic and Genotoxic Effects of E-Liquids and Their Potential Associations with Nicotine, Menthol and Phthalate Esters'. *Chemosphere* 249:126153. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126153.
- Ando, M., M. Sugimoto, R. Nishi, M. Suga, S. Horio, H. Kohrogi, K. Shimazu, and S. Araki. 1984. 'Surface Morphology and Function of Human Pulmonary Alveolar Macrophages from Smokers and Non-Smokers'. *Thorax* 39(11):850–56. doi: 10.1136/thx.39.11.850.
- Ansari, Sam, Karine Baumer, Stéphanie Boué, Sophie Dijon, Remi Dulize, Kim Ekroos, Ashraf Elamin, Clement Foong, Emmanuel Guedj, Julia Hoeng, Nikolai V. Ivanov, Subash Krishnan, Patrice Leroy, Florian Martin, Celine Merg, Michael J. Peck, Manuel C. Peitsch, Blaine

Phillips, Walter K. Schlage, Thomas Schneider, Marja Talikka, Bjoern Titz, Patrick Vanscheeuwijck, Emilija Veljkovic, Terhi Vihervaara, Gregory Vuillaume, and Ching Qing Woon. 2016. 'Comprehensive Systems Biology Analysis of a 7-Month Cigarette Smoke Inhalation Study in C57BL/6 Mice'. *Scientific Data* 3(1):150077. doi: 10.1038/sdata.2015.77.

Armstrong, Daniel W., Xiande Wang, and Nuran Ercal. n.d. 'Enantiomeric Composition of Nicotine in Smokeless Tobacco, Medicinal Products, and Commercial Reagents'. 5.

Asami, S., H. Manabe, J. Miyake, Y. Tsurudome, T. Hirano, R. Yamaguchi, H. Itoh, and H. Kasai. 1997. 'Cigarette Smoking Induces an Increase in Oxidative DNA Damage, 8-Hydroxydeoxyguanosine, in a Central Site of the Human Lung'. *Carcinogenesis* 18(9):1763–66. doi: 10.1093/carcin/18.9.1763.

Austin, Victoria, Alyson Miller, and Ross Vlahos. 2019. 'Prior Cigarette Smoke Exposure Does Not Affect Acute Post-Stroke Outcomes in Mice'. *PLoS ONE* 14(3):e0214246. doi: 10.1371/journal.pone.0214246.

Ayme-Dietrich, Estelle, Roland Lawson, Sylvia Da-Silva, Jean Philippe Mazzucotelli, and Laurent Monassier. 2019. 'Serotonin Contribution to Cardiac Valve Degeneration: New Insights for Novel Therapies?' *Pharmacological Research* 140:33–42. doi: 10.1016/j.phrs.2018.09.009.

Azelee, Nur Izyan Wan, Aizi Nor Mazila Ramli, Nor Hasmaliana Abdul Manas, Nurrulhidayah Salamun, Rohaida Che Man, and Hesham El Enshasy. 2019. 'Glycerol In Food, Cosmetics And Pharmaceutical Industries: Basics And New Applications'. 8(12):6.

Bahl, Vasundhra, Sabrina Lin, Nicole Xu, Barbara Davis, Yu-huan Wang, and Prue Talbot. 2012. 'Comparison of Electronic Cigarette Refill Fluid Cytotoxicity Using Embryonic and Adult Models'. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 34(4):529–37. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.08.001.

Banskota, Suhrid, Jean-Eric Ghia, and Waliul I. Khan. 2019. 'Serotonin in the Gut: Blessing or a Curse'. *Biochimie* 161:56–64. doi: 10.1016/j.biochi.2018.06.008.

Bartsch, W., G. Sponer, K. Dietmann, and G. Fuchs. 1976. 'Acute Toxicity of Various Solvents in the Mouse and Rat. LD50 of Ethanol, Diethylacetamide, Dimethylformamide, Dimethylsulfoxide, Glycerine, N-Methylpyrrolidone, Polyethylene Glycol 400, 1,2-Propanediol and Tween 20'. *Arzneimittel-Forschung* 26(8):1581–83.

Bazzan, Erica, Graziella Turato, Mariaenrica Tinè, Claudia M. Radu, Elisabetta Balestro, Chiara Rigobello, Davide Biondini, Marco Schiavon, Francesca Lunardi, Simonetta Baraldo, Federico Rea, Paolo Simioni, Fiorella Calabrese, Marina Saetta, and Manuel G. Cosio. 2017. 'Dual Polarization of Human Alveolar Macrophages Progressively Increases with Smoking and

COPD Severity'. *Respiratory Research* 18(1):40. doi: 10.1186/s12931-017-0522-0.

Beauval, Nicolas, Sébastien Antherieu, Mélissa Soyez, Nicolas Gengler, Nathalie Grova, Michael Howsam, Emilie M. Hardy, Marc Fischer, Brice M. R. Appenzeller, Jean-François Goossens, Delphine Allorge, Guillaume Garçon, Jean-Marc Lo-Guidice, and Anne Garat. 2017. 'Chemical Evaluation of Electronic Cigarettes: Multicomponent Analysis of Liquid Refills and Their Corresponding Aerosols'. *Journal of Analytical Toxicology* 41(8):670–78. doi: 10.1093/jat/bkx054.

Becker, Guillaume, Sylvia Da Silva, Amelia-Naomi Sabo, Maria Cristina Antal, Véronique Kimmel, and Laurent Monassier. 2021. 'Blood-Brain Barrier Permeability: Is 5-Hydroxytryptamine Receptor Type 4 a Game Changer?' *Pharmaceutics* 13(11):1856. doi: 10.3390/pharmaceutics13111856.

Becker, Lillian C., Wilma F. Bergfeld, Donald V. Belsito, Ronald A. Hill, Curtis D. Klaassen, Daniel C. Liebler, James G. Marks, Ronald C. Shank, Thomas J. Slaga, Paul W. Snyder, Lillian J. Gill, and Bart Heldreth. 2019. 'Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics'. *International Journal of Toxicology* 38(3_suppl):6S-22S. doi: 10.1177/1091581819883820.

Behar, Rachel Z., My Hua, and Prue Talbot. 2015. 'Puffing Topography and Nicotine Intake of Electronic Cigarette Users' edited by C. Bullen. *PLOS ONE* 10(2):e0117222. doi: 10.1371/journal.pone.0117222.

Behar, Rachel Z., Wentai Luo, Sabrina C. Lin, Yuhuan Wang, Jackelyn Valle, James F. Pankow, and Prue Talbot. 2016. 'Distribution, Quantification and Toxicity of Cinnamaldehyde in Electronic Cigarette Refill Fluids and Aerosols'. *Tobacco Control* 25(Suppl 2):ii94–102. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2016-053224.

Behar, Rachel Z., Wentai Luo, Kevin J. McWhirter, James F. Pankow, and Prue Talbot. 2018. 'Analytical and Toxicological Evaluation of Flavor Chemicals in Electronic Cigarette Refill Fluids'. *Scientific Reports* 8(1):8288. doi: 10.1038/s41598-018-25575-6.

Bengalli, Rossella, Emanuele Ferri, Massimo Labra, and Paride Mantecca. 2017. 'Lung Toxicity of Condensed Aerosol from E-CIG Liquids: Influence of the Flavor and the In Vitro Model Used'. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14(10):1254. doi: 10.3390/ijerph14101254.

Benowitz, N. L., H. Porchet, L. Sheiner, and P. Jacob. 1988. 'Nicotine Absorption and Cardiovascular Effects with Smokeless Tobacco Use: Comparison with Cigarettes and Nicotine Gum'. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 44(1):23–28. doi: 10.1038/clpt.1988.107.

Benowitz, Neal L. 2009. 'Pharmacology of Nicotine: Addiction, Smoking-Induced Disease, and Therapeutics'. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 49:57–71. doi:

10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742.

Benowitz, Neal L., Janne Hukkanen, and Peyton Jacob. 2009. 'Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers'. Pp. 29–60 in *Nicotine Psychopharmacology*. Vol. 192, edited by J. E. Henningfield, E. D. London, and S. Pogun. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Berlin, Ivan, Isabelle Jacot-Sadowski, Jean-Paul Humair, and Jacques Cornuz. 2021. 'International Expert Consensus on Electronic Nicotine Delivery Systems and Heated Tobacco Products: A Delphi Survey'. *BMJ Open* 11(9):e045724. doi: 10.1136/bmjopen-2020-045724.

Berridge, Marc S., Scott M. Apana, Kenichi K. Nagano, Catherine E. Berridge, Gregory P. Leisure, and Mark V. Boswell. 2010. 'Smoking Produces Rapid Rise of [¹¹C]Nicotine in Human Brain'. *Psychopharmacology* 209(4):383–94. doi: 10.1007/s00213-010-1809-8.

Birkness, K. A., M. Deslauriers, J. H. Bartlett, E. H. White, C. H. King, and F. D. Quinn. 1999. 'An In Vitro Tissue Culture Bilayer Model To Examine Early Events in Mycobacterium Tuberculosis Infection'. *INFECT. IMMUN.* 67:6.

Bitzer, Zachary T., Reema Goel, Samantha M. Reilly, Ryan J. Elias, Alexey Silakov, Jonathan Foulds, Joshua Muscat, and John P. Richie. 2018. 'Effect of Flavoring Chemicals on Free Radical Formation in Electronic Cigarette Aerosols'. *Free Radical Biology & Medicine* 120:72–79. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.020.

Bloom, Adam Joseph, Pan-Fen Wang, and Evan D. Kharasch. 2019. 'Nicotine Oxidation by Genetic Variants of CYP 2B6 and in Human Brain Microsomes'. *Pharmacology Research & Perspectives* 7(2):e00468. doi: 10.1002/prp2.468.

de Boer, Willem I., Jacob K. Sont, Annemarie van Schadewijk, Jan Stolk, J. Han van Krieken, and Pieter S. Hiemstra. 2000. 'Monocyte Chemoattractant Protein 1, Interleukin 8, and Chronic Airways Inflammation in COPD'. *The Journal of Pathology* 190(5):619–26. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200004)190:5<619::AID-PATH555>3.0.CO;2-6.

Bonaldi, Christophe. n.d. 'Les décès attribuables au tabagisme en France. Dernières estimations et tendance, années 2000 à 2013'. 13.

Bortz, W. M., P. Paul, A. C. Haff, and W. L. Holmes. 1972. 'Glycerol Turnover and Oxidation in Man'. *The Journal of Clinical Investigation* 51(6):1537–46. doi: 10.1172/JCI106950.

Bradshaw, Heather B., Siham Raboune, and Jennifer L. Hollis. 2013. 'Opportunistic Activation of TRP Receptors by Endogenous Lipids: Exploiting Lipidomics to Understand TRP Receptor Cellular Communication'. *Life Sciences* 92(8–9):404–9. doi: 10.1016/j.lfs.2012.11.008.

Brossard, Patrick, Rolf Weitkunat, Valerie Poux, Nicola Lama, Christelle Haziza, Patrick Picavet, Gizelle Baker, and Frank Lüdicke. 2017. 'Nicotine Pharmacokinetic Profiles of the

- Tobacco Heating System 2.2, Cigarettes and Nicotine Gum in Japanese Smokers'. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 89:193–99. doi: 10.1016/j.yrtph.2017.07.032.
- Bullen, C., H. McRobbie, S. Thornley, M. Glover, R. Lin, and M. Laugesen. 2010. 'Effect of an Electronic Nicotine Delivery Device (e Cigarette) on Desire to Smoke and Withdrawal, User Preferences and Nicotine Delivery: Randomised Cross-over Trial'. *Tobacco Control* 19(2):98–103. doi: 10.1136/tc.2009.031567.
- Burstyn, Igor. 2014. 'Peering through the Mist: Systematic Review of What the Chemistry of Contaminants in Electronic Cigarettes Tells Us about Health Risks'. *BMC Public Health* 14(1):18. doi: 10.1186/1471-2458-14-18.
- Byrd, G. D., K. M. Chang, J. M. Greene, and J. D. deBethizy. 1992. 'Evidence for Urinary Excretion of Glucuronide Conjugates of Nicotine, Cotinine, and Trans-3'-Hydroxycotinine in Smokers.' *Drug Metabolism and Disposition* 20(2):192–97.
- Cahill, Kate, Nicola Lindson-Hawley, Kyla H. Thomas, Thomas R. Fanshawe, and Tim Lancaster. 2016. 'Nicotine Receptor Partial Agonists for Smoking Cessation'. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016(5):CD006103. doi: 10.1002/14651858.CD006103.pub7.
- Caldwell, Brent, Stuart Dickson, Carl Burgess, Robert Siebers, Sima Mala, Adrienne Parkes, and Julian Crane. 2009. 'A Pilot Study of Nicotine Delivery to Smokers from a Metered-Dose Inhaler'. *Nicotine & Tobacco Research* 11(4):342–47. doi: 10.1093/ntr/ntp027.
- Caldwell, Brent O., Simon J. Adamson, and Julian Crane. 2014. 'Combination Rapid-Acting Nicotine Mouth Spray and Nicotine Patch Therapy in Smoking Cessation'. *Nicotine & Tobacco Research* 16(10):1356–64. doi: 10.1093/ntr/ntu084.
- Cantin, A. M. 2010. 'Cellular Response to Cigarette Smoke and Oxidants: Adapting to Survive'. *Proceedings of the American Thoracic Society* 7(6):368–75. doi: 10.1513/pats.201001-014AW.
- Carnevale, Roberto, Sebastiano Sciarretta, Francesco Violi, Cristina Nocella, Lorenzo Loffredo, Ludovica Perri, Mariangela Peruzzi, Antonino G. M. Marullo, Elena De Falco, Isotta Chimenti, Valentina Valenti, Giuseppe Biondi-Zoccai, and Giacomo Frati. 2016. 'Acute Impact of Tobacco vs Electronic Cigarette Smoking on Oxidative Stress and Vascular Function'. *CHEST* 150(3):606–12. doi: 10.1016/j.chest.2016.04.012.
- Carter, Lawrence P., Maxine L. Stitzer, Jack E. Henningfield, Rich J. O'Connor, K. Michael Cummings, and Dorothy K. Hatsukami. 2009. 'Abuse Liability Assessment of Tobacco Products Including Potential Reduced Exposure Products'. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 18(12):3241–62. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0948.
- Chan, Gary C. K., Daniel Stjepanović, Carmen Lim, Tianze Sun, Aathavan Shanmuga

- Anandan, Jason P. Connor, Coral Gartner, Wayne D. Hall, and Janni Leung. 2021. 'A Systematic Review of Randomized Controlled Trials and Network Meta-Analysis of e-Cigarettes for Smoking Cessation'. *Addictive Behaviors* 119:106912. doi: 10.1016/j.addbeh.2021.106912.
- Chan, Stephen Y., and Joseph Loscalzo. 2008. 'Pathogenic Mechanisms of Pulmonary Arterial Hypertension'. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44(1):14–30. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.09.006.
- Chapman, Richard W. 2008. 'Canine Models of Asthma and COPD'. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 21(5):731–42. doi: 10.1016/j.pupt.2008.01.003.
- Chess, P. R., R. M. Ryan, and J. N. Finkelstein. 1998. 'H441 Pulmonary Epithelial Cell Mitogenic Effects and Signaling Pathways in Response to HGF and TGF-Alpha'. *Experimental Lung Research* 24(1):27–39. doi: 10.3109/01902149809046052.
- Choi, Jae H., Carolyn M. Dresler, Michele R. Norton, and Kenneth R. Strahs. 2003. 'Pharmacokinetics of a Nicotine Polacrilex Lozenge'. *Nicotine & Tobacco Research* 5(5):635–44. doi: 10.1080/1462220031000158690.
- Clapp, Phillip W., Katelyn S. Lavrich, Catharina A. van Heusden, Eduardo R. Lazarowski, Johnny L. Carson, and Ilona Jaspers. 2019. 'Cinnamaldehyde in Flavored E-Cigarette Liquids Temporarily Suppresses Bronchial Epithelial Cell Ciliary Motility by Dysregulation of Mitochondrial Function'. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 316(3):L470–86. doi: 10.1152/ajplung.00304.2018.
- Cosio, M. G., and A. Guerassimov. 1999. 'Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Inflammation of Small Airways and Lung Parenchyma'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160(5 Pt 2):S21-25. doi: 10.1164/ajrccm.160.supplement_1.7.
- Cui, Wenhui, Zhihui Zhang, Panpan Zhang, Jiao Qu, Cheng Zheng, Xiaoting Mo, Wencheng Zhou, Liang Xu, Hongwei Yao, and Jian Gao. 2018. 'Nrf2 Attenuates Inflammatory Response in COPD/Emphysema: Crosstalk with Wnt3a/B-catenin and AMPK Pathways'. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22(7):3514–25. doi: 10.1111/jcmm.13628.
- Culpitt, Sarah V., Duncan F. Rogers, Pallav Shah, Carmen De Matos, Richard E. K. Russell, Louise E. Donnelly, and Peter J. Barnes. 2003. 'Impaired Inhibition by Dexamethasone of Cytokine Release by Alveolar Macrophages from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167(1):24–31. doi: 10.1164/rccm.200204-298OC.
- Czogala, Jan, Maciej L. Goniewicz, Bartłomiej Fidelus, Wioleta Zielinska-Danch, Mark J. Travers, and Andrzej Sobczak. 2014. 'Secondhand Exposure to Vapors From Electronic

- Cigarettes'. *Nicotine & Tobacco Research* 16(6):655–62. doi: 10.1093/ntr/ntt203.
- Dahl, Ronald, Ingrid Titlestad, Ari Lindqvist, Pascal Wielders, Heather Wray, Millie Wang, Viktoria Samuelsson, John Mo, and Alison Holt. 2012. 'Effects of an Oral MMP-9 and -12 Inhibitor, AZD1236, on Biomarkers in Moderate/Severe COPD: A Randomised Controlled Trial'. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 25(2):169–77. doi: 10.1016/j.pupt.2011.12.011.
- Dautzenberg, Bertrand, Mitchell Nides, Jean-Luc Kienzler, and Anne Callens. 2007. 'Pharmacokinetics, Safety and Efficacy from Randomized Controlled Trials of 1 and 2 Mg Nicotine Bitartrate Lozenges (Nicotinell®)'. *BMC Clinical Pharmacology* 7(1):11. doi: 10.1186/1472-6904-7-11.
- Davis, B., M. Dang, J. Kim, and P. Talbot. 2015. 'Nicotine Concentrations in Electronic Cigarette Refill and Do-It-Yourself Fluids'. *Nicotine & Tobacco Research* 17(2):134–41. doi: 10.1093/ntr/ntu080.
- Dawkins, Lynne, and Olivia Corcoran. 2014. 'Acute Electronic Cigarette Use: Nicotine Delivery and Subjective Effects in Regular Users'. *Psychopharmacology* 231(2):401–7. doi: 10.1007/s00213-013-3249-8.
- DeVito, Elise E., and Suchitra Krishnan-Sarin. 2018. 'E-Cigarettes: Impact of E-Liquid Components and Device Characteristics on Nicotine Exposure'. *Current Neuropharmacology* 16(4):438–59. doi: 10.2174/1570159X15666171016164430.
- D'hulst, A. I., K. Y. Vermaelen, G. G. Brusselle, G. F. Joos, and R. A. Pauwels. 2005. 'Time Course of Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation in Mice'. *The European Respiratory Journal* 26(2):204–13. doi: 10.1183/09031936.05.00095204.
- Di Stefano, A., A. Capelli, M. Lusuardi, P. Balbo, C. Vecchio, P. Maestrelli, C. E. Mapp, L. M. Fabbri, C. F. Donner, and M. Saetta. 1998. 'Severity of Airflow Limitation Is Associated with Severity of Airway Inflammation in Smokers'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158(4):1277–85. doi: 10.1164/ajrcm.158.4.9802078.
- Di Stefano, A., G. Caramori, T. Oates, A. Capelli, M. Lusuardi, I. Gnemmi, F. Ioli, K. F. Chung, C. F. Donner, P. J. Barnes, and I. M. Adcock. 2002. 'Increased Expression of Nuclear Factor-KappaB in Bronchial Biopsies from Smokers and Patients with COPD'. *The European Respiratory Journal* 20(3):556–63. doi: 10.1183/09031936.02.00272002.
- Digard, Helena, Christopher Proctor, Anuradha Kulasekaran, Ulf Malmqvist, and Audrey Richter. 2013. 'Determination of Nicotine Absorption from Multiple Tobacco Products and Nicotine Gum'. *Nicotine & Tobacco Research* 15(1):255–61. doi: 10.1093/ntr/nts123.
- Dusautoir, Romain, Gianni Zarcone, Marie Verrielle, Guillaume Garçon, Isabelle Fronval,

- Nicolas Beauval, Delphine Allorge, Véronique Riffault, Nadine Locoge, Jean-Marc Lo-Guidice, and Sébastien Anthérieu. 2021. 'Comparison of the Chemical Composition of Aerosols from Heated Tobacco Products, Electronic Cigarettes and Tobacco Cigarettes and Their Toxic Impacts on the Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells'. *Journal of Hazardous Materials* 401:123417. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123417.
- Ekberg-Jansson, A., B. Andersson, B. Bake, M. Boijesen, I. Enander, A. Rosengren, B. E. Skoogh, U. Tylén, P. Venge, and C. G. Löfdahl. 2001. 'Neutrophil-Associated Activation Markers in Healthy Smokers Relates to a Fall in DL(CO) and to Emphysematous Changes on High Resolution CT'. *Respiratory Medicine* 95(5):363–73. doi: 10.1053/rmed.2001.1050.
- El Dib, Regina, Erica A. Suzumura, Elie A. Akl, Huda Gomaa, Arnav Agarwal, Yaping Chang, Manya Prasad, Vahid Ashoorion, Diane Heels-Ansdell, Wasim Maziak, and Gordon Guyatt. 2017. 'Electronic Nicotine Delivery Systems and/or Electronic Non-Nicotine Delivery Systems for Tobacco Smoking Cessation or Reduction: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *BMJ Open* 7(2):e012680. doi: 10.1136/bmjopen-2016-012680.
- EL-Hellani, Ahmad, Rola Salman, Rachel El-Hage, Soha Talih, Nathalie Malek, Rima Baalbaki, Nareg Karaoghlanian, Rima Nakkash, Alan Shihadeh, and Najat A. Saliba. 2016. 'Nicotine and Carbonyl Emissions From Popular Electronic Cigarette Products: Correlation to Liquid Composition and Design Characteristics'. *Nicotine & Tobacco Research* ntw280. doi: 10.1093/ntr/ntw280.
- Erythropel, Hanno C., Sairam V. Jabba, Tamara M. DeWinter, Melissa Mendizabal, Paul T. Anastas, Sven E. Jordt, and Julie B. Zimmerman. 2019. 'Formation of Flavorant-Propylene Glycol Adducts With Novel Toxicological Properties in Chemically Unstable E-Cigarette Liquids'. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* 21(9):1248–58. doi: 10.1093/ntr/nty192.
- Escobar, Yael-Natalie H., Grace Nipp, Tianqu Cui, Sarah S. Petters, Jason D. Surratt, and Ilona Jaspers. 2020. 'In Vitro Toxicity and Chemical Characterization of Aerosol Derived from Electronic Cigarette Humectants Using a Newly Developed Exposure System'. *Chemical Research in Toxicology* 33(7):1677–88. doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00490.
- Esteve, Juan M., Jean-Marie Launay, Odile Kellermann, and Luc Maroteaux. 2007. 'Functions of Serotonin in Hypoxic Pulmonary Vascular Remodeling'. *Cell Biochemistry and Biophysics* 47(1):33–44. doi: 10.1385/cbb:47:1:33.
- Estornut, Cristina, Inés Roger, Beatriz Ballester, Pilar Ribera, and Julio Cortijo. 2019. 'Activation of Nuclear Factor Erythroid 2-Related (Nrf2) System as a Novel Therapeutic Approach in COPD'. *European Respiratory Journal* 54(suppl 63). doi:

10.1183/13993003.congress-2019.PA4216.

European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. 2022. *Opinion on Electronic Cigarettes*. LU: Publications Office.

Evans, Sarah E., and Allison C. Hoffman. 2014. 'Electronic Cigarettes: Abuse Liability, Topography and Subjective Effects'. *Tobacco Control* 23(suppl 2):ii23–29. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2013-051489.

Fagerström, Karl, and Thomas Eissenberg. 2012. 'Dependence on Tobacco and Nicotine Products: A Case for Product-Specific Assessment'. *Nicotine & Tobacco Research* 14(11):1382–90. doi: 10.1093/ntr/nts007.

Fant, Reginald V., Jack E. Henningfield, Saul Shiffman, Kenneth R. Strahs, and Donald P. Reitberg. 2000. 'A Pharmacokinetic Crossover Study to Compare the Absorption Characteristics of Three Transdermal Nicotine Patches'. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 67(3):479–82. doi: 10.1016/S0091-3057(00)00399-3.

Farsalinos, Konstantinos E., Kurt A. Kistler, Gene Gillman, and Vassilis Voudris. 2015. 'Evaluation of Electronic Cigarette Liquids and Aerosol for the Presence of Selected Inhalation Toxins'. *Nicotine & Tobacco Research* 17(2):168–74. doi: 10.1093/ntr/ntu176.

Farsalinos, Konstantinos E., Alketa Spyrou, Christos Stefopoulos, Kalliroi Tsimopoulou, Panagiota Kourkouveli, Dimitris Tsiapras, Stamatis Kyrzopoulos, Konstantinos Poulas, and Vassilis Voudris. 2015. 'Nicotine Absorption from Electronic Cigarette Use: Comparison between Experienced Consumers (Vapers) and Naïve Users (Smokers)'. *Scientific Reports* 5(1):11269. doi: 10.1038/srep11269.

Farsalinos, Konstantinos E., Alketa Spyrou, Kalliroi Tsimopoulou, Christos Stefopoulos, Giorgio Romagna, and Vassilis Voudris. 2015. 'Nicotine Absorption from Electronic Cigarette Use: Comparison between First and New-Generation Devices'. *Scientific Reports* 4(1):4133. doi: 10.1038/srep04133.

Fearon, Ian M., Alison Eldridge, Nathan Gale, Christopher J. Shepperd, Mike McEwan, Oscar M. Camacho, Mitch Nides, Kevin McAdam, and Christopher J. Proctor. 2017. 'E-Cigarette Nicotine Delivery: Data and Learnings from Pharmacokinetic Studies'. *American Journal of Health Behavior* 41(1):16–32. doi: 10.5993/AJHB.41.1.2.

Flouris, Andreas D., Maria S. Chorti, Konstantina P. Poulianiti, Athanasios Z. Jamurtas, Konstantinos Kostikas, Manolis N. Tzatzarakis, A. Wallace Hayes, Aristidis M. Tsatsakis, and Yiannis Koutedakis. 2013. 'Acute Impact of Active and Passive Electronic Cigarette Smoking on Serum Cotinine and Lung Function'. *Inhalation Toxicology* 25(2):91–101. doi: 10.3109/08958378.2012.758197.

- Gadek, James E., Gerald A. Fells, and Ronald G. Crystal. 1979. 'Cigarette Smoking Induces Functional Antiprotease Deficiency in the Lower Respiratory Tract of Humans'. *Science* 206(4424):1315–16. doi: 10.1126/science.316188.
- Ganguly, Koustav, Axel Nordström, Tania A. Thimraj, Mizanur Rahman, Malin Ramström, Shanzina I. Sompá, Elizabeth Z. Lin, Fiona O'Brien, Jeremy Koelmel, Lena Ernstgård, Gunnar Johanson, Krystal J. Godri Pollitt, Lena Palmberg, and Swapna Upadhyay. 2020. 'Addressing the Challenges of E-Cigarette Safety Profiling by Assessment of Pulmonary Toxicological Response in Bronchial and Alveolar Mucosa Models'. *Scientific Reports* 10(1):20460. doi: 10.1038/s41598-020-77452-w.
- Garcia-Arcos, Itsaso, Patrick Geraghty, Nathalie Baumlin, Michael Campos, Abdoulaye Jules Dabo, Bakr Jundi, Neville Cummins, Edward Eden, Astrid Grosche, Matthias Salathe, and Robert Foronjy. 2016. 'Chronic Electronic Cigarette Exposure in Mice Induces Features of COPD in a Nicotine-Dependent Manner'. *Thorax* 71(12):1119–29. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-208039.
- Gaunt, I. F., F. M. B. Carpanini, P. Grasso, and A. B. G. Lansdown. 1972. 'Long-Term Toxicity of Propylene Glycol in Rats'. *Food and Cosmetics Toxicology* 10(2):151–62. doi: 10.1016/S0015-6264(72)80193-7.
- Gazdar, A. F., R. I. Linnoila, Y. Kurita, H. K. Oie, J. L. Mulshine, J. C. Clark, and J. A. Whitsett. 1990. 'Peripheral Airway Cell Differentiation in Human Lung Cancer Cell Lines'. *Cancer Research* 50(17):5481–87.
- Gillman, I. G., K. A. Kistler, E. W. Stewart, and A. R. Paolantonio. 2016. 'Effect of Variable Power Levels on the Yield of Total Aerosol Mass and Formation of Aldehydes in E-Cigarette Aerosols'. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 75:58–65. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.12.019.
- Go, Yoon Young, Ji Yoen Mun, Sung-Won Chae, Jiwon Chang, and Jae-Jun Song. 2020. 'Comparison between in Vitro Toxicities of Tobacco- and Menthol-Flavored Electronic Cigarette Liquids on Human Middle Ear Epithelial Cells'. *Scientific Reports* 10(1):2544. doi: 10.1038/s41598-020-59290-y.
- Goniewicz, Maciej Lukasz, Jakub Knysak, Michal Gawron, Leon Kosmider, Andrzej Sobczak, Jolanta Kurek, Adam Prokopowicz, Magdalena Jablonska-Czapla, Czeslawa Rosik-Dulewska, Christopher Havel, Peyton Jacob, and Neal Benowitz. 2014. 'Levels of Selected Carcinogens and Toxicants in Vapour from Electronic Cigarettes'. *Tobacco Control* 23(2):133–39. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2012-050859.
- Gorrod, J. W., and P. Jenner. 1975. 'Chapter 2 - The Metabolism of Tobacco Alkaloids'. Pp.

35–78 in *Essays in Toxicology*. Vol. 6, edited by W. J. Hayes. Elsevier.

Gourlay, Steven G., and Neal L. Benowitz. 1997. 'Arteriovenous Differences in Plasma Concentration of Nicotine and Catecholamines and Related Cardiovascular Effects after Smoking, Nicotine Nasal Spray, and Intravenous Nicotine*'. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 62(4):453–63. doi: 10.1016/S0009-9236(97)90124-7.

Gravelly, Shannon, K. Michael Cummings, David Hammond, Eric Lindblom, Danielle M. Smith, Nadia Martin, Ruth Loewen, Ron Borland, Andrew Hyland, Mary E. Thompson, Christian Boudreau, Karin Kasza, Janine Ouimet, Anne C. K. Quah, Richard J. O'Connor, and Geoffrey T. Fong. 2020. 'The Association of E-Cigarette Flavors With Satisfaction, Enjoyment, and Trying to Quit or Stay Abstinent From Smoking Among Regular Adult Vapers From Canada and the United States: Findings From the 2018 ITC Four Country Smoking and Vaping Survey'. *Nicotine & Tobacco Research* 22(10):1831–41. doi: 10.1093/ntr/ntaa095.

Gupta, Sk, NI Benowitz, P. Jacob rd, Cn Rolf, and J. Gorsline. 1993. 'Bioavailability and Absorption Kinetics of Nicotine Following Application of a Transdermal System.' *British Journal of Clinical Pharmacology* 36(3):221–27. doi: 10.1111/j.1365-2125.1993.tb04221.x.

Gupta, Suneel K., Richard A. Okerholm, Pat Coen, Richard D. Prather, and Jane Gorsline. 1993. 'Single- and Multiple-Dose Pharmacokinetics of Nicoderm® (Nicotine Transdermal System)'. *The Journal of Clinical Pharmacology* 33(2):169–74. doi: <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1993.tb03939.x>.

Hackshaw, Allan, Joan K. Morris, Sadie Boniface, Jin-Ling Tang, and Dušan Milenković. 2018. 'Low Cigarette Consumption and Risk of Coronary Heart Disease and Stroke: Meta-Analysis of 141 Cohort Studies in 55 Study Reports'. *BMJ* 360:j5855. doi: 10.1136/bmj.j5855.

Hajek, Peter, Maciej L. Goniewicz, Anna Phillips, Katie Myers Smith, Oliver West, and Hayden McRobbie. 2015. 'Nicotine Intake From Electronic Cigarettes on Initial Use and After 4 Weeks of Regular Use'. *Nicotine & Tobacco Research* 17(2):175–79. doi: 10.1093/ntr/ntu153.

Hajek, Peter, Anna Phillips-Waller, Dunja Przulj, Francesca Pesola, Katie Myers Smith, Natalie Bisal, Jinshuo Li, Steve Parrott, Peter Sasieni, Lynne Dawkins, Louise Ross, Maciej Goniewicz, Qi Wu, and Hayden J. McRobbie. 2019. 'A Randomized Trial of E-Cigarettes versus Nicotine-Replacement Therapy'. *New England Journal of Medicine* 380(7):629–37. doi: 10.1056/NEJMoa1808779.

Hajek, Peter, Kate Pittaccio, Francesca Pesola, Katie Myers Smith, Anna Phillips-Waller, and Dunja Przulj. 2020. 'Nicotine Delivery and Users' Reactions to Juul Compared with Cigarettes and Other E-cigarette Products'. *Addiction* add.14936. doi: 10.1111/add.14936.

- Hajek, Peter, Dunja Przulj, Anna Phillips, Rebecca Anderson, and Hayden McRobbie. 2017. 'Nicotine Delivery to Users from Cigarettes and from Different Types of E-Cigarettes'. *Psychopharmacology* 234(5):773–79. doi: 10.1007/s00213-016-4512-6.
- Han, Shulei, Huan Chen, Xiaotao Zhang, Tong Liu, and Ya'ning Fu. 2016. 'Levels of Selected Groups of Compounds in Refill Solutions for Electronic Cigarettes'. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* 18(5):708–14. doi: 10.1093/ntr/ntv189.
- Hans, M., M. Wilhelm, and D. Swandulla. 2012. 'Menthol Suppresses Nicotinic Acetylcholine Receptor Functioning in Sensory Neurons via Allosteric Modulation'. *Chemical Senses* 37(5):463–69. doi: 10.1093/chemse/bjr128.
- Hansson, Anna, Thomas Rasmussen, and Holger Kraiczi. 2017. 'Single-Dose and Multiple-Dose Pharmacokinetics of Nicotine 6 Mg Gum'. *Nicotine & Tobacco Research* 19(4):477–83. doi: 10.1093/ntr/ntw211.
- Hart, C. M., and E. R. Block. 1989. 'Lung Serotonin Metabolism'. *Clinics in Chest Medicine* 10(1):59–70.
- Hartmann-Boyce, Jamie, Nicola Lindson, Ailsa R. Butler, Hayden McRobbie, Chris Bullen, Rachna Begh, Annika Theodoulou, Caitlin Notley, Nancy A. Rigotti, Tari Turner, Thomas R. Fanshawe, and Peter Hajek. 2022. 'Electronic Cigarettes for Smoking Cessation'. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 11(11):CD010216. doi: 10.1002/14651858.CD010216.pub7.
- Hartmann-Boyce, Jamie, Hayden McRobbie, Nicola Lindson, Chris Bullen, Rachna Begh, Annika Theodoulou, Caitlin Notley, Nancy A. Rigotti, Tari Turner, Ailsa R. Butler, Thomas R. Fanshawe, and Peter Hajek. 2020. 'Electronic Cigarettes for Smoking Cessation'. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (10). doi: 10.1002/14651858.CD010216.pub4.
- Harvanko, Arit, Richard Kryscio, Catherine Martin, and Thomas Kelly. 2019. 'Stimulus Effects of Propylene Glycol and Vegetable Glycerin in Electronic Cigarette Liquids'. *Drug and Alcohol Dependence* 194:326–29. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2018.08.039.
- HCSP. 2021. *Avis relatif aux bénéfices-risques de la cigarette électronique*. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique. Disponible sur le site : <https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/AvisRapportsDomaine?clefr=1138>.
- He, Lin-Xi, Zhao-Hui Tang, Qing-Song Huang, and Wei-Hong Li. 2020. 'DNA Methylation: A Potential Biomarker of Chronic Obstructive Pulmonary Disease'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:585. doi: 10.3389/fcell.2020.00585.
- Hecht, Stephen S. 2006. 'Cigarette Smoking: Cancer Risks, Carcinogens, and Mechanisms'.

Langenbeck's Archives of Surgery 391(6):603–13. doi: 10.1007/s00423-006-0111-z.

Heck, J. Daniel, Charles L. Gaworski, Narayanan Rajendran, and Robert L. Morrissey. 2002. 'Toxicologic evaluation of humectants added to cigarette tobacco: 13-week smoke inhalation study of glycerin and propylene glycol in Fisher 344 rats'. *Inhalation Toxicology* 14(11):1135–52. doi: 10.1080/08958370290084827.

Henningfield, J. 1993. 'Higher Levels of Nicotine in Arterial than in Venous Blood after Cigarette Smoking'. *Drug and Alcohol Dependence* 33(1):23–29. doi: 10.1016/0376-8716(93)90030-T.

Hermanns, Maria Iris, Ronald E. Unger, Kai Kehe, Kirsten Peters, and Charles James Kirkpatrick. 2004. 'Lung Epithelial Cell Lines in Coculture with Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells: Development of an Alveolo-Capillary Barrier in Vitro'. *Laboratory Investigation* 84(6):736–52. doi: 10.1038/labinvest.3700081.

Hibberd, A. R., and J. W. Gorrod. 1983. 'Enzymology of the Metabolic Pathway from Nicotine to Cotinine, in Vitro'. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 8(2):151–62. doi: 10.1007/BF03188741.

Hilaire, Gérard, Nicolas Voituren, Clément Menuet, Ronaldo M. Ichiyama, Hari H. Subramanian, and Mathias Dutschmann. 2010. 'The Role of Serotonin in Respiratory Function and Dysfunction'. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 174(1–2):76–88. doi: 10.1016/j.resp.2010.08.017.

Hiler, Marzena, Alison Breland, Tory Spindle, Sarah Maloney, Thokozeni Lipato, Nareg Karaoghlanian, Alan Shihadeh, Alexa Lopez, Carolina Ramôa, and Thomas Eissenberg. 2017. 'Electronic Cigarette User Plasma Nicotine Concentration, Puff Topography, Heart Rate, and Subjective Effects: Influence of Liquid Nicotine Concentration and User Experience.' *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 25(5):380–92. doi: 10.1037/pha0000140.

Hill, A. T., D. L. Bayley, E. J. Campbell, S. L. Hill, and R. A. Stockley. 2000. 'Airways Inflammation in Chronic Bronchitis: The Effects of Smoking and Alpha1-Antitrypsin Deficiency'. *The European Respiratory Journal* 15(5):886–90. doi: 10.1034/j.1399-3003.2000.15e12.x.

Hirani, N., F. Antonicelli, R. M. Strieter, M. S. Wiesener, P. J. Ratcliffe, C. Haslett, and S. C. Donnelly. 2001. 'The Regulation of Interleukin-8 by Hypoxia in Human Macrophages--a Potential Role in the Pathogenesis of the Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS).' *Molecular Medicine* 7(10):685–97.

Hodge-Bell, Kimberly C., K. Monica Lee, Roger A. Renne, Kathy M. Gideon, Sam J. Harbo, and Willie J. McKinney. 2007. 'Pulmonary Inflammation in Mice Exposed to Mainstream

Cigarette Smoke'. *Inhalation Toxicology* 19(4):361–76. doi: 10.1080/08958370601144076.

Hoffman, Allison C., and Dee Simmons. 2011. 'Menthol Cigarette Smoking and Nicotine Dependence'. *Tobacco Induced Diseases* 9(Suppl 1):S5. doi: 10.1186/1617-9625-9-S1-S5.

Hua, My, Esther E. Omaiye, Wentai Luo, Kevin J. McWhirter, James F. Pankow, and Prue Talbot. 2019. 'Identification of Cytotoxic Flavor Chemicals in Top-Selling Electronic Cigarette Refill Fluids'. *Scientific Reports* 9(1):2782. doi: 10.1038/s41598-019-38978-w.

Hughes, John R., and Dorothy Hatsukami. 1986. 'Signs and Symptoms of Tobacco Withdrawal'. *Archives of General Psychiatry* 43(3):289–94. doi: 10.1001/archpsyc.1986.01800030107013.

Hughes, John R., Josue Keely, and Shelly Naud. 2004. 'Shape of the Relapse Curve and Long-Term Abstinence among Untreated Smokers'. *Addiction (Abingdon, England)* 99(1):29–38. doi: 10.1111/j.1360-0443.2004.00540.x.

Hukkanen, Janne, Pleyton Jacob, and Neal L. Benowitz. 2005. 'Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine'. *Pharmacological Reviews* 57(1):79–115. doi: 10.1124/pr.57.1.3.

Immler, Roland, Scott I. Simon, and Markus Sperandio. 2018. 'Calcium Signalling and Related Ion Channels in Neutrophil Recruitment and Function'. *European Journal of Clinical Investigation* 48(S2):e12964. doi: 10.1111/eci.12964.

Isajevs, Sergejs, Immanuels Taivans, Darja Svirina, Gunta Strazda, and Uldis Kopeika. 2011. 'Patterns of Inflammatory Responses in Large and Small Airways in Smokers with and without Chronic Obstructive Pulmonary Disease'. *Respiration* 81(5):362–71. doi: 10.1159/000322560.

Jabba, Sairam V., Alexandra N. Diaz, Hanno C. Erythropel, Julie B. Zimmerman, and Sven-Eric Jordt. 2020. 'Chemical Adducts of Reactive Flavor Aldehydes Formed in E-Cigarette Liquids Are Cytotoxic and Inhibit Mitochondrial Function in Respiratory Epithelial Cells'. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* 22(Suppl 1):S25–34. doi: 10.1093/ntr/ntaa185.

Jacobson, Karin, Javier Martinez, Sylvain Larroque, Ian W. Jones, and Thilo Paschke. 2021. 'Nicotine Pharmacokinetics of Electronic Cigarettes: A Pooled Data Analysis from the Literature'. *Toxicology Reports* 8:84–95. doi: 10.1016/j.toxrep.2020.12.016.

Kalkhoran, Sara, and Stanton A. Glantz. 2016. 'E-Cigarettes and Smoking Cessation in Real-World and Clinical Settings: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *The Lancet. Respiratory Medicine* 4(2):116–28. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00521-4.

Kamal, Ritul, Anup Kumar Srivastava, and Chandrasekharan Nair Kesavachandran. 2015. 'Meta-Analysis Approach to Study the Prevalence of Chronic Obstructive Pulmonary Disease among Current, Former and Non-Smokers'. *Toxicology Reports* 2:1064–74. doi:

10.1016/j.toxrep.2015.07.013.

Kemp, Sarah J., Andrew J. Thorley, Julia Gorelik, Michael J. Seckl, Michael J. O'Hare, Alexandre Arcaro, Yuri Korchev, Peter Goldstraw, and Teresa D. Tetley. 2008. 'Immortalization of Human Alveolar Epithelial Cells to Investigate Nanoparticle Uptake'. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 39(5):591–97. doi: 10.1165/rcmb.2007-0334OC.

Kerber, Paul J., and David H. Peyton. 2022. 'Kinetics of Aldehyde Flavorant-Acetal Formation in E-Liquids with Different E-Cigarette Solvents and Common Additives Studied by 1H NMR Spectroscopy'. *Chemical Research in Toxicology* 35(8):1410–17. doi: 10.1021/acs.chemrestox.2c00159.

Khoudigian, S., T. Devji, L. Lytvyn, K. Campbell, R. Hopkins, and D. O'Reilly. 2016. 'The Efficacy and Short-Term Effects of Electronic Cigarettes as a Method for Smoking Cessation: A Systematic Review and a Meta-Analysis'. *International Journal of Public Health* 61(2):257–67. doi: 10.1007/s00038-016-0786-z.

Klein, Sebastian G., Tommaso Serchi, Lucien Hoffmann, Brunhilde Blömeke, and Arno C. Gutleb. 2013. 'An Improved 3D Tetraculture System Mimicking the Cellular Organisation at the Alveolar Barrier to Study the Potential Toxic Effects of Particles on the Lung'. *Particle and Fibre Toxicology* 10(1):31. doi: 10.1186/1743-8977-10-31.

Komura, Moegi, Tadashi Sato, Hitomi Yoshikawa, Naoko Arano Nitta, Yohei Suzuki, Kengo Koike, Yuza Kodama, Kuniaki Seyama, and Kazuhisa Takahashi. 2022. 'Propylene Glycol, a Component of Electronic Cigarette Liquid, Damages Epithelial Cells in Human Small Airways'. *Respiratory Research* 23(1):216. doi: 10.1186/s12931-022-02142-2.

Konrádová, V., V. Vávrová, and J. Janota. 1978. 'Effect of the Inhalation of a Surface Tension-Reducing Substance (Propylene Glycol) on the Ultrastructure of Epithelium of the Respiratory Passages in Rabbits'. *Folia Morphologica* 26(1):28–34.

Kopp, Pierre. n.d. 'Le coût social des drogues en France'. 75.

Kosmider, Leon, Andrzej Sobczak, Maciej Fik, Jakub Knysak, Marzena Zaciera, Jolanta Kurek, and Maciej Lukasz Goniewicz. 2014. 'Carbonyl Compounds in Electronic Cigarette Vapors: Effects of Nicotine Solvent and Battery Output Voltage'. *Nicotine & Tobacco Research* 16(10):1319–26. doi: 10.1093/ntr/ntu078.

Kostikas, Konstantinos, Georgios Papatheodorou, Konstantinos Psathakis, Panos Panagou, and Stelios Loukides. 2003. 'Oxidative Stress in Expired Breath Condensate of Patients with COPD'. *Chest* 124(4):1373–80. doi: 10.1378/chest.124.4.1373.

Kraiczi, Holger, Anna Hansson, and Roland Perfekt. 2011. 'Single-Dose Pharmacokinetics of

- Nicotine When Given With a Novel Mouth Spray for Nicotine Replacement Therapy'. *Nicotine & Tobacco Research* 13(12):1176–82. doi: 10.1093/ntr/ntr139.
- Kreslake, Jennifer M., Geoffrey Ferris Wayne, and Gregory N. Connolly. 2008. 'The Menthol Smoker: Tobacco Industry Research on Consumer Sensory Perception of Menthol Cigarettes and Its Role in Smoking Behavior'. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* 10(4):705–15. doi: 10.1080/14622200801979134.
- Kuga, Kazuki, Kazuhide Ito, Wenhao Chen, Ping Wang, and Kazukiyo Kumagai. 2020. 'A Numerical Investigation of the Potential Effects of E-cigarette Smoking on Local Tissue Dosimetry and the Deterioration of Indoor Air Quality'. *Indoor Air* 30(5):1018–38. doi: 10.1111/ina.12666.
- Kummer, Wolfgang, Silke Wiegand, Sibel Akinci, Ignatz Wessler, Alfred H. Schinkel, Jürgen Wess, Hermann Koepsell, Rainer V. Haberberger, and Katrin S. Lips. 2006. 'Role of Acetylcholine and Polyspecific Cation Transporters in Serotonin-Induced Bronchoconstriction in the Mouse'. *Respiratory Research* 7(1):65. doi: 10.1186/1465-9921-7-65.
- Kuna, Piotr, Martin Jenkins, Christopher D. O'Brien, and William A. Fahy. 2012. 'AZD9668, a Neutrophil Elastase Inhibitor, plus Ongoing Budesonide/Formoterol in Patients with COPD'. *Respiratory Medicine* 106(4):531–39. doi: 10.1016/j.rmed.2011.10.020.
- Laino, Teodoro, Christian Tuma, Philippe Moor, Elyette Martin, Steffen Stolz, and Alessandro Curioni. 2012. 'Mechanisms of Propylene Glycol and Triacetin Pyrolysis'. *The Journal of Physical Chemistry A* 116(18):4602–9. doi: 10.1021/jp300997d.
- Lamb, Thomas, Thivanka Muthumalage, and Irfan Rahman. 2020. 'Pod-Based Menthol and Tobacco Flavored e-Cigarettes Cause Mitochondrial Dysfunction in Lung Epithelial Cells'. *Toxicology Letters* 333:303–11. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.08.003.
- Larcombe, Alexander N., Maxine A. Janka, Benjamin J. Mullins, Luke J. Berry, Arne Bredin, and Peter J. Franklin. 2017. 'The Effects of Electronic Cigarette Aerosol Exposure on Inflammation and Lung Function in Mice'. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 313(1):L67–79. doi: 10.1152/ajplung.00203.2016.
- Larsson-Callerfelt, Anna-Karin, Sven-Erik Dahlén, Anna-Rebekka Köhl, Dennis Lex, Stefan Uhlig, and Christian Martin. 2013. 'Modulation of Antigen-Induced Responses by Serotonin and Prostaglandin E2 via EP1 and EP4 Receptors in the Peripheral Rat Lung'. *European Journal of Pharmacology* 699(1):141–49. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.039.
- Lau, Way K. W., Moira M. W. Chan-Yeung, Benjamin H. K. Yip, Amy H. K. Cheung, Mary S. M. Ip, Judith C. W. Mak, and the COPD Study Group of the Hong Kong Thoracic

- Society. 2012. 'The Role of Circulating Serotonin in the Development of Chronic Obstructive Pulmonary Disease' edited by O. Eickelberg. *PLoS ONE* 7(2):e31617. doi: 10.1371/journal.pone.0031617.
- Lau, Way Kwok-Wai, Xiang Li, Dave Sze-Chun Yeung, Ka-Ho Chan, Mary Sau-Man Ip, and Judith Choi-Wo Mak. 2012. 'The Involvement of Serotonin Metabolism in Cigarette Smoke-Induced Oxidative Stress in Rat Lung *in Vivo*'. *Free Radical Research* 46(11):1413–19. doi: 10.3109/10715762.2012.721928.
- Launay, J. M., P. Hervé, K. Peoc'h, C. Tournois, J. Callebert, C. G. Nebigil, N. Etienne, L. Drouet, M. Humbert, G. Simonneau, and L. Maroteaux. 2002. 'Function of the Serotonin 5-Hydroxytryptamine 2B Receptor in Pulmonary Hypertension'. *Nature Medicine* 8(10):1129–35. doi: 10.1038/nm764.
- Lea, Simon, Sophie Reynolds, Manminder Kaur, Karen Simpson, Simon Hall, Edith Hessel, and Dave Singh. 2018. 'The Effects of Repeated Toll-like Receptors 2 and 4 Stimulation in COPD Alveolar Macrophages'. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* Volume 13:771–80. doi: 10.2147/COPD.S97071.
- Leberl, Maïke, Adelheid Kratzer, and Laimute Taraseviciene-Stewart. 2013. 'Tobacco Smoke Induced COPD/Emphysema in the Animal Model-Are We All on the Same Page?' *Frontiers in Physiology* 4:91. doi: 10.3389/fphys.2013.00091.
- Lee, Hyeonhoon, Kyung-Hwa Jung, Soojin Park, Yun-Seo Kil, Eun Young Chung, Young Pyo Jang, Eun-Kyoung Seo, and Hyunsu Bae. 2014. 'Inhibitory Effects of *Stemona Tuberosa* on Lung Inflammation in a Subacute Cigarette Smoke-Induced Mouse Model'. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14(1):513. doi: 10.1186/1472-6882-14-513.
- Lee, Hyun-Wook, Sung-Hyun Park, Mao-wen Weng, Hsiang-Tsui Wang, William C. Huang, Herbert Lepor, Xue-Ru Wu, Lung-Chi Chen, and Moon-shong Tang. 2018. 'E-Cigarette Smoke Damages DNA and Reduces Repair Activity in Mouse Lung, Heart, and Bladder as Well as in Human Lung and Bladder Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(7):E1560–69. doi: 10.1073/pnas.1718185115.
- Lee, K. Monica, Julia Hoeng, Sam Harbo, Ulrike Kogel, William Gardner, Michael Oldham, Eric Benson, Marja Talikka, Athanasios Kondylis, Florian Martin, Bjoern Titz, Sam Ansari, Keyur Trivedi, Emmanuel Guedj, Ashraf Elamin, Nikolai V. Ivanov, Patrick Vanscheeuwijck, Manuel C. Peitsch, and Willie J. McKinney. 2018. 'Biological Changes in C57BL/6 Mice Following 3 Weeks of Inhalation Exposure to Cigarette Smoke or e-Vapor Aerosols'. *Inhalation Toxicology* 30(13–14):553–67. doi: 10.1080/08958378.2019.1576807.
- Lee, Y. O., and S. A. Glantz. 2011. 'Menthol: Putting the Pieces Together'. *Tobacco Control*

20(Supplement 2):iii1–7. doi: 10.1136/tc.2011.043604.

Lehmann, Andrea D., Nicole Daum, Michael Bur, Claus-Michael Lehr, Peter Gehr, and Barbara M. Rothen-Rutishauser. 2011. 'An in Vitro Triple Cell Co-Culture Model with Primary Cells Mimicking the Human Alveolar Epithelial Barrier'. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77(3):398–406. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.10.014.

Lerner, Chad A., Isaac K. Sundar, Hongwei Yao, Janice Gerloff, Deborah J. Ossip, Scott McIntosh, Risa Robinson, and Irfan Rahman. 2015. 'Vapors Produced by Electronic Cigarettes and E-Juices with Flavorings Induce Toxicity, Oxidative Stress, and Inflammatory Response in Lung Epithelial Cells and in Mouse Lung' edited by M. F. Khan. *PLOS ONE* 10(2):e0116732. doi: 10.1371/journal.pone.0116732.

Li, Xiang. 2016. 'In Vitro Toxicity Testing of Cigarette Smoke Based on the Air-Liquid Interface Exposure: A Review'. *Toxicology in Vitro* 36:105–13. doi: 10.1016/j.tiv.2016.07.019.

Lieber, M., B. Smith, A. Szakal, W. Nelson-Rees, and G. Todaro. 1976. 'A Continuous Tumor-Cell Line from a Human Lung Carcinoma with Properties of Type II Alveolar Epithelial Cells'. *International Journal of Cancer* 17(1):62–70. doi: 10.1002/ijc.2910170110.

Lim, Terri Y., Robert L. Poole, and Natalie M. Pageler. 2014. 'Propylene Glycol Toxicity in Children'. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics : JPPT* 19(4):277–82. doi: 10.5863/1551-6776-19.4.277.

Lin, E. C. C. 1977. 'Glycerol Utilization and Its Regulation in Mammals'. *Annual Review of Biochemistry* 46(1):765–95. doi: 10.1146/annurev.bi.46.070177.004001.

Linakis, Matthew W., Joseph E. Rower, Jessica K. Roberts, Eleanor I. Miller, Diana G. Wilkins, and Catherine M. T. Sherwin. 2017. 'Population Pharmacokinetic Model of Transdermal Nicotine Delivered from a Matrix-type Patch'. *British Journal of Clinical Pharmacology* 83(12):2709–17. doi: 10.1111/bcp.13393.

Lindson, Nicola, Samantha C. Chepkin, Weiyu Ye, Thomas R. Fanshawe, Chris Bullen, and Jamie Hartmann-Boyce. 2019. 'Different Doses, Durations and Modes of Delivery of Nicotine Replacement Therapy for Smoking Cessation'. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2019(4):CD013308. doi: 10.1002/14651858.CD013308.

Lisko, Joseph G., Hang Tran, Stephen B. Stanfill, Benjamin C. Blount, and Clifford H. Watson. 2015. 'Chemical Composition and Evaluation of Nicotine, Tobacco Alkaloids, PH, and Selected Flavors in E-Cigarette Cartridges and Refill Solutions'. *Nicotine & Tobacco Research* 17(10):1270–78. doi: 10.1093/ntr/ntu279.

Löfdahl, Anna, Christina Wenglén, Kristina Rydell-Törmänen, Gunilla Westergren-Thorsson, and Anna-Karin Larsson-Callerfelt. 2018. 'Effects of 5-Hydroxytryptamine Class 2 Receptor

- Antagonists on Bronchoconstriction and Pulmonary Remodeling Processes'. *The American Journal of Pathology* 188(5):1113–19. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.01.006.
- Lomask, Morton. 2006. 'Further Exploration of the Penh Parameter'. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie* 57 Suppl 2:13–20. doi: 10.1016/j.etp.2006.02.014.
- Lonergan, Mike, Alison J. Dicker, Megan L. Crichton, Holly R. Keir, Melissa K. Van Dyke, Hana Mullerova, Bruce E. Miller, Ruth Tal-Singer, and James D. Chalmers. 2020. 'Blood Neutrophil Counts Are Associated with Exacerbation Frequency and Mortality in COPD'. *Respiratory Research* 21(1):166. doi: 10.1186/s12931-020-01436-7.
- Lopez, Alexa A., Marzena M. Hiler, Eric K. Soule, Carolina P. Ramôa, Nareg V. Karaoghlanian, Thokozeni Lipato, Alison B. Breland, Alan L. Shihadeh, and Thomas Eissenberg. 2016. 'Effects of Electronic Cigarette Liquid Nicotine Concentration on Plasma Nicotine and Puff Topography in Tobacco Cigarette Smokers: A Preliminary Report'. *Nicotine & Tobacco Research* 18(5):720–23. doi: 10.1093/ntr/ntv182.
- Lowery, Curtis Lee, Donna Woulfe, and Fusun Kilic. 2019. 'Responses of Plasma Catecholamine, Serotonin, and the Platelet Serotonin Transporter to Cigarette Smoking'. *Frontiers in Neuroscience* 13.
- Lunell, E., L. Molander, K. Ekberg, and J. Wahren. 2000. 'Site of Nicotine Absorption from a Vapour Inhaler - Comparison with Cigarette Smoking'. *European Journal of Clinical Pharmacology* 55(10):737–41. doi: 10.1007/s002280050007.
- Lunell, Erik, and Margareta Curvall. 2011. 'Nicotine Delivery and Subjective Effects of Swedish Portion Snus Compared With 4 Mg Nicotine Polacrilex Chewing Gum'. *Nicotine & Tobacco Research* 13(7):573–78. doi: 10.1093/ntr/ntr044.
- MacDonald, I. 1970. 'Effects of Dietary Glycerol on the Serum Glyceride Level of Men and Women'. *British Journal of Nutrition* 24(2):537–43. doi: 10.1079/BJN19700051.
- Maessen, Gerdinique C., Anjali M. Wijnhoven, Rosalie L. Neijzen, Michelle C. Paulus, Dayna A. M. van Heel, Bart H. A. Bomers, Lucie E. Boersma, Burak Konya, and Marcel A. G. van der Heyden. 2020. 'Nicotine Intoxication by E-Cigarette Liquids: A Study of Case Reports and Pathophysiology'. *Clinical Toxicology* 58(1):1–8. doi: 10.1080/15563650.2019.1636994.
- Mann, Derek A., and Fiona Oakley. 2013. 'Serotonin Paracrine Signaling in Tissue Fibrosis'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1832(7):905–10. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.09.009.
- Manuppello, Joseph R., and Kristie M. Sullivan. 2015. 'Toxicity Assessment of Tobacco Products in Vitro'. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA* 43(1):39–67. doi:

10.1177/026119291504300108.

Marchand, Mathilde, Patrick Brossard, Henri Merdjan, Nicola Lama, Rolf Weitkunat, and Frank Lüdicke. 2017. 'Nicotine Population Pharmacokinetics in Healthy Adult Smokers: A Retrospective Analysis'. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 42(6):943–54. doi: 10.1007/s13318-017-0405-2.

Marco, Esther, and Joan O. Grimalt. 2015. 'A Rapid Method for the Chromatographic Analysis of Volatile Organic Compounds in Exhaled Breath of Tobacco Cigarette and Electronic Cigarette Smokers'. *Journal of Chromatography A* 1410:51–59. doi: 10.1016/j.chroma.2015.07.094.

Margham, Jennifer, Kevin McAdam, Mark Forster, Chuan Liu, Christopher Wright, Derek Mariner, and Christopher Proctor. 2016. 'Chemical Composition of Aerosol from an E-Cigarette: A Quantitative Comparison with Cigarette Smoke'. *Chemical Research in Toxicology* 29(10):1662–78. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00188.

Mayer, Bernd. 2014. 'How Much Nicotine Kills a Human? Tracing Back the Generally Accepted Lethal Dose to Dubious Self-Experiments in the Nineteenth Century'. *Archives of Toxicology* 88(1):5–7. doi: 10.1007/s00204-013-1127-0.

McKemy, David D., Werner M. Neuhausser, and David Julius. 2002. 'Identification of a Cold Receptor Reveals a General Role for TRP Channels in Thermosensation'. *Nature* 416(6876):52–58. doi: 10.1038/nature719.

McMartin, K. 2014. 'Propylene Glycol'. Pp. 1113–16 in *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, edited by P. Wexler. Oxford: Academic Press.

Mehta, Parmod K., Russell K. Karls, Elizabeth H. White, Edwin W. Ades, and Frederick D. Quinn. 2006. 'Entry and Intracellular Replication of Mycobacterium Tuberculosis in Cultured Human Microvascular Endothelial Cells'. *Microbial Pathogenesis* 41(2–3):119–24. doi: 10.1016/j.micpath.2006.05.002.

Mercado, Charles P., and Fusun Kilic. 2010. 'Molecular Mechanisms of SERT in Platelets: Regulation of Plasma Serotonin Levels'. *Molecular Interventions* 10(4):231–41. doi: 10.1124/mi.10.4.6.

Merecz-Sadowska, Anna, Przemyslaw Sitarek, Hanna Zielinska-Blizniewska, Katarzyna Malinowska, Karolina Zajdel, Lukasz Zakonnik, and Radoslaw Zajdel. 2020. 'A Summary of In Vitro and In Vivo Studies Evaluating the Impact of E-Cigarette Exposure on Living Organisms and the Environment'. *International Journal of Molecular Sciences* 21(2):652. doi: 10.3390/ijms21020652.

Minematsu, Naoto, Anna Blumental-Perry, and Steven D. Shapiro. 2011. 'Cigarette Smoke

Inhibits Engulfment of Apoptotic Cells by Macrophages through Inhibition of Actin Rearrangement'. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 44(4):474–82. doi: 10.1165/rcmb.2009-0463OC.

Miyashita, Lisa, Reetika Suri, Emma Dearing, Ian Mudway, Rosamund E. Dove, Daniel R. Neill, Richard Van Zyl-Smit, Aras Kadioglu, and Jonathan Grigg. 2018. 'E-Cigarette Vapour Enhances Pneumococcal Adherence to Airway Epithelial Cells'. *The European Respiratory Journal* 51(2):1701592. doi: 10.1183/13993003.01592-2017.

Molander, Lars, Erik Lunell, Sven-Börje Andersson, and Fredrik Kuylenstierna. 1996. 'Dose Released and Absolute Bioavailability of Nicotine from a Nicotine Vapor Inhaler'. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 59(4):394–400. doi: [https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(96\)90107-1](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(96)90107-1).

Morecroft, Ian, Lynn Loughlin, Margaret Nilsen, Janet Colston, Yvonne Dempsie, John Sheward, Anthony Harmar, and Margaret R. MacLean. 2005. 'Functional Interactions between 5-Hydroxytryptamine Receptors and the Serotonin Transporter in Pulmonary Arteries'. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 313(2):539–48. doi: 10.1124/jpet.104.081182.

Moyses, Chris, Alex Hearn, and Andrew Redfern. 2015. 'Evaluation of a Novel Nicotine Inhaler Device: Part 2—Effect on Craving and Smoking Urges'. *Nicotine & Tobacco Research* 17(1):26–33. doi: 10.1093/ntr/ntu122.

Mrakic-Spota, Simona, Maristella Gussoni, Michela Montorsi, Simone Porcelli, and Alessandra Vezzoli. 2012. 'Assessment of a Standardized ROS Production Profile in Humans by Electron Paramagnetic Resonance'. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012:1–10. doi: 10.1155/2012/973927.

Mulvanny, Alex, Caroline Pattwell, Augusta Beech, Thomas Southworth, and Dave Singh. 2022. 'Validation of Sputum Biomarker Immunoassays and Cytokine Expression Profiles in COPD'. *Biomedicines* 10(8):1949. doi: 10.3390/biomedicines10081949.

Murphy, P. J. 1973. 'Enzymatic Oxidation of Nicotine to Nicotine 1'(5') Iminium Ion. A Newly Discovered Intermediate in the Metabolism of Nicotine'. *The Journal of Biological Chemistry* 248(8):2796–2800.

Murray, Lynne A., Rebecca Dunmore, Ana Camelo, Carla A. Da Silva, Malin J. Gustavsson, David M. Habel, Tillie L. Hackett, Cory M. Hogaboam, Matthew A. Sleeman, and Darryl A. Knight. 2017. 'Acute Cigarette Smoke Exposure Activates Apoptotic and Inflammatory Programs but a Second Stimulus Is Required to Induce Epithelial to Mesenchymal Transition in COPD Epithelium'. *Respiratory Research* 18(1):82. doi: 10.1186/s12931-017-0565-2.

- Nakajima, Miki, and Tsuyoshi Yokoi. 2005. 'Interindividual Variability in Nicotine Metabolism: C-Oxidation and Glucuronidation'. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 20(4):227–35. doi: 10.2133/dmpk.20.227.
- Neilson, Louise, Courtney Mankus, David Thorne, George Jackson, Jason DeBay, and Clive Meredith. 2015. 'Development of an in Vitro Cytotoxicity Model for Aerosol Exposure Using 3D Reconstructed Human Airway Tissue; Application for Assessment of e-Cigarette Aerosol'. *Toxicology in Vitro* 29(7):1952–62. doi: 10.1016/j.tiv.2015.05.018.
- Norton, Kaila J., Kristie M. June, and Richard J. O'Connor. 2014. 'Initial Puffing Behaviors and Subjective Responses Differ between an Electronic Nicotine Delivery System and Traditional Cigarettes'. *Tobacco Induced Diseases* 12(1):17. doi: 10.1186/1617-9625-12-17.
- Oberndorfer, M., I. Grabovac, S. Haider, and T. E. Dorner. 2020. 'Effectiveness of E-Cigarettes in Smoking Cessation: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *European Journal of Public Health* 30(Supplement_5):ckaa166.1226. doi: 10.1093/eurpub/ckaa166.1226.
- Obot, Chrysanthus, K. Lee, Alfred Fuciarelli, Roger Renne, and Willie McKinney. 2004. 'Characterization of Mainstream Cigarette Smoke-Induced Biomarker Responses in ICR and C57Bl/6 Mice'. *Inhalation Toxicology* 16(10):701–19. doi: 10.1080/08958370490476604.
- Ochs, Matthias, Jens R. Nyengaard, Anja Jung, Lars Knudsen, Marion Voigt, Thorsten Wahlers, Joachim Richter, and Hans Jørgen G. Gundersen. 2004. 'The Number of Alveoli in the Human Lung'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 169(1):120–24. doi: 10.1164/rccm.200308-1107OC.
- O'Connell, Grant, John D. Pritchard, Chris Prue, Joseph Thompson, Thomas Verron, Donald Graff, and Tanvir Walele. 2019. 'A Randomised, Open-Label, Cross-over Clinical Study to Evaluate the Pharmacokinetic Profiles of Cigarettes and e-Cigarettes with Nicotine Salt Formulations in US Adult Smokers'. *Internal and Emergency Medicine* 14(6):853–61. doi: 10.1007/s11739-019-02025-3.
- Olmedo, Pablo, Walter Goessler, Stefan Tanda, -Perez Maria Grau, Stephanie Jarmul, Angela Aherrera, Rui Chen, Markus Hilpert, Joanna E. Cohen, -Acien Ana Navas, and Ana M. Rule. n.d. 'Metal Concentrations in E-Cigarette Liquid and Aerosol Samples: The Contribution of Metallic Coils'. *Environmental Health Perspectives* 126(2):027010. doi: 10.1289/EHP2175.
- Omaiye, Esther E., Kevin J. McWhirter, Wentai Luo, Peyton A. Tierney, James F. Pankow, and Prue Talbot. 2019. 'High Concentrations of Flavor Chemicals Are Present in Electronic Cigarette Refill Fluids'. *Scientific Reports* 9(1):2468. doi: 10.1038/s41598-019-39550-2.
- Onyenwoke, Rob U., TinChung Leung, Xiaoyan Huang, De'Jana Parker, Jeffrey G. Shipman, Shatha K. Alhadyan, and Vijay Sivaraman. 2022. 'An Assessment of Vaping-Induced

Inflammation and Toxicity: A Feasibility Study Using a 2-Stage Zebrafish and Mouse Platform'. *Food and Chemical Toxicology* 163:112923. doi: 10.1016/j.fct.2022.112923.

Ooi, Beng G., Dibyendu Dutta, Kavya Kazipeta, and Ngee S. Chong. 2019. 'Influence of the E-Cigarette Emission Profile by the Ratio of Glycerol to Propylene Glycol in E-Liquid Composition'. *ACS Omega* 4(8):13338–48. doi: 10.1021/acsomega.9b01504.

Osei, Albert D., Mohammadhassan Mirbolouk, Olusola A. Orimoloye, Omar Dzaye, S. M. Iftekhar Uddin, Emelia J. Benjamin, Michael E. Hall, Andrew P. DeFilippis, Andrew Stokes, Aruni Bhatnagar, Khurram Nasir, and Michael J. Blaha. 2019. 'Association Between E-Cigarette Use and Cardiovascular Disease Among Never and Current Combustible-Cigarette Smokers'. *The American Journal of Medicine* 132(8):949-954.e2. doi: 10.1016/j.amjmed.2019.02.016.

Oz, Murat, Eslam G. El Nebrisi, Keun-Hang S. Yang, Frank C. Howarth, and Lina T. Al Kury. 2017. 'Cellular and Molecular Targets of Menthol Actions'. *Frontiers in Pharmacology* 8.

Pasquereau, Anne, Rapha.l Andler, Romain Guignard, No.mie Soullier, Arnaud Gautier, Jean-Baptiste Richard and Vi.t Nguyen-Thanh. 2021. 'Consommation de tabac parmi les adultes en 2020 : résultats du baromètre de Santé Publique France'. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 8(1):132–39. http://beh.santepubliquefrance.fr/beh/2021/8/pdf/2021_8_1.pdf.

Peier, Andrea M., Aziz Moqrich, Anne C. Hergarden, Alison J. Reeve, David A. Andersson, Gina M. Story, Taryn J. Earley, Ilaria Dragoni, Peter McIntyre, Stuart Bevan, and Ardem Patapoutian. 2002. 'A TRP Channel That Senses Cold Stimuli and Menthol'. *Cell* 108(5):705–15. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00652-9.

Peña-Silva, Ricardo A., Jordan D. Miller, Yi Chu, and Donald D. Heistad. 2009. 'Serotonin Produces Monoamine Oxidase-Dependent Oxidative Stress in Human Heart Valves'. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 297(4):H1354-1360. doi: 10.1152/ajpheart.00570.2009.

Perfetti, A. Thomas. 1983. 'Structural study of nicotine salts'. *Beitrag zur Tabakforschung International* 12(2):43-54.

Perfetti, A. Thomas, W M. Coleman III, W. S. Smith. 1998. Determination of mainstream and sidestream cigarette smoke components for cigarette of different tobacco types and a set of reference cigarettes. *Beitrag zur Tabakforschung International* 18(3):95-113. doi: 10.2478/cttr-2013-0674.

Phillips, Blaine, Emilija Veljkovic, Michael J. Peck, Ansgar Buettner, Ashraf Elamin, Emmanuel Guedj, Gregory Vuillaume, Nikolai V. Ivanov, Florian Martin, Stéphanie Boué, Walter K. Schlage, Thomas Schneider, Bjoern Titz, Marja Talikka, Patrick Vanscheeuwijck,

- Julia Hoeng, and Manuel C. Peitsch. 2015. 'A 7-Month Cigarette Smoke Inhalation Study in C57BL/6 Mice Demonstrates Reduced Lung Inflammation and Emphysema Following Smoking Cessation or Aerosol Exposure from a Prototypic Modified Risk Tobacco Product'. *Food and Chemical Toxicology* 80:328–45. doi: 10.1016/j.fct.2015.03.009.
- Picavet, Patrick, Christelle Haziza, Nicola Lama, Rolf Weitkunat, and Frank Lüdiche. 2016. 'Comparison of the Pharmacokinetics of Nicotine Following Single and *Ad Libitum* Use of a Tobacco Heating System or Combustible Cigarettes'. *Nicotine & Tobacco Research* 18(5):557–63. doi: 10.1093/ntr/ntv220.
- Pilette, C., B. Colinet, R. Kiss, S. André, H. Kaltner, H. J. Gabius, M. Delos, J. P. Vaerman, M. Decramer, and Y. Sibille. 2007. 'Increased Galectin-3 Expression and Intra-Epithelial Neutrophils in Small Airways in Severe COPD'. *The European Respiratory Journal* 29(5):914–22. doi: 10.1183/09031936.00073005.
- Prather, Richard D., Tri G. Tu, Clyde N. Rolf, and Jane Gorsline. 1993. 'Nicotine Pharmacokinetics of Nicoderm® (Nicotine Transdermal System) in Women and Obese Men Compared With Normal-Sized Men'. *The Journal of Clinical Pharmacology* 33(7):644–49. doi: <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1993.tb04718.x>.
- Pratt, S. A., T. N. Finley, M. H. Smith, and A. J. Ladman. 1969. 'A Comparison of Alveolar Macrophages and Pulmonary Surfactant(?) Obtained from the Lungs of Human Smokers and Nonsmokers by Endobronchial Lavage'. *The Anatomical Record* 163(4):497–507. doi: 10.1002/ar.1091630402.
- Punturieri, A., S. Filippov, E. Allen, I. Caras, R. Murray, V. Reddy, and S. J. Weiss. 2000. 'Regulation of Elastolytic Cysteine Proteinase Activity in Normal and Cathepsin K-Deficient Human Macrophages'. *The Journal of Experimental Medicine* 192(6):789–99. doi: 10.1084/jem.192.6.789.
- Quigley, Joan M., Cathal Walsh, Caitriona Lee, Jean Long, Helen Kennelly, Anne McCarthy, and Paul Kavanagh. 2021. 'Efficacy and Safety of Electronic Cigarettes as a Smoking Cessation Intervention: A Systematic Review and Network Meta-Analysis'. *Tobacco Prevention & Cessation* 7:69. doi: 10.18332/tpc/143077.
- Rahman, Muhammad Aziz, Nicholas Hann, Andrew Wilson, George Mnatzaganian, and Linda Worrall-Carter. 2015. 'E-Cigarettes and Smoking Cessation: Evidence from a Systematic Review and Meta-Analysis'. *PloS One* 10(3):e0122544. doi: 10.1371/journal.pone.0122544.
- Rajendrasozhan, Saravanan, Jae-Woong Hwang, Hongwei Yao, Nandini Kishore, and Irfan Rahman. 2010. 'Anti-Inflammatory Effect of a Selective IkappaB Kinase-Beta Inhibitor in Rat Lung in Response to LPS and Cigarette Smoke'. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*

23(3):172–81. doi: 10.1016/j.pupt.2010.01.002.

Ramôa, Carolina P., Marzena M. Hiler, Tory R. Spindle, Alexa A. Lopez, Nareg Karaoghlanian, Thokozeni Lipato, Alison B. Breland, Alan Shihadeh, and Thomas Eissenberg. 2016. 'Electronic Cigarette Nicotine Delivery Can Exceed That of Combustible Cigarettes: A Preliminary Report'. *Tobacco Control* 25(e1):e6–9. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2015-052447.

Rastian, Brian, Chase Wilbur, and Daniel B. Curtis. 2022. 'Transfer of Metals to the Aerosol Generated by an Electronic Cigarette: Influence of Number of Puffs and Power'. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(15):9334. doi: 10.3390/ijerph19159334.

Renne, R. A., A. P. Wehner, B. J. Greenspan, H. S. Deford, H. A. Ragan, R. B. Westerberg, R. L. Buschbom, G. T. Burger, A. W. Hayes, R. L. Suber, and A. T. Mosberg. 1992. '2-Week and 13-Week Inhalation Studies of Aerosolized Glycerol in Rats'. *Inhalation Toxicology* 4(2):95–111. doi: 10.3109/08958379209145307.

Rickard, Brittany P., Henry Ho, Jacqueline B. Tiley, Ilona Jaspers, and Kim L. R. Brouwer. 2021. 'E-Cigarette Flavoring Chemicals Induce Cytotoxicity in HepG2 Cells'. *ACS Omega* 6(10):6708–13. doi: 10.1021/acsomega.0c05639.

Rodgman Alan and Perfetti Thomas A. 2009. 'The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke'. *CRC Press*, Boca Raton, FL, USA, pp 928, ISBN 978-01-4200-7883-1.

Rose, J. 1999. 'Arterial Nicotine Kinetics during Cigarette Smoking and Intravenous Nicotine Administration: Implications for Addiction'. *Drug and Alcohol Dependence* 56(2):99–107. doi: 10.1016/S0376-8716(99)00025-3.

Rose, Jed E., Alexey G. Mukhin, Stephen J. Lokitz, Timothy G. Turkington, Joseph Herskovic, Frederique M. Behm, Sudha Garg, and Pradeep K. Garg. 2010. 'Kinetics of Brain Nicotine Accumulation in Dependent and Nondependent Smokers Assessed with PET and Cigarettes Containing 11C-Nicotine'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(11):5190–95. doi: 10.1073/pnas.0909184107.

Rowell, Temperance R., James E. Keating, Bryan T. Zorn, Gary L. Glish, Stephen B. Shears, and Robert Tarran. 2020. 'Flavored E-Liquids Increase Cytoplasmic Ca²⁺ Levels in Airway Epithelia'. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 318(2):L226–41. doi: 10.1152/ajplung.00123.2019.

Sabo A. N. Etude pharmacocinétique de la nicotine après vapotage de deux liquides pour cigarette électronique : les premiers résultats de l'étude clinique VAPexp'AIR, thèse d'exercice en pharmacie, sous la direction de Dr. Kemmel Véronique, Nancy, Faculté de Pharmacie, 2021, 113 p.

- Saddleson, M. L., L. T. Kozlowski, G. A. Giovino, M. L. Goniewicz, M. C. Mahoney, G. G. Homish, and A. Arora. 2016. 'Enjoyment and Other Reasons for Electronic Cigarette Use: Results from College Students in New York'. *Addictive Behaviors* 54:33–39. doi: 10.1016/j.addbeh.2015.11.012.
- Salomon, Johanna J., Viktoria E. Muchitsch, Julia C. Gausterer, Elena Schwagerus, Hanno Huwer, Nicole Daum, Claus-Michael Lehr, and Carsten Ehrhardt. 2014. 'The Cell Line NCI-H441 Is a Useful *in Vitro* Model for Transport Studies of Human Distal Lung Epithelial Barrier'. *Molecular Pharmaceutics* 11(3):995–1006. doi: 10.1021/mp4006535.
- Scarlata, Simone, Panaiotis Finamore, Martina Meszaros, Silvano Dragonieri, and Andras Bikov. 2020. 'The Role of Electronic Noses in Phenotyping Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease'. *Biosensors* 10(11):171. doi: 10.3390/bios10110171.
- Schaal, Courtney M., Namrata Bora-Singhal, Durairaj Mohan Kumar, and Srikumar P. Chellappan. 2018. 'Regulation of Sox2 and Stemness by Nicotine and Electronic-Cigarettes in Non-Small Cell Lung Cancer'. *Molecular Cancer* 17(1):149. doi: 10.1186/s12943-018-0901-2.
- Schneider, Nina G., Erik Lunell, Richard E. Olmstead, and Karl-Olov Fagerström. 1996. 'Clinical Pharmacokinetics of Nasal Nicotine Delivery: A Review and Comparison to Other Nicotine Systems'. *Clinical Pharmacokinetics* 31(1):65–80. doi: 10.2165/00003088-199631010-00005.
- Schneider, Nina G., Richard E. Olmstead, Mikael A. Franzon, and Erik Lunell. 2001. 'The Nicotine Inhaler: Clinical Pharmacokinetics and Comparison with Other Nicotine Treatments'. *Clinical Pharmacokinetics* 40(9):661–84. doi: 10.2165/00003088-200140090-00003.
- Schneller, Liane M., Maansi Bansal-Travers, Maciej L. Goniewicz, Scott McIntosh, Deborah Ossip, and Richard J. O'Connor. 2018. 'Use of Flavored Electronic Cigarette Refill Liquids among Adults and Youth in the US—Results from Wave 2 of the Population Assessment of Tobacco and Health Study (2014–2015)' edited by H. Matsunami. *PLOS ONE* 13(8):e0202744. doi: 10.1371/journal.pone.0202744.
- Schripp, T., D. Markewitz, E. Uhde, and T. Salthammer. 2013. 'Does E-Cigarette Consumption Cause Passive Vaping? *Indoor Air* 23(1):25–31. doi: 10.1111/j.1600-0668.2012.00792.x.
- Selby, C., E. Drost, S. Lannan, P. K. Wraith, and W. MacNee. 1991. 'Neutrophil Retention in the Lungs of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease'. *The American Review of Respiratory Disease* 143(6):1359–64. doi: 10.1164/ajrccm/143.6.1359.
- Shajib, M. S., and W. I. Khan. 2015. 'The Role of Serotonin and Its Receptors in Activation of Immune Responses and Inflammation'. *Acta Physiologica* 213(3):561–74. doi:

10.1111/apha.12430.

Shapiro, D. L., L. L. Nardone, S. A. Rooney, E. K. Motoyama, and J. L. Munoz. 1978. 'Phospholipid Biosynthesis and Secretion by a Cell Line (A549) Which Resembles Type II Alveolar Epithelial Cells'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 530(2):197–207. doi: 10.1016/0005-2760(78)90005-x.

Shiffman, Saul, Edward J. Cone, August R. Buchhalter, Jack E. Henningfield, Jeffrey M. Rohay, Joe G. Gitchell, John M. Pinney, and Tommy Chau. 2009. 'Rapid Absorption of Nicotine from New Nicotine Gum Formulations'. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 91(3):380–84. doi: 10.1016/j.pbb.2008.08.012.

Silva, Bruna S. A., Fábio S. Lira, Dionei Ramos, Juliana S. Uzeloto, Fabrício Eduardo Rossi, Ana Paula C. F. Freire, Rebeca N. Silva, Iara B. Trevisan, Luis Alberto Gobbo, and Ercy M. C. Ramos. 2018. 'Severity of COPD and Its Relationship with IL-10'. *Cytokine* 106:95–100. doi: 10.1016/j.cyto.2017.10.018.

Sleiman, Mohamad, Jennifer M. Logue, V. Nahuel Montesinos, Marion L. Russell, Marta I. Litter, Lara A. Gundel, and Hugo Destaillats. 2016. 'Emissions from Electronic Cigarettes: Key Parameters Affecting the Release of Harmful Chemicals'. *Environmental Science & Technology* 50(17):9644–51. doi: 10.1021/acs.est.6b01741.

Solingapuram Sai, Kiran Kumar, Yantao Zuo, Jed E. Rose, Pradeep K. Garg, Sudha Garg, Rachid Nazih, Akiva Mintz, and Alexey G. Mukhin. 2020. 'Rapid Brain Nicotine Uptake from Electronic Cigarettes'. *Journal of Nuclear Medicine* 61(6):928–30. doi: 10.2967/jnumed.119.230748.

Son, Yeongkwon, Daniel P. Giovenco, Cristine Delnevo, Andrey Khlystov, Vera Samburova, and Qingyu Meng. 2020. 'Indoor Air Quality and Passive E-Cigarette Aerosol Exposures in Vape-Shops'. *Nicotine & Tobacco Research* 22(10):1772–79. doi: 10.1093/ntr/ntaa094.

Son, Yeongkwon, Clifford Weisel, Olivia Wackowski, Stephan Schwander, Cristine Delnevo, and Qingyu Meng. 2020. 'The Impact of Device Settings, Use Patterns, and Flavorings on Carbonyl Emissions from Electronic Cigarettes'. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(16):5650. doi: 10.3390/ijerph17165650.

Speth, P. A., T. B. Vree, N. F. Neilen, P. H. de Mulder, D. R. Newell, M. E. Gore, and B. E. de Pauw. 1987. 'Propylene Glycol Pharmacokinetics and Effects after Intravenous Infusion in Humans'. *Therapeutic Drug Monitoring* 9(3):255–58. doi: 10.1097/00007691-198709000-00001.

Stănescu, D., A. Sanna, C. Veriter, S. Kostianev, P. G. Calcagni, L. M. Fabbri, and P. Maestrelli. 1996. 'Airways Obstruction, Chronic Expectoration, and Rapid Decline of FEV1 in

Smokers Are Associated with Increased Levels of Sputum Neutrophils'. *Thorax* 51(3):267–71. doi: 10.1136/thx.51.3.267.

Stepanov, Irina, and Naomi Fujioka. 2015. 'Bringing Attention to E-Cigarette PH as an Important Element for Research and Regulation: Table 1'. *Tobacco Control* 24(4):413–14. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2014-051540.

St.Helen, Gideon, Delia A. Dempsey, Christopher M. Havel, Peyton Jacob, and Neal L. Benowitz. 2017. 'Impact of E-Liquid Flavors on Nicotine Intake and Pharmacology of e-Cigarettes'. *Drug and Alcohol Dependence* 178:391–98. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2017.05.042.

St.Helen, Gideon, Christopher Havel, Delia A. Dempsey, Peyton Jacob, and Neal L. Benowitz. 2016. 'Nicotine Delivery, Retention and Pharmacokinetics from Various Electronic Cigarettes: Nicotine Retention and PK from e-Cigarettes'. *Addiction* 111(3):535–44. doi: 10.1111/add.13183.

Suber, R. L., R. Deskin, I. Nikiforov, X. Fouillet, and C. R. E. Coggins. 1989. 'Subchronic Nose-Only Inhalation Study of Propylene Glycol in Sprague-Dawley Rats'. *Food and Chemical Toxicology* 27(9):573–83. doi: 10.1016/0278-6915(89)90016-1.

Sukhija, Manpreet, Reena Srivastava, and Aditya Kaushik. 2018. 'Pharmacokinetic Characterization of Three Novel 4-Mg Nicotine Lozenges'. *Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 56(03):113–19. doi: 10.5414/CP203097.

Sussan, Thomas E., Sachin Gajghate, Rajesh K. Thimmulappa, Jinfang Ma, Jung-Hyun Kim, Kuladeep Sudini, Nicola Consolini, Stephania A. Cormier, Slawo Lomnicki, Farhana Hasan, Andrew Pekosz, and Shyam Biswal. 2015. 'Exposure to Electronic Cigarettes Impairs Pulmonary Anti-Bacterial and Anti-Viral Defenses in a Mouse Model' edited by D. W. Metzger. *PLOS ONE* 10(2):e0116861. doi: 10.1371/journal.pone.0116861.

Sutherland, G., M. A. H. Russell, J. Stapleton, C. Feyerabend, and O. Ferno. 1992. 'Nasal Nicotine Spray: A Rapid Nicotine Delivery System'. *Psychopharmacology* 108(4):512–18. doi: 10.1007/BF02247430.

Tai, Akihiro, Takeshi Sawano, and Futoshi Yazama. 2011. 'Antioxidant Properties of Ethyl Vanillin in Vitro and in Vivo'. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75(12):2346–50. doi: 10.1271/bbb.110524.

Tai, Akihiro, Takeshi Sawano, Futoshi Yazama, and Hideyuki Ito. 2011. 'Evaluation of Antioxidant Activity of Vanillin by Using Multiple Antioxidant Assays'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1810(2):170–77. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.11.004.

- Takano, Mikiyoshi, Hidetaka Kamei, Machi Nagahiro, Masashi Kawami, and Ryoko Yumoto. 2017. 'Nicotine Transport in Lung and Non-Lung Epithelial Cells'. *Life Sciences* 188:76–82. doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.030.
- Talih, Soha, Zainab Balhas, Thomas Eissenberg, Rola Salman, Nareg Karaoghlanian, Ahmad El Hellani, Rima Baalbaki, Najat Saliba, and Alan Shihadeh. 2015. 'Effects of User Puff Topography, Device Voltage, and Liquid Nicotine Concentration on Electronic Cigarette Nicotine Yield: Measurements and Model Predictions'. *Nicotine & Tobacco Research* 17(2):150–57. doi: 10.1093/ntr/ntu174.
- Talih, Soha, Rola Salman, Nareg Karaoghlanian, Ahmad El-Hellani, Najat Saliba, Thomas Eissenberg, and Alan Shihadeh. 2017. "'Juice Monsters": Sub-Ohm Vaping and Toxic Volatile Aldehyde Emissions'. *Chemical Research in Toxicology* 30(10):1791–93. doi: 10.1021/acs.chemrestox.7b00212.
- Tanabe, Tsuyoshi, Tadasuke Shimokawaji, Soichiro Kanoh, and Bruce K. Rubin. 2015. 'Secretory Phospholipases A2 Are Secreted from Ciliated Cells and Increase Mucin and Eicosanoid Secretion from Goblet Cells'. *Chest* 147(6):1599–1609. doi: 10.1378/chest.14-0258.
- Teitelbaum, A. M., S. E. Murphy, G. Akk, T. B. Baker, A. Germann, L. B. von Weymarn, L. J. Bierut, A. Goate, E. D. Kharasch, and A. J. Bloom. 2018. 'Nicotine Dependence Is Associated with Functional Variation in FMO3, an Enzyme That Metabolizes Nicotine in the Brain'. *The Pharmacogenomics Journal* 18(1):136–43. doi: 10.1038/tpj.2016.92.
- Thomas, Kyla H., Michael N. Dalili, José A. López-López, Edna Keeney, David M. Phillippo, Marcus R. Munafò, Matt Stevenson, Deborah M. Caldwell, and Nicky J. Welton. 2022. 'Comparative Clinical Effectiveness and Safety of Tobacco Cessation Pharmacotherapies and Electronic Cigarettes: A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials'. *Addiction* 117(4):861–76. doi: 10.1111/add.15675.
- Tomar, S. L., and J. E. Henningfield. 1997. 'Review of the Evidence That PH Is a Determinant of Nicotine Dosage from Oral Use of Smokeless Tobacco'. *Tobacco Control* 6(3):219–25. doi: 10.1136/tc.6.3.219.
- Traves, S. L. 2002. 'Increased Levels of the Chemokines GROalpha and MCP-1 in Sputum Samples from Patients with COPD'. *Thorax* 57(7):590–95. doi: 10.1136/thorax.57.7.590.
- Traves, Suzanne L., Susan J. Smith, Peter J. Barnes, and Louise E. Donnelly. 2004. 'Specific CXC but Not CC Chemokines Cause Elevated Monocyte Migration in COPD: A Role for CXCR2'. *Journal of Leukocyte Biology* 76(2):441–50. doi: 10.1189/jlb.1003495.
- Turina, A. del V., M. V. Nolan, J. A. Zygadlo, and M. A. Perillo. 2006. 'Natural Terpenes: Self-

Assembly and Membrane Partitioning'. *Biophysical Chemistry* 122(2):101–13. doi: 10.1016/j.bpc.2006.02.007.

Turner, Jonathan, Jan Roger, Juliette Fitau, Delphine Combe, June Giddings, Gino Van Heeke, and Carol E. Jones. 2011. 'Goblet Cells Are Derived from a FOXJ1-Expressing Progenitor in a Human Airway Epithelium'. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 44(3):276–84. doi: 10.1165/rcmb.2009-0304OC.

Tyce, G. M. 1990. 'Origin and Metabolism of Serotonin'. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 16 Suppl 3:S1-7.

Uchiyama, Shigehisa, Mayumi Noguchi, Ayana Sato, Miho Ishitsuka, Yohei Inaba, and Naoki Kunugita. 2020. 'Determination of Thermal Decomposition Products Generated from E-Cigarettes'. *Chemical Research in Toxicology* 33(2):576–83. doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00410.

Uhal, B. D. 1997. 'Cell Cycle Kinetics in the Alveolar Epithelium'. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 272(6):L1031–45. doi: 10.1152/ajplung.1997.272.6.L1031.

Urakawa, N., T. Nagata, K. Kudo, K. Kimura, and T. Imamura. 1994. 'Simultaneous Determination of Nicotine and Cotinine in Various Human Tissues Using Capillary Gas Chromatography/Mass Spectrometry'. *International Journal of Legal Medicine* 106(5):232–36. doi: 10.1007/BF01225411.

Vähäkangas, K., and O. Pelkonen. 1993. 'Extrahepatic Metabolism of Nicotine and Related Compounds by Cytochromes P450'. Pp. 111–27 in *Nicotine and Related Alkaloids: Absorption, distribution, metabolism and excretion*, edited by J. W. Gorrod and J. Wahren. Dordrecht: Springer Netherlands.

Valença, Samuel Santos, Katia da Hora, Paulo Castro, Vera Gonçalves Moraes, Laís Carvalho, and Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto. 2004. 'Emphysema and Metalloelastase Expression in Mouse Lung Induced by Cigarette Smoke'. *Toxicologic Pathology* 32(3):351–56. doi: 10.1080/01926230490431466.

Vansickel, A. R., C. O. Cobb, M. F. Weaver, and T. E. Eissenberg. 2010. 'A Clinical Laboratory Model for Evaluating the Acute Effects of Electronic "Cigarettes": Nicotine Delivery Profile and Cardiovascular and Subjective Effects'. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 19(8):1945–53. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0288.

Vasanthi Bathrinathan, Pranav, James E. P. Brown, Lindsay J. Marshall, and Laura J. Leslie. 2018. 'An Investigation into E-Cigarette Cytotoxicity in-Vitro Using a Novel 3D Differentiated Co-Culture Model of Human Airways'. *Toxicology in Vitro* 52:255–64. doi:

10.1016/j.tiv.2018.06.020.

Voos, Natalie, Lisa Kaiser, Martin C. Mahoney, Clara M. Bradizza, Lynn T. Kozlowski, Neal L. Benowitz, Richard J. O'Connor, and Maciej L. Goniewicz. 2019. 'RANDOMIZED WITHIN-SUBJECT TRIAL TO EVALUATE SMOKERS' INITIAL PERCEPTIONS, SUBJECTIVE EFFECTS, AND NICOTINE DELIVERY ACROSS SIX VAPORIZED NICOTINE PRODUCTS'. *Addiction (Abingdon, England)* 114(7):1236–48. doi: 10.1111/add.14602.

Voos, Natalie, Danielle Smith, Lisa Kaiser, Martin C. Mahoney, Clara M. Bradizza, Lynn T. Kozlowski, Neal L. Benowitz, Richard J. O'Connor, and Maciej L. Goniewicz. 2020. 'Effect of E-Cigarette Flavors on Nicotine Delivery and Puffing Topography: Results from a Randomized Clinical Trial of Daily Smokers'. *Psychopharmacology* 237(2):491–502. doi: 10.1007/s00213-019-05386-x.

Vozoris, Nicholas T., Xuesong Wang, Peter C. Austin, Anne L. Stephenson, Denis E. O'Donnell, Andrea S. Gershon, Sudeep S. Gill, and Paula A. Rochon. 2018. 'Serotonergic Antidepressant Use and Morbidity and Mortality among Older Adults with COPD'. *European Respiratory Journal* 52(1):1800475. doi: 10.1183/13993003.00475-2018.

Wagener, Theodore L., Evan L. Floyd, Irina Stepanov, Leslie M. Driskill, Summer G. Frank, Ellen Meier, Eleanor L. Leavens, Alayna P. Tackett, Neil Molina, and Lurdes Queimado. 2017. 'Have Combustible Cigarettes Met Their Match? The Nicotine Delivery Profiles and Harmful Constituent Exposures of Second-Generation and Third-Generation Electronic Cigarette Users'. *Tobacco Control* 26(e1):e23–28. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2016-053041.

Walele, Tanvir, Girish Sharma, Rebecca Savioz, Claire Martin, and Josie Williams. 2016. 'A Randomised, Crossover Study on an Electronic Vapour Product, a Nicotine Inhalator and a Conventional Cigarette. Part A: Pharmacokinetics'. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 74:187–92. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.12.003.

Wang, Cuixue, Jiedong Zhou, Jinquan Wang, Shujing Li, Atsushi Fukunaga, Junji Yodoi, and Hai Tian. 2020. 'Progress in the Mechanism and Targeted Drug Therapy for COPD'. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5(1):248. doi: 10.1038/s41392-020-00345-x.

Wang, Lei, Jesse P. Joad, Caiyun Zhong, and Kent E. Pinkerton. 2008. 'Effects of Environmental Tobacco Smoke Exposure on Pulmonary Immune Response in Infant Monkeys'. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122(2):400–406, 406.e1-5. doi: 10.1016/j.jaci.2008.04.011.

Wang, Richard J., Sudhamayi Bhadriraju, and Stanton A. Glantz. 2021. 'E-Cigarette Use and Adult Cigarette Smoking Cessation: A Meta-Analysis'. *American Journal of Public Health*

111(2):230–46. doi: 10.2105/AJPH.2020.305999.

Weaver, Timothy E., Cheng-Lun Na, and Mildred Stahlman. 2002. ‘Biogenesis of Lamellar Bodies, Lysosome-Related Organelles Involved in Storage and Secretion of Pulmonary Surfactant’. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13(4):263–70. doi: 10.1016/s1084952102000551.

Wickham, R. J. 2015. ‘How Menthol Alters Tobacco-Smoking Behavior: A Biological Perspective’. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 88(3):279–87.

Woodall, M., J. Jacob, K. K. Kalsi, V. Schroeder, E. Davis, B. Kenyon, I. Khan, J. P. Garnett, R. Tarran, and D. L. Baines. 2020. ‘E-Cigarette Constituents Propylene Glycol and Vegetable Glycerin Decrease Glucose Uptake and Its Metabolism in Airway Epithelial Cells in Vitro’. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 319(6):L957–67. doi: 10.1152/ajplung.00123.2020.

Wright, J. L., and A. Churg. 1990. ‘Cigarette Smoke Causes Physiologic and Morphologic Changes of Emphysema in the Guinea Pig’. *The American Review of Respiratory Disease* 142(6 Pt 1):1422–28. doi: 10.1164/ajrccm/142.6_Pt_1.1422.

Wright, Joanne L., and Andrew Churg. 2008. ‘Animal Models of COPD: Barriers, Successes, and Challenges’. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 21(5):696–98. doi: 10.1016/j.pupt.2008.01.007.

Wu, Hera, Travis H. Denna, Jordan N. Storkersen, and Valerie A. Gerriets. 2019. ‘Beyond a Neurotransmitter: The Role of Serotonin in Inflammation and Immunity’. *Pharmacological Research* 140:100–114. doi: 10.1016/j.phrs.2018.06.015.

Xue, Lu-Lu, Hao-Hong Chen, and Jian-Guo Jiang. 2017. ‘Implications of Glycerol Metabolism for Lipid Production’. *Progress in Lipid Research* 68:12–25. doi: 10.1016/j.plipres.2017.07.002.

Yagi, Osamitsu, Kazutetsu Aoshiba, and Atsushi Nagai. 2006. ‘Activation of Nuclear Factor-KappaB in Airway Epithelial Cells in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease’. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases* 73(5):610–16. doi: 10.1159/000090050.

Yan, X. Sherwin, and Carl D’Ruiz. 2015. ‘Effects of Using Electronic Cigarettes on Nicotine Delivery and Cardiovascular Function in Comparison with Regular Cigarettes’. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71(1):24–34. doi: 10.1016/j.yrtph.2014.11.004.

Yao, Hongwei, and Irfan Rahman. 2011. ‘Current Concepts on Oxidative/Carbonyl Stress, Inflammation and Epigenetics in Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease’. *Toxicology and Applied Pharmacology* 254(2):72–85. doi: 10.1016/j.taap.2009.10.022.

Yingst, Jessica M., Jonathan Foulds, Susan Veldheer, Shari Hrabovsky, Neil Trushin, Thomas T. Eissenberg, Jill Williams, John P. Richie, Travis T. Nichols, Stephen J. Wilson, and Andrea L. Hobkirk. 2019. 'Nicotine Absorption during Electronic Cigarette Use among Regular Users' edited by M. Cummings. *PLOS ONE* 14(7):e0220300. doi: 10.1371/journal.pone.0220300.

Yingst, Jessica M., Susan Veldheer, Erin Hammett, Shari Hrabovsky, and Jonathan Foulds. 2017. 'A Method for Classifying User-Reported Electronic Cigarette Liquid Flavors'. *Nicotine & Tobacco Research* 19(11):1381–85. doi: 10.1093/ntr/ntw383.

Yu, Dale K., William F. Elmquist, and Ronald J. Sawchuk. 1985. 'Pharmacokinetics of Propylene Glycol in Humans During Multiple Dosing Regimens'. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74(8):876–79. doi: 10.1002/jps.2600740815.

Zhao, Di, Vesna Ilievski, Vesna Slavkovich, Pablo Olmedo, Arce Domingo-Relloso, Ana M. Rule, Norman J. Kleiman, Ana Navas-Acien, and Markus Hilpert. 2022. 'Effects of E-Liquid Flavor, Nicotine Content, and Puff Duration on Metal Emissions from Electronic Cigarettes'. *Environmental Research* 204:112270. doi: 10.1016/j.envres.2021.112270.

Zhu, Shu-Hong, Jessica Y. Sun, Erika Bonnevie, Sharon E. Cummins, Anthony Gamst, Lu Yin, and Madeleine Lee. 2014. 'Four Hundred and Sixty Brands of E-Cigarettes and Counting: Implications for Product Regulation'. *Tobacco Control* 23(suppl 3):iii3–9. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2014-051670.

Annexes

Annexe 1 – Résultats des méta-analyses sur l'efficacité des cigarettes électroniques dans le sevrage tabagique

Référence	Résultats
(Rahman et al. 2015)	L'étude a permis de montrer l'efficacité des e-cigarettes à la nicotine par rapport aux e-cigarettes sans nicotine pour le sevrage tabagique (RR = 2,29, IC95% = 1,05-4,97). L'étude n'a pas été en mesure de commenter l'efficacité des e-cigarettes par rapport à d'autres interventions pour le sevrage tabagique, étant donné le manque de groupes de comparaison dans les études incluses dans cette méta-analyse.
(Kalkhoran and Glantz 2016)	Les chances d'arrêter de fumer étaient inférieures de 28 % chez les utilisateurs de e-cigarettes par rapport à ceux qui n'en utilisaient pas (OR = 0,72, IC95% = 0,57-0,91). L'association entre l'utilisation de e-cigarette et l'arrêt du tabac n'était pas significativement différente entre les études portant sur tous les fumeurs utilisant la e-cigarette (indépendamment de leur intérêt pour l'arrêt du tabac) et les études portant uniquement sur les fumeurs intéressés par l'arrêt du tabac (OR = 0,63, IC95% = 0,45-0,86 vs 0,86, 0,60-1,23 ; p = 0,94).
(Khoudigian et al. 2016)	Les participants à l'étude étaient plus susceptibles d'arrêter de fumer lorsqu'ils utilisaient des e-cigarettes à la nicotine par rapport aux e-cigarettes sans nicotine ; toutefois, cette différence n'était pas statistiquement significative (RR = 2,02 ; IC95% = 0,97-4,22).
(El Dib et al. 2017)	Les résultats fournis par seulement deux essais cliniques randomisés suggèrent une augmentation possible de l'arrêt du tabac avec les e-cigarettes avec nicotine par rapport aux e-cigarettes sans nicotine à 6 mois (RR = 2,03, IC95% = 0,94-4,38, preuve de faible certitude). Les résultats des études de cohorte ont suggéré une réduction possible des taux de sevrage tabagique avec l'utilisation des e-cigarettes par rapport à leur absence d'utilisation (OR = 0,74, IC95% = 0,55-1,00, très faible certitude).
(Oberndorfer et al. 2020)	La proportion de fumeurs abstinents était 1,67 (IC95% = 0,99-2,81) fois plus élevée chez les utilisateurs de la e-cigarette avec de la nicotine que chez les non-utilisateurs. La proportion de fumeurs abstinents était 1,69 (IC95% = 1,25-2,27) fois plus élevée chez les utilisateurs de la e-cigarette que chez les participants recevant un traitement substitutif nicotinique. La proportion de fumeurs abstinents était 2,70 fois (IC95% = 1,15-6,30) plus élevée chez les utilisateurs de la e-cigarette que chez les participants ne recevant que des conseils.
(Chan et al. 2021)	Les résultats indiquent que les participants assignés à l'utilisation de e-cigarettes à la nicotine étaient plus susceptibles de rester abstinents au tabac que ceux du groupe utilisant des e-cigarettes sans nicotine (RR = 2,08, IC97,5% = 1,39-3,15) et ceux qui étaient assignés à l'utilisation d'un traitement substitutif nicotinique (RR = 1,49, IC97,5% = 1,04-2,14).
(Quigley et al. 2021)	En utilisant les substituts nicotiniques comme traitement de référence, les incidences de l'arrêt du tabac à 24-26 semaines étaient comparables entre les groupes cigarettes électroniques et substituts nicotiniques (RR = 1,17 ; IC95% = 0,66-1,86). Les résultats à 52 semaines n'étaient pas concluants.
(Wang, Bhadriraju, and Glantz 2021)	Dans les études observationnelles : En tant que produits de consommation, les e-cigarettes n'ont pas été associées à une augmentation de l'arrêt du tabac dans la population adulte. Dans les essais cliniques randomisés : L'utilisation de e-cigarettes en tant qu'intervention thérapeutique a été associée à une augmentation du pourcentage de réussite du sevrage tabagique.
(Hartmann-Boyce et al. 2022)	Il y a une certitude élevée que les taux de sevrage étaient plus élevés chez les personnes randomisées pour la e-cigarette avec nicotine que chez celles randomisées pour les substituts nicotiniques (RR = 1,63, IC95% = 1,30-2,04). Des preuves d'incertitude modérée, limitées par l'imprécision, ont montré que les taux de sevrage étaient plus élevés chez les personnes randomisées pour la e-cigarette avec nicotine que pour la e-cigarette sans nicotine (RR = 1,94, IC95% = 1,21-3,13).

	<p>Par rapport au soutien comportemental seul/aucun soutien, les taux de sevrage étaient plus élevés pour les participants randomisés pour la e-cigarette avec nicotine (RR = 2,66, IC95% = 1,52-4,65). Cependant, ce résultat est très peu certain, en raison de problèmes d'imprécision et de risque de biais.</p>
<p>(Thomas et al. 2022)</p>	<p>Des données probantes indiquent que la e-cigarette contenant de la nicotine à haute concentration (15 mg/cartouche) (OR = 3,22, IC95% = 1,63-6,36) était efficace par rapport au placebo, mais ces estimations sont extrêmement imprécises.</p> <p>Il semble que la e-cigarette contenant de la nicotine à faible concentration (10 mg/cartouche) soit plus efficace que le placebo (RR = 3,22, IC95% = 0,97-12,55) ; toutefois, cette estimation est extrêmement imprécise et les IC95% tiennent compte de la possibilité d'une absence d'effet.</p>

Annexe 2 – Liste des critères d’inclusion et de non-inclusion dans l’essai clinique VAPexp’AIR

- Critères d’inclusion
 - Homme ou femme âgé de 18 à 35 ans.
 - Sujet qui a déjà vapoté au moins 1 fois et qui maîtrise l’acte de vapotage. La concentration de la nicotine doit être ≥ 6 mg/mL.
 - Sujet vapoteur depuis plus de 1 mois (nicotine ≥ 6 mg/mL) et/ou fumeur de tabac (cigarette traditionnelles).
 - Sujet apte à comprendre les objectifs et les risques liés à la recherche et à donner un consentement éclairé, daté et signé.
 - Sujet affilié à un régime de protection sociale d’assurance maladie.
 - Sujet sans antécédents de pathologie chronique.
 - Sujet ne prenant pas de traitement médicamenteux au long cours (hors contraception, vitamines et minéraux)
 - Sujet ayant été informé des résultats de la visite médicale préalable.
- Critères de non-inclusion
 - Sujet souffrant d’une pathologie chronique (diabète, obésité IMC > 30 kg/m², cardiovasculaire).
 - Sujet souffrant d’une pathologie respiratoire chronique, notamment BPCO, mesurée selon les critères ATS/ERS, 2005 : VEMS/CV et/ou VEMS inférieur à 1.64 Z-scores (normes GLI 2012) (vérifié par spirométrie à la visite d’inclusion).
 - Sujet souffrant d’une pathologie respiratoire ou ORL aiguë en cours ou récente (dans les 15 jours précédant l’inclusion).
 - Sujet sous sevrage alcoolique (vérifié par questionnaire lors de la visite d’inclusion).
 - Sujet ayant une consommation abusive d’alcool (plus de 2 verres par jour pour une femme et plus de 3 verres par jours pour un homme) ou consommation quotidienne de drogues illicites (stupéfiants).
 - Sujet souffrant d’épilepsie.
 - Sujet ayant une hypersensibilité à l’un des composés du liquide de vaporisation (vérifié par questionnaire lors de la visite d’inclusion).
 - Sujet présentant une insuffisance hépatique.
 - Sujet présentant une insuffisance rénale modérée (DFG < 60 mL/min).
 - Sujet souffrant de claustrophobie.
 - Impossibilité de donner au sujet des informations éclairées (sujet en situation d’urgence, difficultés de compréhension du sujet, ...).
 - Sujet sous sauvegarde de justice.
 - Sujet sous tutelle ou sous curatelle.
 - Grossesse (pour une femme en âge de procréer, test de grossesse sanguin négatif à la visite de sélection et contraception efficace tout au long de l’étude).
 - Allaitement.

Annexe 3 – Fiche de rappel des tâches à réaliser pour le bon déroulement des visites de suivi

OBJECTIF : Ce document définit les modalités des visites V1 et V2 de l'essai clinique VAPexp'AIR. Il s'adresse aux différents intervenants impliqués dans le bon déroulement de l'essai. Il est à compléter à chaque nouvelle visite.

A – EN AMONT DE LA VISITE

<u>Informations patient :</u>			
N°Patient	_/_/	Initiales	_/_/-_/_/ Date de naissance
			__/__/____ (JJ/MM/AAAA)
Randomisation : <input type="checkbox"/> Visite 1 <input type="checkbox"/> e-liquide 1 <input type="checkbox"/> e-liquide 2 Date : __/__/____			

Vérifier le stock de e-liquide et d'atomiser :

- Si stock insuffisant pour les patients inclus prévenir Sébastien Roux pour envoi à la pharmacie (envoi par multiple de 10 avec BL, Attestation de libération de lot joint)
- Récupérer la livraison à la pharmacie après avoir prévenu Dr Anne Hutt (Ascenseur B -1)
- Apporter (ou faire livrer) les e-liquides utilisés par série de 10 pour qu'ils soient checker par la pharmacie et les rapporter au labo en attendant leur utilisation.

Préparer le dossier patient :....

- Pré remplir le cahier d'observation :
- Imprimer les questionnaires : ...

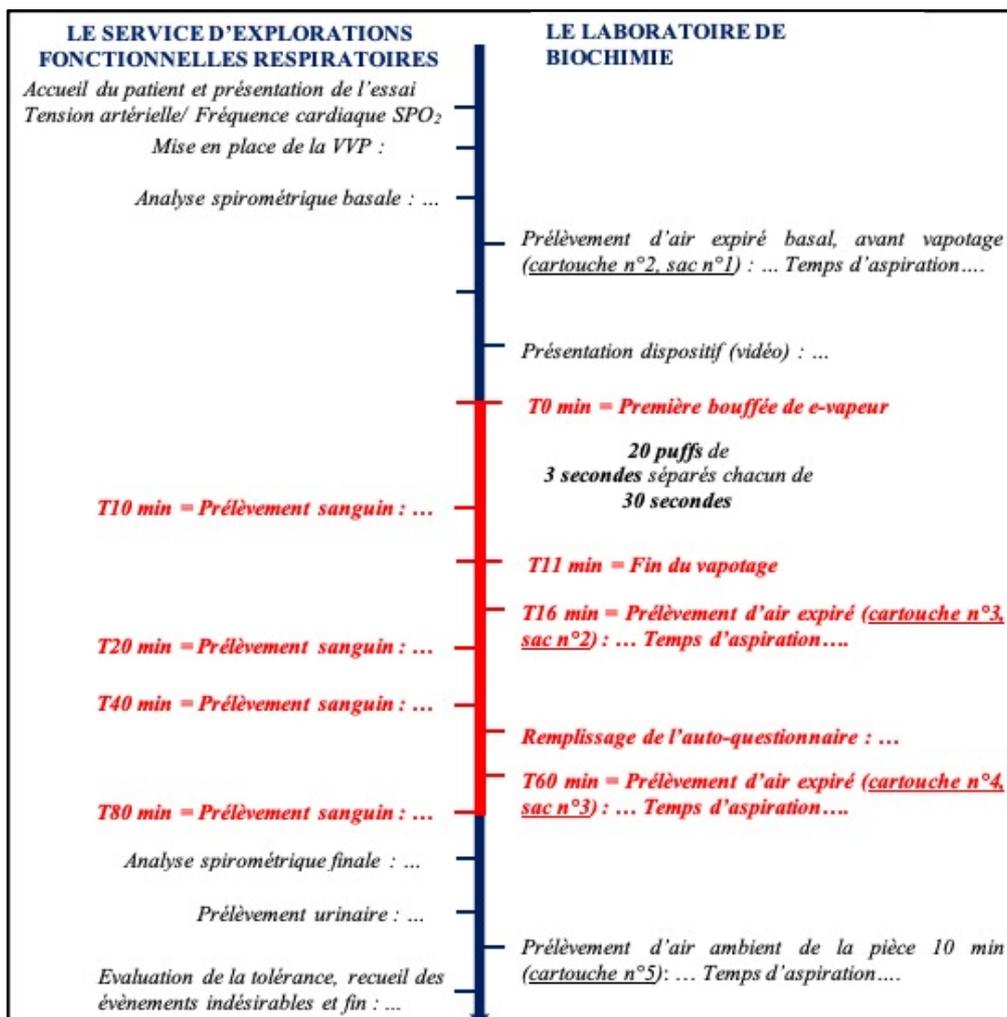
LE LABORATOIRE DE BIOCHIMIE	LE SERVICE D'EXPLORATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES
<p style="text-align: center;"><i>Mettre les initiales (Prénom-Nom) de la personne ayant effectué la tâche :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Préparer la feuille de prescription et les étiquettes pour les prélèvements : <input type="checkbox"/> Charger la batterie de l'e-cigarette : <input type="checkbox"/> Etiqueter l'e-liquide :.... <input type="checkbox"/> Amorcer le dispositif sans allumer la batterie : <input type="checkbox"/> Remplir la cartouche de e-liquide, monter le système et vérifier l'ouverture maximum du air flow : <input type="checkbox"/> Peser le dispositif rempli : 	<p style="text-align: center;"><i>Mettre les initiales (Prénom-Nom) de la personne ayant effectué la tâche :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Vérifier la disponibilité des consommables nécessaires (perf, tubes prélèvements) : <input type="checkbox"/> Vérifier la disponibilité de la pièce d'accueil : <input type="checkbox"/> Préparer les dispositifs sac + embout permettant le recueil de l'air expiré (x 3) : <input type="checkbox"/> Préparer le pince-nez : <input type="checkbox"/> S'assurer de la disponibilité du spiromètre :

<input type="checkbox"/> S'assurer de la disponibilité de la pompe, des cartouches (x 5) et des tuyaux (x 5) :	
---	--

B – AVANT L'ARRIVEE DU PATIENT DANS LE SERVICE

LE LABORATOIRE DE BIOCHIMIE	LE SERVICE D'EXPLORATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES
<p style="text-align: center;"><i>Mettre les initiales (Prénom-Nom) de la personne ayant effectué la tâche :</i></p> <input type="checkbox"/> Installer le circuit de la pompe : <input type="checkbox"/> Préparer la vidéo de présentation de l'essai : <input type="checkbox"/> Effectuer le prélèvement d'air ambiant de la pièce 10 min (cartouche n°1): <input type="checkbox"/> Allumer en appuyant 5 fois sur le bouton, la batterie vérifier la résistance 1,5 Ω et puissance 8,5 W :	<p style="text-align: center;"><i>Mettre les initiales (Prénom-Nom) de la personne ayant effectué la tâche :</i></p> <input type="checkbox"/> Préparer la voie veineuse périphérique et les tubes de prélèvement : <input type="checkbox"/> Vérifier la présence de l'ensemble du matériel de la partie A :

C – INVESTIGATION



D – APRES LE DEPART DU PATIENT

LE LABORATOIRE DE BIOCHIMIE	LE SERVICE EFR
<p><i>Mettre les initiales (Prénom-Nom) de la personne ayant effectué la tâche :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Désinstaller le matériel : <input type="checkbox"/> Récupérer les cartouches : <input type="checkbox"/> Récupérer une copie des spirométries: <input type="checkbox"/> Peser le dispositif : <input type="checkbox"/> Centrifuger les tubes héparinés : <input type="checkbox"/> Décanner les tubes héparinés : <input type="checkbox"/> Envoyer les tubes et la feuille de prescription à Haute pierre : <input type="checkbox"/> Congeler les tubes <input type="checkbox"/> Gérer les cartouches de prélèvement d'air expiré (NHC ou Sébastien R) : <input type="checkbox"/> Etiqueter l'atomiser et le conserver dans un bac DASRI:.... 	<p><i>Mettre les initiales (Prénom-Nom) de la personne ayant effectué la tâche :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Ranger le matériel :

- Remplir l'ordonnance et le fichier (excel) de suivi des administrations (chemise verte) :
- Apporter les e-liquides utilisés par série de 10 pour destruction à la fin de l'étude. Joindre les ordonnances associées à la série, joindre aussi une copie du formulaire (excel) concernant l'administration des e-liquides. Mettre une copie dans la chemise violette « Pharmacie Documents remis à la pharmacie »
- Remettre les atomiser utilisés et contenant du e-liquide à Sébastien Roux pour élimination.

ATTENTION :

- Utilisation de la pompe bien mettre les cartouches dans le sens indiqué par la flèche coté pointe de la flèche vers la pompe. Vérifier que l'aspiration se fait sans toucher l'extrémité de la cartouche pour éviter les contaminations
- Mise en route de la pompe ; appuyer sur les touches

Stop	pump	Go
------	------	----
- Chronométrer le temps d'aspiration de l'air dans la cartouche il faut être à un temps supérieur à 2 min.
- Indiquer le temps d'aspiration sur la feuille de déroulement.
- Ne pas aspirer la condensation présente dans le sac quitte à terminer l'aspiration par la pompe plus tôt.
-

Annexe 4 – Auto-questionnaire à compléter lors de la visite de suivi V1

Questions liées au régime alimentaire :

À QUAND REMONTE VOTRE DERNIER REPAS : _____ Heures

Composition de votre dernier repas :

Combien de repas prenez-vous par jour ?	3 repas/j	Je mange souvent un 4 ^e repas	1-2 repas/jour
Mangez-vous entre les repas ?	Non/ je mange une collation au besoin	Je mange généralement en soirée	Je grignote très souvent entre les repas
À quelle fréquence mangez-vous au restaurant ? (sandwicheries, fast food, pizza, rôisserie, mets chinois...)	Moins de 1 fois/sem	1-2/sem	3 repas et +/sem
Consommez-vous des mets prêt-à-servir ? (mets congelés, pizza, mets italiens ou chinois, riz et pâtes alimentaires assaisonnés...)	< 1/sem	1-2/sem	> 3/sem
Combien de fruits et légumes consommez-vous ? 1 portion = 1 pièce moyenne, ½ tasse pièce fraîche, surgelés ou en conserve en purée ou liquide	> 4/jour	2-3/jour	< ≤ 1/jour
Quelle est la grosseur de votre portion de viande par repas ? 1 portion = 100g	1 paquet de cartes ou moins	Entre 1 et 2 paquets de cartes	2 paquets de cartes ou plus
Mangez-vous des charcuteries ou des viandes grasses ? (bacon, saucisse, saucisson de Bologne, salami, pepperoni, pâté de foie, cretons, ailes de poulet, croquettes, côtes levées, viandes hachées)	Moins de 1 fois /sem	1-2/sem	3 fois et + /sem
Mangez-vous du poisson pané ?	≥ 2 fois/sem	1 fois/sem	Rarement
Mangez-vous du fromage ? 1 portion = 30g de fromage en tranches, fromage à la crème (30 ml ou 2 c. à table). Exclure le fromage écrémé ou le cottage.	≤ 2/sem	3-4/sem	≥ 5/sem
Quel type de produits laitiers (lait et yogourt) consommez-vous ?	Moins de 2 % de m.g.	2 % m.g.	≥ 3 % m.g./Je n'en consomme pas
Quelle proportion les produits céréaliers ou les féculents occupent-ils dans votre assiette ? (pâtes alimentaires, riz, couscous, pomme de terre...)	1/4 de l'assiette	½ de l'assiette	Plus de la ½ de l'assiette

Choisissez-vous des produits céréaliers faits de grains entiers ? (pain de blé entier, céréales à déjeuner riches en fibres, riz brun...)	Oui, toujours	À l'occasion	Rarement
À quelle fréquence consommez-vous des produits de boulangerie ? (beignes, brioches, croissants, danoises, muffins). Exclure les muffins maison.	< 1 fois ou moins/sem	2 -3/sem	> 4 ou plus/sem
À quelle fréquence consommez-vous des desserts commerciaux ? (en collation ou au repas : barres tendres, biscuits, crème glacée régulière, gâteaux, pâtisseries, tartes, etc.)	< 2 fois ou moins/sem	3 - 4/sem	> 5 ou plus/sem
À quelle fréquence consommez-vous des sucreries ? (bonbons, chocolat, sucre de table, miel, confiture...)	< 3 fois ou moins/sem	4-5/sem	Tous les jours
Buvez-vous des breuvages sucrés ? (jus ou boisson aux fruits, boisson gazeuse ou énergisante, thé glacé, limonade...)	< 240ml ou moins/jour	240-500ml/jour	> 500 ml/jour
Quelle est votre consommation moyenne d'alcool ? 1 consommation = 150 ml de vin, 1 bière, 50 ml de spiritueux	< 1/jour	2/jour	> 2/jour
Consommez-vous des soupes, bouillons ou sauces, en sachet ou en conserve ?	< 1/sem ≥	1-2/sem	> 3/sem
Consommez-vous des aliments enrobés de sel ? (craquelins, croustilles, pop-corn, bretzels, noix ou graines salées, etc.)	< 1 fois /sem ≥	2-3/sem	> 4/sem
Ajoutez-vous du sel à vos aliments ?	Rarement	Souvent / avec certains aliments	La plupart du temps

Questions liées à l'entraînement physique :

FAITES-VOUS UN ENTRAÎNEMENT PHYSIQUE RÉGULIER ? OUI NON

Description : _____

Date/heure du dernier entraînement : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_| -- |_|_| : |_|_|

À quelle fréquence vous déplacez-vous à pied ou à vélo ?	La plupart du temps	> 3x/sem	1-2x/sem	Rarement
À quelle fréquence choisissez-vous d'emprunter les escaliers plutôt que l'ascenseur ?	Toujours	Souvent	À l'occasion	Jamais
Combien de fois par semaine faites-vous de l'activité physique pour au moins 30 minutes ?	5-7 x/sem	4x/sem	2-3x/sem	< 1x/sem
Vous hydratez-vous suffisamment pendant et/ou après une séance d'exercices ?	Toujours	Souvent	À l'occasion	Jamais

Questions liées au sommeil :

AVEZ-VOUS UN RYTHME DE SOMMEIL RÉGULIER ? OUI NON

Combien d'heure de sommeil avez-vous par nuit ? |__|__| heures

Avez-vous bien dormi la nuit dernière ? OUI NON

Combien d'heures de sommeil la nuit dernière ? |__|__| heures

Questions liées à la prise de nicotine :

À QUAND REMONTE VOTRE DERNIERE PRISE DE NICOTINE : |__|__| Heures

Sous quelle forme ?

- Cigarette
- Cigarette électronique
- Patches
- Gomme à mâcher
- Autres

EST-CE QUE VOUS AVEZ CESSÉ DE FUMER LA CIGARETTE TRADITIONNELLE ? : OUI NON

Si non :

Fréquence : <input type="radio"/> Je fume tous les jours <input type="radio"/> Je fume mais pas tous les jours	
Si tous les jours, Combien de cigarettes fumez-vous par __ __	Combien de cigarettes fumez-vous par semaine __ __
Fumez-vous des cigarettes à bout filtre ? <input type="radio"/> OUI <input type="radio"/> NON	À quel âge avez-vous commencé à fumer ? __ __ ans

Modalités ACTUELLES de prise de nicotine :

VAPOTEZ-VOUS TOUS LES JOURS ? : OUI NON

Quelle concentration de nicotine utilisez-vous ? : |__|__| mg / ml

Quels parfums préférez-vous ? _____

FUMEZ-VOUS LA PIPE ?

- OUI, tous les jours
- OUI, à l'occasion
- NON

FUMEZ-VOUS LE CIGARE ?

- OUI, tous les jours
- OUI, à l'occasion
- NON

FAITES-VOUS USAGE DE TABAC À PRISER OU À CHIQUER ?

- OUI, tous les jours
- OUI, à l'occasion
- NON

Au cours des 2 DERNIÈRES ANNÉES, combien de fois avez-vous essayé, avec succès ou non, d'arrêter de fumer des cigarettes ? : |_|_| FOIS

A quand remonte votre dernière cigarette complète ? |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

À quand remonte votre dernière inhalation (puff de vaporette) ? |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

À part vous, combien de personnes fument à la maison ? |_|_| PERSONNES

Utilisez-vous actuellement des médicaments pour vous aider à cesser de fumer ? : OUI NON

Si oui LESQUELS ?

- Timbres transdermiques (patches)
- Gomme à la nicotine
- Zyban (bupropion)
- Champix (varénicline)
- Autre : _____

Annexe 5 – Test de Fagerström en 6 questions sur la dépendance nicotinique

Échelle de Fagerstrom

COMBIEN DE TEMPS APRÈS VOTRE RÉVEIL FUMEZ-VOUS VOTRE PREMIÈRE CIGARETTE ?

- Dans les 5 minutes (3)
- De 6 à 30 minutes (2)
- De 31 à 60 minutes (1)
- Après 60 minutes (0)

TROUVEZ-VOUS DIFFICILE DE NE PAS FUMER DANS LES ENDROITS OÙ C'EST INTERDIT (PAR EX. CINÉMAS, BIBLIOTHÈQUES) ?

- Oui (1)
- Non (0)

QUELLE CIGARETTE DE LA JOURNÉE VOUS SERAIT-IL LE PLUS DIFFICILE DE RENONCER ?

- La première de la matinée (1)
- Toutes les cigarettes sans distinction (0)

COMBIEN DE CIGARETTES FUMEZ-VOUS PAR JOUR, EN MOYENNE ?

- 10 ou moins (0)
- 11 à 20 (1)
- 21 à 30 (2)
- 31 ou plus (3)

FUMEZ-VOUS À UN RYTHME PLUS SOUTENU LE MATIN QUE L'APRÈS MIDI ?

- Oui (1)
- Non (0)

FUMEZ-VOUS LORSQUE VOUS ÊTES MALADE ET QUE VOUS DEVEZ RESTER AU LIT TOUTE LA JOURNÉE ?

- Oui (1)
- Non (0)

Score global : |__|__| / 10

(CALCUL AUTOMATIQUE)

Annexe 6 – Auto-questionnaire simplifié à compléter lors de la visite de suivi V2

Questionnaire sur les changements en termes d'habitudes de vie

Questions liées au régime alimentaire :

À QUAND REMONTE VOTRE DERNIER REPAS : |_|_|Heures

Composition de votre dernier repas : _____

Avez-vous changé votre comportement alimentaire depuis la visite 1 : _____

Questions liées à l'entraînement physique :

FAITES-VOUS UN ENTRAÎNEMENT PHYSIQUE RÉGULIER ? OUI NON

Description : _____

Date/heure du dernier entraînement : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_| - |_|_| : |_|_|

Avez-vous changé votre comportement depuis la visite 1 ? : OUI NON

Si oui

Décrivez les changements : _____

Questions liées au sommeil :

Avez-vous bien dormi la nuit dernière ? _____

Combien d'heures de sommeil la nuit dernière ? _____ heures

Avez-vous changé votre sommeil depuis la visite 1 ? : Oui Non

Si oui, Décrivez les changements : _____

Questions liées à la prise de nicotine :

À QUAND REMONTE VOTRE DERNIERE PRISE DE NICOTINE : _____Heures

Sous quelle forme : _____

Avez-vous changé votre comportement dans la prise de nicotine depuis la visite 1 :

Oui Non

Si oui Description de vos nouveaux comportements : _____

Annexe 7 – Recommandations des sociétés savantes et institutions sur l'utilisation de la cigarette électronique dans le sevrage tabagique

Institution	Recommandations	Source
Haut Conseil de Santé Publique (HCSP) <i>Avis relatif aux bénéfices-risques de la cigarette électronique, France, 26/11/2021</i>	Au regard de données probantes insuffisantes dans la littérature scientifique concernant l'efficacité de la vape pour le sevrage tabagique, les professionnels ne doivent pas proposer des cigarettes électroniques et plutôt recommander à leurs patients des outils éprouvés (type thérapie de substitution nicotinique ou médicaments).	https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=1138
Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks (SCHEER) <i>Scientific Opinion on electronic cigarettes, 16/04/2021</i>	Il existe un manque de données longitudinales solides sur l'effet des cigarettes électroniques dans le sevrage tabagique. Jusqu'à ce que de telles recherches soient disponibles, les cigarettes électroniques ne devraient être considérées comme une aide au sevrage tabagique que pendant une période limitée et sous surveillance.	https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/scheer_o_017.pdf
Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF) et la Société Francophone de Tabacologie (SFT), 01/11/2019	Les médicaments disponibles et validés pour l'aide au sevrage (les substituts nicotiques, la varéclique et le bupropion) doivent être prescrits en première intention avant l'utilisation de la cigarette électronique. La cigarette électronique avec liquide contenant de la nicotine fait partie des moyens non médicamenteux d'aide potentielle au sevrage tabagique.	http://societe-francophone-de-tabacologie.org/dl/Vape-SFT_SPLF-MoissansTabac-20191101.pdf
Food and Drug Administration, USA 2021	Basé sur l' <i>US Preventive Services Task Force (USPSTF) Recommendation Statement</i> : les preuves actuelles sont insuffisantes pour évaluer l'équilibre entre les avantages et les inconvénients des e-cigarettes pour le sevrage tabagique chez les adultes, y compris les personnes enceintes.	https://www.uspreventiveservicestaskforce.org/uspstf/document/RecommendationStatementFinal/tobacco-use-in-adults-and-pregnant-women-counseling-and-interventions
National Institute for Health and Care Excellence (NICE), Angleterre, 2021	<i>La Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA)</i> ouvre la voie à la prescription des e-cigarettes sous autorisation médicale pour les fumeurs de tabac qui souhaitent arrêter de fumer. Les fabricants peuvent s'adresser à la MHRA pour soumettre leurs produits au même processus d'approbation réglementaire que les autres médicaments disponibles dans les services de santé. L'Angleterre pourrait ainsi devenir le premier pays au monde à prescrire des e-cigarettes autorisées en tant que produit médical.	https://www.gov.uk/government/publications/vaping-in-england-evidence-update-february-2021/vaping-in-england-2021-evidence-update-summary
National Health and Medical Research Council (NHMRC) 2022 CEO Statement on Electronic Cigarettes: Plain English Summary, Australie, 23/06/2022	Il est illégal d'utiliser, de vendre ou d'acheter de la nicotine pour utilisation dans les e-cigarettes sans ordonnance. Il existe des preuves limitées que les e-cigarettes à base de nicotine sont une aide efficace pour arrêter de fumer lorsqu'elles sont utilisées dans un contexte clinique. L'utilisation des e-cigarettes par les fumeurs qui tentent d'arrêter de fumer est susceptible d'entraîner une plus grande exposition à long terme à la nicotine que l'utilisation d'autres mesures de sevrage tabagique. Il existe des preuves limitées que les ex-fumeurs utilisant des e-cigarettes sont environ deux fois plus susceptibles de rechuter que les ex-fumeurs n'utilisant pas de e-cigarettes.	https://www.nhmrc.gov.au/about-us/news-centre/australias-national-health-council-delivers-assessment-electronic-cigarettes#download
Organisation Mondiale de la Santé (OMS), WHO report on the global tobacco epidemic, Addressing new and emerging products, 27/07/2021	Les pays doivent rester vigilants et continuer à se concentrer sur la mise en œuvre de mesures fondées sur des preuves qui ont fait leurs preuves pour réduire le tabagisme, et éviter les distractions causées par la prolifération de nouveaux produits. Les systèmes électroniques de délivrance de la nicotine doivent être strictement réglementés pour une protection maximale de la santé publique.	https://www.who.int/publications/i/item/9789240032095

Étude des effets des liquides pour cigarette électronique et de la cigarette classique chez l'Homme, la souris et sur un modèle de barrière alvéolo- capillaire

Résumé

Les e-cigarettes (e-cig) sont considérées comme des outils de sevrage tabagique, bien que leur efficacité et leur tolérance ne soient pas démontrées, en partie à cause d'un large choix de liquides (eL) contenant des ratios différents en propylène glycol (PG) et glycérine végétale (VG), avec ou sans nicotine et arômes, qui complexifie la recherche scientifique. Les travaux présentés ici concernent trois niveaux d'analyse : l'Homme, la souris et un modèle cellulaire. Chez l'Homme, les résultats de l'essai clinique VAPexp'AIR sont les premiers à montrer que l'augmentation du PG dans la formulation du eL semble exercer une influence sur la masse de nicotine inhalée et sur la C_{max} plasmatique de nicotine. Le rôle pro-oxydant de l'inhalation d'aérosol de e-cig n'a pas pu être démontré. Chez la souris, un modèle de BPCO a été développé après exposition à la fumée de tabac, présentant des caractéristiques pathologiques telles que le recrutement des cellules immunitaires dans les voies aériennes inférieures associé à de l'emphysème pulmonaire. Ce modèle nécessite davantage d'ajustements avant son utilisation comme contrôle positif lors de l'exposition à la e-cig. *In vitro*, un modèle de co-culture mimant la barrière alvéolo-capillaire validé a été exposé aux principaux composants des e-L. Des effets néfastes sur l'intégrité de la barrière, mais également sur l'inflammation, le stress oxydant et la mort cellulaire ont été identifiés pour les principaux composants et leurs mélanges. La présence d'arômes mentholé et fruité, ainsi que de nicotine dans la composition des e-L semble empirer les observations.

Mots clés : cigarette électronique, tabac, e-liquides, arômes, nicotine, barrière alvéolo-capillaire

Abstract

E-cigarettes (e-cig) are considered to be smoking cessation tools, although their efficacy and tolerability are not proven, partly due to a wide choice of liquids (eL) containing different ratios of propylene glycol (PG) and vegetable glycerine (VG), with or without nicotine and flavourings, which complicates the scientific research. The work reported here covers three levels of analysis: humans, mice and a cellular model. In humans, the results of the VAPexp'AIR clinical trial are the first to show that the increase in PG in the eL formulation seems to influence the mass of inhaled nicotine and the plasma C_{max} of nicotine. The pro-oxidant role of e-cig aerosol inhalation could not be demonstrated. In mice, a model of COPD has been developed after exposure to tobacco smoke, showing pathological features such as recruitment of immune cells in the lower airways associated with pulmonary emphysema. This model needs further adjustment before being used as a positive control for e-cig exposure. *In vitro*, a validated co-culture model mimicking the alveolar-capillary barrier was exposed to the main components of e-L. Adverse effects on barrier integrity, but also on inflammation, oxidative stress and cell death were identified for the main components and their mixtures. The presence of menthol and fruity flavours, as well as nicotine in the composition of e-L seems to worsen the observations.

Keywords: electronic cigarette, tobacco, e-liquids, flavours, nicotine, alveolar-capillary barrier