

ÉCOLE DOCTORALE 414 - SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neurocardiovasculaire (UR7296)

THÈSE présentée par :

Emma FILAUDEAU

soutenue le : 5 septembre 2025

pour obtenir le grade de :
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline / Spécialité : **SCIENCES PHARMACEUTIQUES - TOXICOLOGIE**

**Mise en place de méthodologies analytiques
et de modèles cellulaires permettant
l'identification d'éléments potentiellement
toxiques présents dans l'aérosol d'e-cigarette**

THÈSE dirigée par :

Madame KEMMEL Véronique

MCU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur ANThERIEU Sébastien

MCU, Université de Lille

Monsieur GAMBIER Nicolas

PU-PH, Université de Lorraine

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Madame PONS Françoise

PU, Université de Strasbourg

Monsieur MARTZEL Xavier

GAÏATREND

Avertissement au lecteur / Warning to the reader

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition des membres de la communauté universitaire. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Cela implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction ou représentation illicite encourt une poursuite pénale.

This document is the result of a long process approved by the jury and made available to members of the university community. It is subject to the intellectual property rights of its author. This implies an obligation to quote and reference when using this document. Furthermore, any infringement, plagiarism, unlawful reproduction or representation will be prosecuted.

Code de la Propriété Intellectuelle

Article L122-4 :

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite. Il en est de même pour la traduction, l'adaptation ou la transformation, l'arrangement ou la reproduction par un art ou un procédé quelconque.

Any representation or reproduction in whole or in part without the consent of the author or his successors in title or assigns is unlawful. The same applies to translation, adaptation or transformation, arrangement or reproduction by any art or process whatsoever.

Articles L335-1 à L335-9 : Dispositions pénales / Penal provisions.

Licence attribuée par l'auteur



*“L’expérience est une observation provoquée dans
le but de faire naître une idée.”*

Claude Bernard

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier très sincèrement la Pr. Françoise Pons, le Pr. Nicolas Gambier et le Dr. Sébastien Anthérieu d'avoir accepté d'évaluer mon travail de doctorat mené ces trois dernières années. Je suis très honorée qu'ils aient choisi de prendre part à mon jury de thèse et je les remercie par avance du temps qu'ils prendront pour lire et évaluer mon travail. Je souhaite également remercier chaleureusement, les membres de mon comité de suivi individuel, la Pr. Anne Charloux, la Pr. Catherine Vergely-Vandriessse et le Dr. Yannick Goumon pour leur bienveillance et leurs précieux conseils.

Je tiens à remercier sincèrement ma directrice de thèse, le Dr. Véronique Kemmel. Je la remercie infiniment d'avoir accepté de m'intégrer à l'unité de recherche lors de mes stages et lors de cette thèse. Je la remercie sincèrement de son engagement et son optimisme tout au long de ces travaux. Malgré les différents obstacles rencontrés lors de ces dernières années, elle a toujours été disponible pour répondre à mes interrogations. Merci infiniment pour son soutien, son expertise, sa soif scientifique et ses nombreuses corrections. J'espère sincèrement que mes travaux de thèse et les différentes avancées du projet seront pour elle une jolie histoire à raconter.

Je tiens à remercier Monsieur Xavier Martzel et l'ensemble des membres de la société GAÏATREND avec laquelle j'ai pu effectuer cette thèse CIFRE. Je les remercie infiniment de m'avoir fait confiance sur ce projet et sur la mise en place des différentes phases de celui-ci.

Je souhaite, par la suite, remercier le Pr. Laurent Monassier, directeur de l'unité de recherche 7296. Je le remercie pour son accueil au sein de l'unité et son implication dans les différents axes de recherches. Les discussions en réunions scientifiques ont toujours été riches de sens et son esprit critique un réel moteur.

Je tiens maintenant à remercier l'ensemble des membres du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neurocardiovasculaire pour leur soutien et aide tout au long de ces travaux de thèse. Tout d'abord Anita, mon binôme sur le Vitrocell, avec qui j'ai eu la chance de collaborer tout au long des expérimentations. C'était un réel plaisir et honneur de travailler à ses côtés tant sur le plan professionnel qu'humain. Merci pour tous ces bons moments. Je serai toujours infiniment reconnaissante de son implication et son aide sur le projet ! Je suis certaine qu'elle a de beaux jours en recherche devant elle et je suis ravie de savoir que le projet continuera avec elle encore quelques temps. Je remercie également Elisa avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant 1 an avant qu'Anita nous rejoigne, merci pour son implication, ses bonnes recettes et les pauses thé ! Je souhaiterai bien sûr remercier Naomi pour toute sa bienveillance, aide, implication et écoute tout au long de ce projet. Elle a toujours su me conseiller et m'accompagner de la meilleure des manières. Je serai à jamais reconnaissante de tout ce qu'elle a fait depuis mes débuts en stage, tant sur le plan professionnel qu'humain. C'était un véritable honneur de pouvoir travailler à ses côtés, une scientifique et pharmacienne accomplie que j'ai toujours considérée comme un modèle de réussite et d'humilité. Merci pour ces chouettes moments passés ensemble (dont le congrès à Prague avec Anita qui reste un des meilleurs moments de cette thèse). Adrien, mon cher codoctorant et voisin de bureau, merci pour tous ces moments passés au laboratoire ou en dehors et tous ces fou-rires (surtout au karaoké). C'était un réel plaisir de travailler à ses côtés, et je suis d'ailleurs ravie d'avoir pu partager avec lui et bien d'autres l'expérience associative par 2PO (Association des Doctorants et Postdoctorants du CRBS). Merci Alice pour sa bonne humeur constante, ses conversations enrichissantes et ses gentils mots quotidiens. Merci Ahmed pour sa gentillesse, j'ai été ravie de pouvoir échanger avec lui. Grand merci à Guillaume pour sa bienveillance, ses blagues quotidiennes et bien sûr ses leçons d'histoires passionnantes. Je tiens à remercier Nathalie et Estelle pour leurs nombreux conseils scientifiques et expérimentaux, les échanges que nous avons pu avoir ont toujours été riches de sens. Merci à Hugues pour son aide tout au long du projet et pour sa disponibilité quotidienne au laboratoire. Merci aux nombreux stagiaires rencontrés

tout au long de ces années, notamment Célia et Manon avec qui j'ai beaucoup apprécié travailler.

Un grand merci à Sylvia pour son expertise, son aide en culture cellulaire et la mise en place d'un véritable NSB2 où l'on a toujours pris plaisir à travailler. J'étais ravie de partager avec elle sur le plan scientifique et humain.

Grand merci également à Pascal de la plateforme PIC-STRA où j'ai eu la chance de procéder aux acquisitions sur le confocal, je le remercie pour son expertise et sa grande disponibilité.

Un grand merci également à Valérie, pour l'aspect administratif et logistique, qui a toujours été disponible pour répondre à mes demandes et questions.

Je remercie très sincèrement Emilie Thiebaut qui a été d'une grande aide pour les expérimentations sur le TD-GC-MS. Je la remercie pour sa bienveillance, son expertise et sa grande disponibilité.

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du laboratoire R&D GAIATREND avec qui j'ai eu la chance de travailler. Simon, sans qui, l'expérience sur la LC-MS-TOF n'aurait pas été la même. Merci pour son expertise et sa disponibilité, et bien sûr les moments de rigolade. Claire, Léa et Justine, merci d'avoir rendu mes passages chez Gaïa enrichissants et très agréables ! Un grand merci aux collègues des autres services avec qui j'ai eu la chance d'échanger, dont Ophélie, Julie, Théo...

Je tiens à remercier tous les amis/collègues que j'ai pu rencontrer au sein du bâtiment, notamment les copains du 4^e étage (Olga, Marina, Charlotte, Félicie, Marguerite, Aurélien, Aghilas, Guillaume et bien d'autres), les copains du 3^e étage (Giulia, Anthony, Léa ...) et les copains du 1^{er} étage (Kirsley et Thomas). Merci d'avoir rendu les journées au CRBS toujours joyeuses et ensoleillées.

Enfin, je souhaite remercier très sincèrement l'ensemble des membres du corps enseignant dont j'ai pu croiser la route. Leur passion et leur envie de transmettre ont été moteurs tout au long de mes études. Une pensée particulière pour les docteurs Coradin et Le Carret qui ont toujours cru en moi pendant mes débuts en licence.

Plus personnellement, je tiens à remercier très sincèrement l'ensemble de mes amis, Nina, Mathilde, Noëlla, Diane, Clément, Matthieu, Manuel, Emmanuel, Louise et bien d'autres pour leur soutien indéfectible. Ils ont grandement participé à mon épanouissement personnel et à mon équilibre tout au long de ce parcours académique. Un grand merci aux copains strasbourgeois (Elena, Mélaine, Martin etc..) pour leur soutien et les moments passés ensemble. Un grand merci à toutes les personnes dont j'ai pu croiser la route ces dernières années.

Enfin, je souhaite remercier infiniment les membres de ma famille et leur dédier ce manuscrit. Je leur serai éternellement reconnaissante pour le soutien sans faille qu'ils m'ont accordé tout au long de mon voyage académique. Je ne les remercierai jamais assez de tout ce qu'ils ont fait pour moi pour rendre ce chapitre le plus serein et joyeux possible. Merci à mes parents, Elisabeth et Christian, qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours soutenue. Merci à ma sœur Camille et son chéri Paul, pour leur soutien quotidien et ces beaux moments partagés ensemble (et tous ceux passés dans des parcs d'attraction). Merci à ma Mamé, pour son soutien ainsi que les bons moments et bons plats auxquels j'ai droit à chaque retour dans l'Ouest. Merci tout particulier à Jacques et Pierre qui ont été de réels piliers pendant ces 6 années passées à Strasbourg, je serai toujours reconnaissante de leur soutien et générosité. Merci à tous les autres membres de ma famille, qui d'une manière ou d'une autre, m'ont accompagnée tout au long de ce travail.

Enfin, je remercie celui qui m'est cher pour toute la patience et le soutien dont il a fait preuve pendant cette dernière année de thèse. Je lui suis infiniment reconnaissante et le remercie pour toute la joie et la bienveillance qu'il apporte à mon quotidien.

Liste d'articles

- Emma Filaudeau, Amelia-Naomi Sabo, Anita Lebert, Laurent Monassier and Véronique Kemmel
« Berry e-liquid flavours toxicities are not equal on an alveolar-capillary barrier cell model according to two exposure methods » Soumission dans le journal *Toxics*
- Amelia-Naomi Sabo, Emma Filaudeau, Anita Lebert, Sylvia Da Silva, Guillaume Becker, Laurent Monassier, and Véronique Kemmel. « Nicotine alters alveolar-barrier integrity by blocking autophagy and occludin trafficking » Soumission dans le journal *Cell biology and toxicology*
- Amelia-Naomi Sabo, Emma Filaudeau, Sylvia Da Silva, Guillaume Becker, Laurent Monassier, and Véronique Kemmel. « Flavoured and Nicotine-Containing e-Liquids Impair Homeostatic Properties of an Alveolar-Capillary Cell Model ». *Food and Chemical Toxicology* 174 (avril 2023): 113650. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113650>.

Communications orales et affiches

- 03 au 06 juin 2024 :

Participation et présentation d'un poster au congrès ESTIV (European Society of Toxicology In Vitro) 2024 - Prague, République Tchèque

“Chemical analysis and cytotoxicity studies of different berry e-liquid flavors according to two exposure methods on an alveolar-capillary barrier cell model”

Auteurs : Emma Filaudeau, Amelia-Naomi Sabo, Anita Lebert, Laurent Monassier, Véronique Kemmel

- 10 au 13 septembre 2023 :

Participation et présentation d'un poster au congrès EUROTOX (Federation of European Toxicologists & European Societies of Toxicology) 2023 - Ljubljana, Slovénie

“Cytotoxicity and oxidative stress induced by different berry e-liquid flavors on an alveolar-capillary cell model according to two exposure methods”

Auteurs : Emma Filaudeau, Amelia-Naomi Sabo, Elisa Meyer, Laurent Monassier, Véronique Kemmel

- 06 juillet 2023 :

Communication orale aux CRBS days - Strasbourg (Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg)

“Cytotoxicity and oxidative stress induced by different berry e-liquid flavors on an alveolar-capillary cell model according to two exposure methods”

Auteurs : Emma Filaudeau, Amelia-Naomi Sabo, Elisa Meyer, Laurent Monassier, Véronique Kemmel

o 22 juin 2023 :

Communication orale au colloque "Tabac et produits connexes" organisé par le GIS REFERtab - Paris (Hôpital Pitié-Salpêtrière)

« Effets induits par différents e-liquides aromatisés aux fruits rouges sur un modèle de barrière alvéolo-capillaire selon deux méthodes d'exposition. »

Auteurs : Emma Filaudeau, Amelia-Naomi Sabo, Elisa Meyer, Laurent Monassier, Véronique Kemmel

Table des matières

Remerciements.....	4
Liste d'articles.....	8
Communications orales et affiches	8
Liste des figures	13
Liste des tableaux.....	18
Abréviations :.....	21
I. Introduction.....	24
I.1. Le Tabagisme	24
I.1.1. Epidémiologie	24
I.1.2. Origine du tabac	25
I.1.3. L'évolution de la consommation du tabac.....	26
I.1.4. Toxicologie du tabac.....	26
I.1.5 Pathologies associées à la consommation de tabac	27
I.1.5.a. Les pathologies pulmonaires.....	28
I.1.5.b. Les pathologies non pulmonaires.....	35
I.2. Dépendance nicotinique et sevrage tabagique	37
I.2.1. La nicotine : molécule clé de la dépendance tabagique	37
I.2.2. Les méthodes de sevrage tabagique	42
I.3. Les ENDS : aide au sevrage tabagique ou une nouvelle problématique de santé publique ?..	44
I.3.1. Historique	45
I.3.2. Utilisation et statut légal de la cigarette électronique.....	46
I.3.3. Composés clés d'une cigarette électronique	48
I.3.4. Les différents types de cigarettes électroniques	50
I.3.5. Composition des e-liquides	52
I.3.6. L'e-liquide : un mélange complexe et toxique ?	58
I.3.6.a. Caractérisation chimique des aérosols et des e-liquides aromatisés	60
I.3.6.b. Effets des e-liquides et aérosols sur les voies respiratoires et autres systèmes biologiques : études in vivo et in vitro	63
II. Objectifs de la thèse	83
III. Matériels et méthodes	86
III.1. Mise en place du modèle in vitro et étude des toxicités.....	86
III.1.1. Dispositifs utilisés et mise en place des méthodes d'exposition	86
III.1.1.a. E-cigarette et e-liquides utilisés.....	86
III.1.1.b. 1 ^{ère} méthode d'exposition : par dilution	86

III.1.1.c. 2 ^{ème} méthode d'exposition : par piégeage de l'aérosol dans le milieu de culture cellulaire	87
III.1.1.d. 3 ^{ème} méthode d'exposition : par exposition directe des cellules à l'aérosol.....	88
III.1.2. Culture cellulaire	89
III.1.2.a. Lignée épithéliale alvéolaire NCI-H441.....	89
III.1.2.b. Lignée endothéliale HULEC-5a.....	90
III.1.2.c. Lignée endothéliale EA.hy926	90
III.1.2.d. Lignée monocyttaire THP-1	91
III.1.2.e. Mise en place de la coculture : validation phénotypique et fonctionnelle.....	91
III.1.2.f. Optimisation du modèle par l'ajout d'une composante immunitaire : les cellules THP-1	94
III.1.3. Investigations : réponses cellulaires	99
III.1.3.a. Mesure de l'intégrité de la barrière : Résistance transépithéliale électrique et expression des protéines de jonction	99
III.1.3.b. Mesure de la viabilité et activité métabolique cellulaire	99
III.1.3.c. Mesure du stress oxydant mitochondrial des cellules épithéliales alvéolaires...	100
III.2. Développement de méthodes analytiques pour l'identification des composés chimiques..	101
III.2.1. Analyse par thermodésorption associée à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (TD-GC-MS)	101
III.2.2. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (LC-MS-TOF).....	102
III.3. Analyses statistiques.....	103
IV. Résultats :	105
IV.1. Résultats liés à la coculture associant des cellules HULEC-5a aux cellules NCI-H441	105
IV.1.1. Intégrité de la BAC après 24h d'exposition à un milieu de culture cellulaire contenant des e-liquides dilués ou des aérosols piégés de e-liquides.....	106
IV.1.2. Cytotoxicité après 24h d'exposition à un milieu de culture cellulaire contenant des e-liquides dilués ou des aérosols d'e-liquides piégés	108
IV.1.3. Viabilité et activité métabolique cellulaire après 24h d'exposition à un milieu de culture cellulaire contenant des e-liquides dilués ou des aérosols piégés de e-liquides	110
IV.1.4. Résumé des investigations et résultats obtenus à partir du premier modèle de coculture	111
IV.2. Validation d'un deuxième modèle de coculture et évaluation des effets des e-liquides/aérosols sur la barrière in vitro	112
IV.2.1. Article « <i>Berry e-liquid flavours toxicities are not equal on an alveolar-capillary barrier cell model according to two exposure methods</i> »	112
IV.2.2. Etude de l'expression des protéines de jonction	134
IV.2.3. Investigations liées à une exposition directe de la coculture à l'aérosol via l'appareil Vitrocell®	137

IV.2.3.a. Investigation de l'intégrité de la barrière par mesure de la TER	137
IV.2.3.b. Evolution de la mortalité et activité enzymatique cellulaire après exposition directe aux aérosols	139
IV.2.4. Optimisation du modèle cellulaire par ajout d'une composante immunitaire à la coculture	141
IV.2.4.a. Obtention des macrophages M ₀ à partir des cellules monocytaires THP-1 par un traitement au PMA	142
IV.2.4.b. Mise au point du protocole de polarisation des M ₀ en M ₁ et M ₂	143
IV.2.4.c. Caractérisation morphologique des sous-types macrophagiques M ₀ , M ₁ et M ₂ .	145
IV.2.4.d. Caractérisation moléculaire des sous-types macrophagiques M ₀ , M ₁ et M ₂	147
IV.3. Mise au point des méthodes analytiques et identification de composés aromatiques dans les e-liquides et aérosols aromatisés aux fruits rouges	152
IV.3.1. Identification des composés chimiques dans les aérosols et e-liquides aromatisés aux fruits rouges par TD-GC-MS.....	152
IV.3.1.a. Identification des composés présents dans l'air ambiant utilisé comme contrôle	152
IV.3.1.b. Identification des composés présents dans un e-liquide et aérosol aromatisé à la mûre.....	154
IV.3.1.c. Identification des composés présents dans un e-liquide et aérosol aromatisé à la framboise	158
IV.3.1.d. Identification des composés présents dans un e-liquide et aérosol aromatisé à la fraise	162
IV.3.1.e. Identification des composés présents dans un e-liquide et aérosol aromatisé à la myrtille	166
IV.3.2. Mise en place d'une méthodologie d'identification des composés chimiques contenus dans les e-liquides et piégés par barbotage grâce à une technique de LC-MS-TOF	172
V. Discussion et perspectives	176
VI. Conclusion	193
Bibliographie	194
Annexe	217

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des pathologies chroniques et cancers pouvant être induits par le tabagisme (adapté de United States Surgeon General, 2014)	28
Figure 2: Incidence et mortalité des cancers du poumon dans le monde en 2020 (adapté de Ferlay et al., 2024)	29
Figure 3 : Consommation moyenne de cigarettes par jour et mortalité par cancer bronchique en France en fonction du sexe (Hill, 2010).....	31
Figure 4: Schématisation du développement d'une BPCO et de ses conséquences sur l'arbre respiratoire (image crée sur Biorender.com).....	33
Figure 5 : Histologie pulmonaire mettant en évidence A) des sacs alvéolaires pulmonaires sains et B) un affaissement emphysémateux des sacs alvéolaires associé au tabagisme (x4) (Higham, 2019) ..	33
Figure 6 : Schématisation des altérations du système immunitaire alvéolaire consécutives à une exposition à la fumée de cigarette (Lugg et al., 2022)	35
Figure 7: Représentation schématisée des différents types de cancers pouvant être induits par le tabagisme (crée sur Biorender.com).....	36
Figure 8: (A) Structure chimique de la nicotine et des atomes clés dans l'ionisation en fonction du pH. (B) Graphique de distribution des formes ionisées de nicotine selon le pH du milieu ("Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions," 2022)	38
Figure 9 : Schématisation des noyaux et voies impliquées, en région cérébrale, dans l'addiction induite par la nicotine (Vallés and Barrantes, 2023)	40
Figure 10: Schématisation du mécanisme de dépendance lié à la nicotine (Benowitz, 2010)	41
Figure 11 : Impact de l'accompagnement au sevrage tabagique sur les pourcentages d'abstinence en fonction du temps (Zhu et al., 2000).....	42
Figure 12 : Comparaison dans le temps des concentrations (log10) plasmatiques artérielles après consommation d'une cigarette (courbe orange) et des concentrations veineuses après application d'un patch de nicotine (courbe bleue), administration d'une gomme nicotine (courbe verte) ou consommation d'une cigarette (courbe rouge) (Le Houezec, 2003b).....	43
Figure 13 : Prévalence du vapotage actuel et du vapotage quotidien parmi les 18-75 ans en France métropolitaine entre 2014 et 2022. Le vapotage actuel regroupe les utilisateurs occasionnels et quotidiens. (Pasquereau et al., 2023)	46
Figure 14 : Représentation schématique d'une cigarette électronique et de la composition d'un e-liquide (crée sur Biorender.com).....	49

Figure 15: Représentation schématisée des 4 différentes générations d'e-cigarettes (créée sur Biorender.com).....	52
Figure 16: Représentation du métabolisme du Propylène Glycol (adaptée de Institut National de Recherche et de Sécurité, 2020 et créée sur Biorender.com).....	53
Figure 17: Représentation schématisée de la localisation des récepteurs TRPA1, TRPM8 et TRPV1 dans la région supérieure des voies aériennes (Dietrich et al., 2017)	60
Figure 18: Représentation schématisée des différentes techniques utilisées dans l'analyse des e-liquides et aérosols d'e-cigarettes (Rantaša et al., 2025).....	62
Figure 19: Représentation schématisée des effets cardiopulmonaires liés à l'utilisation de cigarettes électroniques (Neczypor et al., 2022)	81
Figure 20 : Schéma illustrant la méthode d'exposition par dilution (créée sur Biorender.com)	87
Figure 21 : Schéma illustrant la méthode d'exposition par piégeage de l'aérosol dans le milieu de culture cellulaire sans sérum (créée sur Biorender.com)	88
Figure 22 : (A) Représentation schématisée du principe et fonctionnement de l'appareil Vitrocell® VC1 Smoking machine et son module d'exposition (B) Figure illustrant le principe de l'interface Air-Liquide générée dans le module d'exposition (illustrations fournies par Vitrocell®).....	89
Figure 23 : Mise en place du modèle de coculture mimant la barrière alvéolo-capillaire (Filaudeau et al., soumis pour publication).....	92
Figure 24: Représentation schématisée du protocole permettant l'obtention des sous-types macrophagiques : M0, M1 et M2. Les conditions en rouges sont celles retenues pour la suite des expérimentations (figure créée sur Biorender.com)	96
Figure 25 : Chromatographe en phase gazeuse couplée à la thermodésorption et à la spectrométrie de masse ATD GC MS 3 (Perkin Elmer®) ("Thermal Desorption – Clarus GC with TurboMatrix ATD," n.d.)	102
Figure 26 : Modèle 6230B de LC-MS-TOF ("6230B Time-of-Flight LC/MS Agilent," n.d.)	103
Figure 27 : Illustration résumant les différentes investigations menées et principaux résultats liés au modèle de coculture associant les cellules HULEC-5a aux cellules NCI-H441 (Sabo et al., 2023)	105
Figure 28 : Mesure de la TER (% CTL) en fonction de la concentration d'e-liquides dilués dans le milieu de culture cellulaire et après une exposition de 24h. Chaque graphique représente un e-liquide aromatisé spécifique : (A) e-liquide mûre, (B) e-liquide framboise et (C) e-liquide myrtille.....	107
Figure 29 : Mesure de la TER (% CTL) en fonction du nombre de puffs d'aérosols d'e-liquide mûre piégés dans le milieu de culture et après une exposition de 24h.....	108

Figure 30 : Mesure de l'absorbance de l'activité LDH (450 nm) dans le milieu apical de la culture cellulaire en fonction de la concentration d'e-liquide déposé en région apicale de l'insert et après une exposition de 24h : (A) e-liquide mûre, (B) e-liquide framboise, (C) e-liquide myrtille.	109
Figure 31 : Mesure de l'absorbance de l'activité LDH (à 450 nm) dans le milieu apical de la culture cellulaire en fonction du nombre de puffs de l'e-liquide mûre piégé dans le milieu de culture cellulaire déposé en région apicale de l'insert et après une exposition de 24h.....	109
Figure 32 : Mesure de l'absorbance du formazan dans le test MTS (à 490 nm) en fonction de la concentration d'e-liquide dilué, déposé en région apicale de l'insert et après une exposition de 24h : (A) e-liquide mûre, (B) e-liquide framboise, (C) e-liquide myrtille.	110
Figure 33 : Mesure de l'absorbance du formazan dans le test MTS (% CTL) en fonction du nombre de puffs d'e-liquide mûre piégé dans le milieu de culture, déposé en région apicale de l'insert et mesuré 24h après exposition.	111
Figure 34 : Immunofluorescence mettant en évidence l'expression et la localisation de l'occludine, dans les cellules NCI-H441 dans (A) des conditions contrôle et (B) après 24h d'exposition à l'e-liquide fruits rouges dilué à 2,5 % dans le milieu de culture.	134
Figure 35: Histogrammes et western blots mettant en évidence une modification d'expression de l'occludine dans les cellules alvéolaires épithéliales NCI-H441 traitées pendant 24h avec du milieu de culture dans lequel un nombre croissant de puffs d'aérosols d'e-liquides a été piégé. (A) Véhicule PG/VG 76/24. (B) e-liquide mûre, (C) e-liquide fraise, (D) e-liquide framboise (E) e-liquide myrtille.	135
Figure 36 : Histogrammes et western blots mettant en évidence l'expression de la claudin-5 dans les cellules alvéolaires épithéliales NCI-H441 traitées pendant 24 h avec du milieu de culture dans lequel un nombre croissant de puffs d'aérosols d'e-liquides a été piégé. (A) Véhicule PG/VG 76/24. (B) e-liquides mûre, (C) e-liquides fraise, (D) e-liquides framboise (E) e-liquides myrtille.....	136
Figure 37 : Histogrammes et western blots mettant en évidence l'expression de ZO-1, dans les cellules alvéolaires épithéliales NCI-H441 traitées pendant 24 h avec du milieu de culture dans lequel un nombre croissant de puffs d'aérosols d'e-liquides a été piégé. (A) Véhicule PG/VG 76/24, (B) e-liquide mûre, (C) e-liquide fraise, (D) e-liquide framboise ou (E) e-liquide myrtille.	137
Figure 38 : Mesure de la TER (% CTL) en fonction du nombre de puffs de e-liquide et 24h après une exposition directe de la coculture aux aérosols par le dispositif Vitrocell®. Chaque graphique représente les résultats obtenus pour un e-liquide aromatisé. (A) Exposition aux aérosols d'un e-liquide mûre. (B) Exposition aux aérosols d'un e-liquide fraise. (C) Exposition aux aérosols d'un e-liquide framboise. (D) Exposition aux aérosols d'un e-liquide myrtille.....	138
Figure 39 : Mesure de l'absorbance de l'activité LDH (% CTL) en fonction du nombre de puffs 24h après une exposition directe de la coculture aux aérosols par le dispositif Vitrocell® en région apicale de l'insert (méthode ALI). Chaque graphique représente un e-liquide aromatisé. (A) Exposition aux aérosols d'un e-liquide mûre. (B) Exposition aux aérosols d'un e-liquide fraise. (C) Exposition aux aérosols d'un e-liquide framboise. (D) Exposition aux aérosols d'un e-liquide myrtille.	140

Figure 40 : Mesure de l'absorbance du formazan (% CTL) en fonction du nombre de puffs, 24h après une exposition directe de la coculture aux aérosols par le dispositif Vitrocell® en région apicale de l'insert (méthode ALI). Chaque graphique représente un e-liquide aromatisé. (A) Exposition aux aérosols d'un e-liquide mûre. (B) Exposition directe aux aérosols d'un e-liquide fraise. (C) Exposition directe aux aérosols d'un e-liquide framboise. (D) Exposition directe aux aérosols d'un e-liquide myrtille.....	141
Figure 41 : Représentation graphique (A) de l'aire cellulaire et (B) du périmètre cellulaire mesurés chez les THP-1 non traitées (en vert) et chez les cellules traitées au PMA à 20 nM pendant 24h (en violet).....	143
Figure 42: Représentation schématique du protocole permettant l'obtention des sous-types macrophagiques : M ₀ , M ₁ et M ₂ . Les conditions en rouge sont celles retenues pour la caractérisation des cellules obtenues (figure créée sur Biorender.com).....	145
Figure 43 : Analyse morphologique des sous-types macrophagiques. (A) Représentation graphique des aires cellulaires en μm^2 , (B) des périmètres cellulaires en μm , (C) du nombre de prolongements cellulaires observés par champ microscopique et (D) de la longueur de ces prolongements (μm) selon les sous-types macrophagiques obtenus (M ₀ , M ₁ et M ₂).	147
Figure 44 : Caractérisation moléculaire par qRT-PCR du sous-type macrophagique M ₁ dont les marqueurs moléculaires reconnus sont (A) Arg2, (B) Fpr2, (C) IL-1 β et (D) IL-12 β	149
Figure 45 : Caractérisation moléculaire par qRT-PCR du sous-type macrophagique M ₂ dont les marqueurs moléculaires sont (A) Arg1, (B) Egr2 et (C) c-Myc..	150
Figure 46 : Localisation de la protéine CD206 dans les différents sous-types macrophagiques (A) M ₀ , (B) M ₁ et (C) M ₂ . Le marquage par un anticorps anti-CD206 couplé à l'Alexa fluor™ 488 (dilution 1/2000, en vert) et marquage au Hoechst (noyau, bleu). (D) Représentation graphique de la moyenne des valeurs d'intensité de fluorescence obtenues grâce à l'immunomarquage du CD206 sur les différents sous-types macrophagiques.	151
Figure 47: Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour le contrôle air. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).....	153
Figure 48: Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'e-liquide aromatisé à la mûre. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).....	154
Figure 49: Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'aérosol aromatisé à la mûre. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).....	156
Figure 50 : Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'e-liquide aromatisé à la framboise. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).	159
Figure 51: Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'aérosol aromatisé à la framboise. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).....	160

Figure 52 : Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'e-liquide aromatisé à la fraise. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).	162
Figure 53 : Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'aérosol aromatisé à la fraise. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).	164
Figure 54 : Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'e-liquide aromatisé à la myrtille. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).	167
Figure 55: Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'aérosol aromatisé à la myrtille. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).	168
Figure 56 : Chromatogramme issu de l'analyse d'une solution de vanilline par LC-MS-TOF.....	174

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de composés chimiques aromatisants identifiés dans des e-liquides (Tierney et al., 2016)	56
Tableau 2 : Etudes in vivo sur modèles murins et ovins ciblant la toxicité des véhicules et arômes présents dans les e-liquides pour cigarettes électroniques	66
Tableau 3 : Études in vitro ciblant la toxicité des véhicules et arômes présents dans les e-liquides pour cigarettes électroniques	76
Tableau 4 : Résumé des investigations menées sur le premier modèle in vitro de BAC suivant le type d'e-liquide aromatisé et les méthodes d'exposition choisies.....	111
Tableau 5 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans un puff d'air (contrôle). Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé.....	153
Tableau 6 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'e-liquide aromatisé à la mûre. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé	155
Tableau 7: Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'aérosol aromatisé à la mûre. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé.....	156
Tableau 8 : Analyse comparative des profils chimiques - identification des composés communs et spécifiques entre la forme liquide et aérosolisée de l'e-liquide aromatisé à la mûre	158
Tableau 9 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'e-liquide aromatisé à la framboise. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé.....	159
Tableau 10 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'aérosol aromatisé à la framboise. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé.....	160
Tableau 11 : Analyse comparative des profils chimiques - identification des composés communs et spécifiques entre la forme liquide et aérosolisée de l'e-liquide aromatisé à la framboise	162
Tableau 12 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'e-liquide aromatisé à la fraise. Les composés sont classés par temps de rétention croissant	163
Tableau 13 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'aérosol aromatisé à la fraise. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé	164
Tableau 14 : Analyse comparative des profils chimiques - identification des composés communs et spécifiques entre la forme liquide et aérosolisée de l'e-liquide aromatisé à la fraise.....	166

Tableau 15 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'e-liquide aromatisé à la myrtille. Les composés sont classés par temps de rétention croissant.....	167
Tableau 16 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'aérosol aromatisé à la myrtille. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé.....	169
Tableau 17: Analyse comparative des profils chimiques - identification des composés communs et spécifiques entre la forme liquide et aérosolisée de l'e-liquide aromatisé à la myrtille.....	171
Tableau 18 : Récapitulatif des différents paramètres ajustés relatifs à la partie chromatographique de la LC-MS-TOF	173
Tableau 19 : Récapitulatif des différents paramètres ajustés relatifs à la partie spectrométrie de masse de la LC-MS-TOF	174

Liste des annexes

- Annexe : Sabo Amelia-Naomi, **Emma Filaudeau**, Sylvia Da Silva, Guillaume Becker, Laurent Monassier, et Véronique Kemmel. « Flavoured and Nicotine-Containing e-Liquids Impair Homeostatic Properties of an Alveolar-Capillary Cell Model ». Food and Chemical Toxicology 174 (avril 2023): 113650. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113650>.

Abréviations :

ADNc : ADN complémentaire

ALI : Interface Air-Liquide

APC : Allophycocyanine

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BAC : Barrière Alvéolo-Capillaire

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BPCO : Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

BSA : Albumine de Sérum Bovin

CD31 : Cluster de différenciation

CPNPC : Cancer du Poumon Non à Petites Cellules

CPPC : Cancer du Poumon à Petites Cellules

DCF : Dichlorofluorescéine

EGF : Facteur de croissance épidermique

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou dosage immuno-enzymatique lié à une enzyme

ENDS : *Electronic Nicotine Delivery Systems* ou systèmes électroniques de délivrance de la nicotine

eNos : *endothelial Nitric Oxide Synthase* ou oxyde nitrique synthase endothéliale

EVALI : *e-cigarette, or vaping, product use associated lung injury* ou pneumopathie associée au vapotage

FDA : *Food and Drug Administration*

GC : Chromatographie en phase gazeuse

GRAS : *Generally Recognized As Safe* ou généralement reconnu comme sûr

HBSS : *Hank's Balanced Salt Solution* ou solution saline équilibrée de Hank

HRP : *Horseradish Peroxidase* ou peroxydase de raifort

HTAP : Hypertension Artérielle Pulmonaire

ICP-MS : Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif

IFN- γ : Interféron gamma

IL-13 : Interleukine-13

IL-4 : Interleukine-4

LBA : Liquide Broncho-Alvéolaire

LC : Chromatographie en Phase Liquide

LC-MS-TOF : Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse à Temps de vol

LDH : Lactate Déshydrogénase

LPS : Lipopolysaccharides

MMP : Métalloprotéinases

MS : Spectrométrie de Masse

MTS : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium

nAChR : Récepteur Nicotinique de l'Acétylcholine

NAD⁺ : Forme oxydée du Nicotinamide adénine dinucléotide

NADH,H⁺ : Forme réduite du Nicotinamide adénine dinucléotide

NO : *Nitric Oxide* ou Oxyde Nitrique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : *Phosphate-buffered saline* ou Tampon Phosphate Salin

PE : Phycoérythrine

PG : Propylène Glycol

PMA : Phorbol 12-Myristate-13-Acétate

qRT-PCR : Réverse Transcription et Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative

ROS : *Reactive Oxygen Species* ou Espèces Réactives de l'Oxygène

SNC : Système Nerveux Central

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism* ou Polymorphisme Nucléotidique

SOD2 : Superoxyde Dismutase 2

SP-A : Protéine de Surfactant A

SP-D : Protéine de Surfactant D

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TD-GC-MS : Thermodésorption et Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

TER : Résistance Transépithéliale Electrique

THC : Tétrahydrocannabinol

UE : Union Européenne

VG : Glycérine Végétale

VTa : Aire Tegmentale Ventrale

vWF : Facteur de Von Willebrand

WST : *Water-Soluble Tetrazolium salt* ou sel de tétrazolium soluble dans l'eau

ZO-1 : Zonula Occludens-1

INTRODUCTION

I. Introduction

I.1. Le Tabagisme

I.1.1. Epidémiologie

A l'échelle mondiale, le tabagisme représente un problème majeur de santé publique. En effet, chaque année, près de 8 millions de décès lui sont attribués. Parmi ces derniers, 1,3 million concerne des personnes exposées de manière passive au tabac (World Health Organization, 2023a). En 2020, près de 22,3 % de la population mondiale fumaient quotidiennement, correspondant à 36,7 % de la population masculine contre 7,8 % de la population féminine (World Health Organization, 2023a).

A l'échelle nationale, la prévalence du tabagisme quotidien était égale à 23,1 % en 2023 avec une répartition en fonction du sexe différente de la situation mondiale (Le Nézet et al., 2025). En effet, en France, environ 25,4 % des hommes et 20,9 % des femmes fumaient de manière quotidienne en 2023 (Pasquereau et al., 2024).

Pour faire face à ce fléau, les différentes autorités de santé mondiales et nationales intensifient la lutte contre le tabagisme par l'intermédiaire de différentes campagnes de prévention et d'accompagnement à l'arrêt du tabac. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a notamment lancé le programme MPOWER en 2008, regroupant 6 mesures visant à ralentir le tabagisme et les problèmes de santé publique qui lui sont associés (World Health Organization, 2023b). Cette lutte semble porter ses fruits puisque les chiffres s'améliorent par rapport à ceux des années 2000. En effet, la prévalence globale du tabagisme mondial a chuté de plus de 10 points, passant de 33,3% en 2000 à 22,3% en 2020 (World Health Organization, 2024, 2023a).

Cependant, malgré ces actions, le tabagisme reste la première cause de mortalité évitable dans le monde (Rey Brandariz et al., 2024; World Health Organization, 2023b) et de nombreuses pathologies lui sont attribuables comme les cancers du poumon et de la vessie, de nombreuses maladies cardiovasculaires ou respiratoires comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).

I.1.2. Origine du tabac

Le tabac est originaire du continent américain, où la plante est cultivée et consommée depuis 8 000 ans avant JC (Goodman, 2005). Il a été introduit en Europe après la découverte de l'Amérique par Christophe Colomb et ses marins en 1492. En France, dans les années 1560, le tabac apparaît peu après que Jean Nicot, ambassadeur de France au Portugal, ait apporté les feuilles de tabac à la cour de Catherine de Médicis (Goodman, 2005; Kirsch, 2010). Le tabac est peu à peu utilisé à la cour puis plus largement en France et en Europe, notamment pour ses vertus médicinales (Charlton, 2004; Stewart, 1967). C'est au XX^{ème} siècle que le tabac connaît un essor majeur en se démocratisant à l'échelle mondiale. L'industrialisation de sa production sous forme de cigarettes a amplifié sa consommation et sa diffusion à l'ensemble de la population, essentiellement vers un usage récréatif (Goodman, 2005).

La plante de tabac, *Nicotiana tabacum* de son nom scientifique, est une espèce végétale herbacée pouvant atteindre 1,5 m de hauteur. Cette plante appartient à la famille des *Solanaceae* et au genre *Nicotiana* qui regroupe 60 espèces différentes (Goodman, 2005). Le terme « *Nicotiana* » a été attribué afin d'honorer Jean Nicot qui l'a introduite en France au XVI^{ème} siècle (Kirsch, 2010; Museum national d'Histoire naturelle, n.d.). Les plants de tabac sont cultivés dans des champs puis les feuilles sont récoltées et mises à sécher, selon différentes méthodes, afin de réduire au maximum leur teneur en eau, chaque méthode de séchage définissant une variété de tabac (Goodman, 2005). Ainsi, le tabac est classé en deux grandes catégories, tabac blond ou tabac brun, à partir desquelles se déclinent de nombreuses variétés.

Dans toutes les plantes de la famille des *Solanaceae* mais surtout dans les variétés de tabac, on retrouve des alcaloïdes, qui protègent la plante des insectes, dont la nicotine. Elle est présente dans les plants de tabac à des concentrations variant de 1 à 10 % selon la variété considérée (Chevalier and Nguyen, 2016). Par ailleurs, la nicotine a des propriétés pharmacologiques directement liées à sa fixation sur le récepteur. Ces dernières participent à la physiopathologie de la dépendance au tabac. D'autres alcaloïdes sont identifiés dans le tabac comme l'anatabine, la nornicotine et l'anabasine

(Goodman, 2005; Harris et al., 2015). Ces dernières molécules sont également potentiellement actives car elles se fixent sur les récepteurs nicotiniques. Cependant, elles sont présentes en moindre quantité dans le tabac et semblent donc représenter moins de risques pour la santé.

I.1.3. L'évolution de la consommation du tabac

Dans les années 1900, le tabac était produit sur l'ensemble du globe et notamment en France. Le tabac était, initialement, utilisé sous forme de tabac à priser ou bien à mâcher (Stewart, 1967). Historiquement, cette consommation est associée à certaines croyances, lors de rituels, ou à des usages médicaux, en raison de ses propriétés insecticides, antiseptiques et psychostimulantes.

Quand le tabac est fumé, il peut être consommé sous différentes formes : tabac roulé, cigarillos, cigares, pipes, chicha...(Goodman, 2005; Kirsch, 2010). Au cours du temps, les modes de consommation du tabac ont évolué et se sont davantage orientés vers la consommation de cigarettes « prêtes » à fumer en raison de leur fabrication à grande échelle par l'industrialisation à partir des années 1930 (Goodman, 2005). Cette industrialisation a permis de produire de grands volumes à des prix abordables pour le consommateur. L'industrie du tabac marque un tournant majeur dans l'ère du tabagisme en passant du tabagisme de classe à du tabagisme de masse et mondial. Au XX^{ème} siècle, la consommation de cigarettes se généralise notamment lors des deux guerres mondiales, lorsqu'elles étaient distribuées gratuitement aux soldats pour les aider à supporter la réalité de la guerre (Smith and Malone, 2009). En effet, les propriétés coupe-faim et psychostimulantes de la nicotine étaient bien connues et utilisées par les militaires sur le front.

I.1.4. Toxicologie du tabac

Les feuilles de tabac comportent plus de 2 500 composés. Lors de leur combustion, pouvant atteindre 1 000 °C, la fumée générée contient plus de 4 000 substances chimiques. Par ailleurs, la composition de la fumée de cigarette varie en fonction du type de tabac utilisé, des méthodes de fabrication, des différents additifs, etc... Parmi ces composés, outre la nicotine qui est connue pour son rôle dans le processus de dépendance, la fumée contient dans sa phase particulaire un nombre important de composés irritants voire cancérigènes comme les nitrosamines, les goudrons, les radicaux libres,

l'acroléine, le formaldéhyde ou encore les métaux lourds comme le cadmium. Dans la phase gazeuse, plusieurs composés toxiques sont inhalés par le consommateur comme le monoxyde de carbone, le dioxyde de carbone, le cyanure d'hydrogène et de nombreux composés organiques volatiles (Hoffmann et al., 2001; Peiffer et al., 2018; Pfeifer et al., 2002; Rodgman and Perfetti, 2013; "Tabagisme, conséquences sur la santé - Santé publique France," 2023). Au total, plus de 80 substances cancérigènes ont été identifiées dans le tabac et dans la fumée de tabac (Li and Hecht, 2022).

Ces substances ont des effets systémiques, mais elles agissent majoritairement sur le système respiratoire. En effet, elles se déposent et agissent tout le long de l'arbre respiratoire. Elles participent à de nombreux processus pathologiques comme l'inflammation chronique, le stress oxydant ou la tumorigénèse (Peiffer et al., 2018). Dans les bronches, l'exposition chronique à la fumée de tabac va engendrer des lésions importantes de l'épithélium respiratoire aboutissant à des métaplasies et à une perte des cils vibratiles. Dans les bronches, bronchioles et sacs alvéolaires, l'inflammation chronique induite va déséquilibrer l'équilibre protéolytique et antiprotéolytique présent physiologiquement dans les sécrétions pulmonaires, favoriser la destruction des parois alvéolaires, entraîner une perte d'élasticité du tissu pulmonaire et le développement d'un emphysème pouvant être associé à la BPCO. La tumorigénèse liée au tabac peut avoir diverses origines dont la fixation de composés inhalés dans la structure de l'ADN et l'induction de mutations de certains gènes comme les gènes P53, BRAF ou KRAS (Alexandrov et al., 2016; Ernst et al., 2023; Le Calvez et al., 2005; Pfeifer et al., 2002; Yoshida et al., 2020). Ces effets, non exhaustifs, montrent que l'implication du tabac est bien établie dans de nombreux processus physiopathologiques.

I.1.5 Pathologies associées à la consommation de tabac

Dès 1950, les premières études scientifiques et épidémiologiques ont alerté sur les dangers du tabac sur la santé humaine (Doll and Hill, 1950; Wynder and Graham, 1950). Depuis, sa toxicité n'est plus à débattre, celle-ci est pointée du doigt dans de nombreuses pathologies touchant plusieurs types d'organes, dont majoritairement les poumons et le système cardiovasculaire (Figure 1).

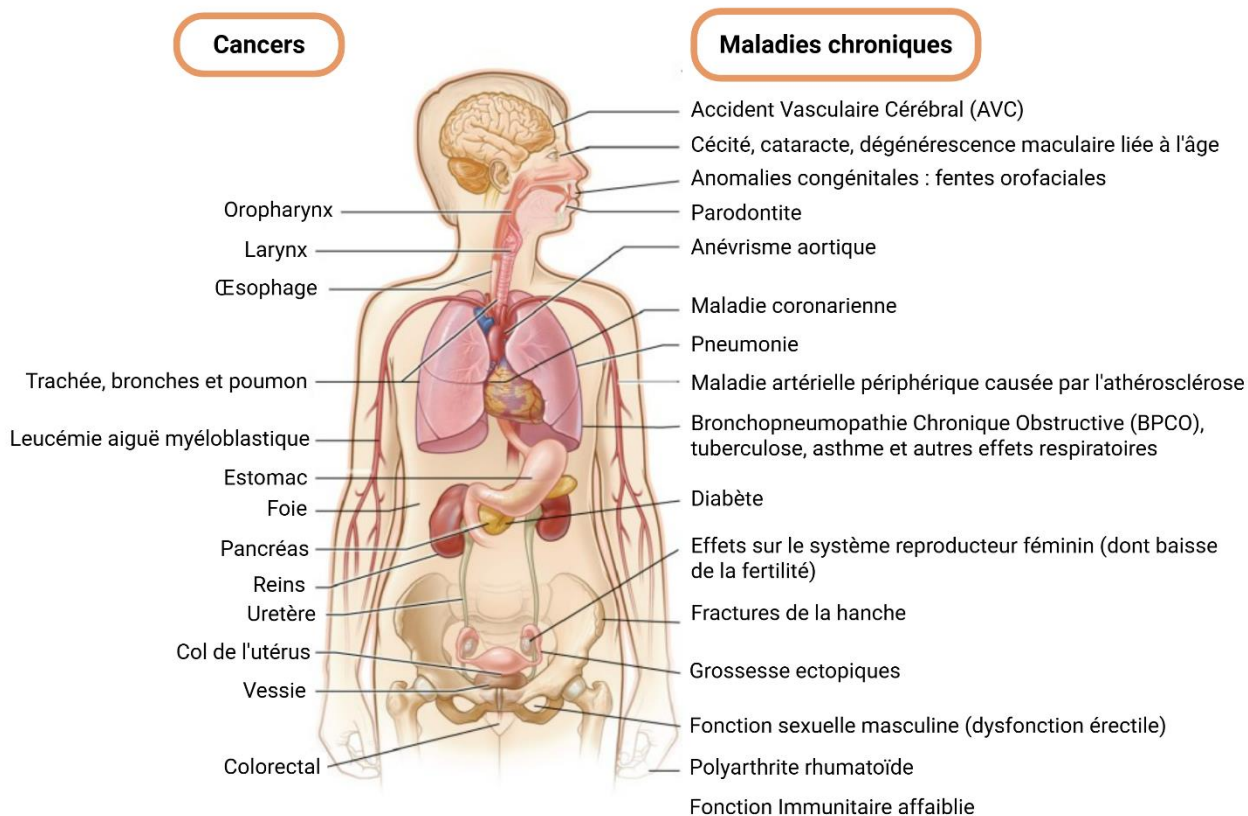


Figure 1 : Représentation schématique des pathologies chroniques et cancers pouvant être induits par le tabagisme (adapté de United States Surgeon General, 2014)

I.1.5.a. Les pathologies pulmonaires

○ **Cancer du poumon**

Le cancer du poumon est le cancer dont l'incidence et le taux de mortalité sont les plus élevés au monde, tout sexe confondu (Ferlay et al., 2024; Thandra et al., 2021a; World Health Organization, 2023c). On dénombre près de 1,8 million de décès annuels à l'échelle mondiale (Figure 2). L'incidence du cancer du poumon a nettement augmenté après la démocratisation du tabac et son industrialisation. Dans le monde occidental, on estime qu'environ 80 % des cas de cancers du poumon sont attribuables au tabac de manière directe ou indirecte. L'âge moyen de diagnostic avoisine les 70 ans, tout sexe confondu (Thandra et al., 2021b).

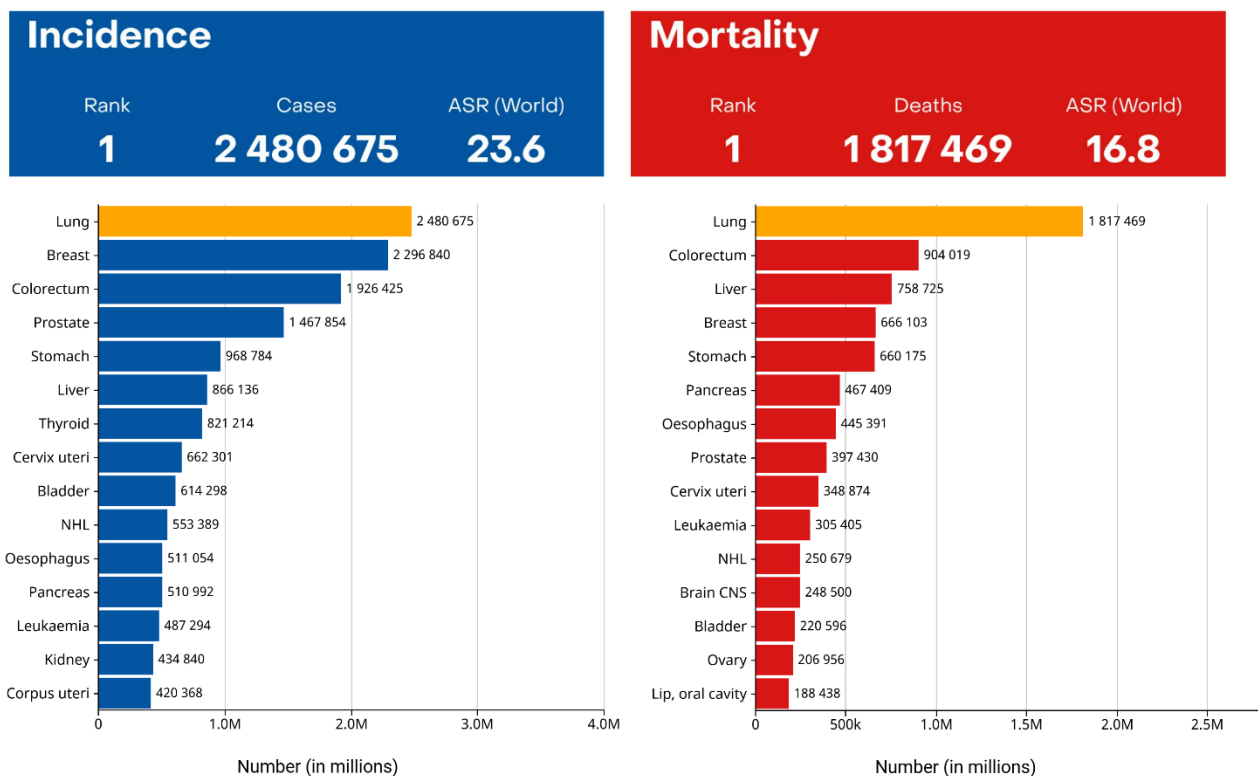


Figure 2: Incidence et mortalité des cancers du poumon dans le monde en 2020 (adapté de Ferlay et al., 2024)

Trois quarts des cancers du poumon sont diagnostiqués à un stade localement avancé ou métastatique. En effet, comme les poumons et les bronches n'ont pas d'innervation nociceptive, il n'y a pas de douleur. Les plaintes du patient ne sont donc pas spécifiques, surtout chez le fumeur. Elles n'apparaissent que lorsque des régions centrales (bronches ou vaisseaux) ou périphériques (paroi, plèvre) sont touchées, ou dans le cas du développement métastases.

Les patients touchés par un cancer du poumon, à petites cellules ou non à petites cellules ont des symptômes respiratoires peu spécifiques comme une toux persistante et évolutive, des douleurs thoraciques, de l'hémoptysie, des sensations de souffle court et sifflant. Des manifestations, plus généralistes et souvent associées à un cancer, sont également identifiées chez les patients comme la perte de poids, l'asthénie et l'apparition de ganglions en région cervicale. La découverte fortuite sur un scanner du thorax, quelle que soit son indication, est très souvent à l'origine d'un diagnostic. C'est pourquoi il est envisagé de proposer un dépistage régulier aux fumeurs ("Dépistage du cancer du poumon," 2022).

Histologiquement, il existe deux grands types de cancers pulmonaires :

- Les cancers pulmonaires non à petites cellules (CPNPC) représentent environ 85 % des cancers du poumon. Plusieurs sous-types peuvent être catégorisés selon leur origine. S'ils prennent source au niveau des cellules glandulaires, situées en région externe du poumon, il s'agit d'adénocarcinomes (sous-type majoritaire). Si leur origine provient des cellules squameuses qui tapissent les bronches, il s'agit d'un carcinome épidermoïde du poumon. Enfin, il existe également des carcinomes à grandes cellules, sarcomes et des carcinomes sarcomatoïdes pulmonaires, mais ces derniers sont beaucoup plus rares. Les CPNPC sont très fréquemment associés au tabagisme (80 %). Les carcinomes épidermoïdes sont étroitement associés à la consommation de tabac, tout comme les adénocarcinomes dont le lien avec le tabagisme est de plus en plus établi (De Groot and Munden, 2012; Yang, 2002).

- Les cancers pulmonaires à petites cellules (CPPC) représentent environ 15 % des cancers pulmonaires. Ils prennent source dans les cellules qui tapissent les bronches en région médiane de l'appareil pulmonaire et forment des tumeurs volumineuses développées à partir des voies aériennes. Les cancers pulmonaires à petites cellules les plus connus sont le carcinome à petites cellules et le carcinome mixte à petites cellules. Ce dernier renferme une tumeur mixte qui est constituée de cellules glandulaires et squameuses. Ces tumeurs sont neuroendocrines et leurs cellules ont une capacité de prolifération très élevée. La corrélation entre le tabagisme et le développement de CPPC est très importante. En effet, plus de 95% des cas concernent des fumeurs ou anciens fumeurs (Osann et al., 2000; Rodríguez-Martínez et al., 2017). Elle s'aligne sur les habitudes de consommation de ces dernières années. En effet, depuis une trentaine d'années, le nombre de femmes fumant régulièrement a fortement augmenté à l'instar de la prévalence de CPPC chez les femmes qui était très basse avant les années cinquante (Rudin et al., 2021) (Figure 3).

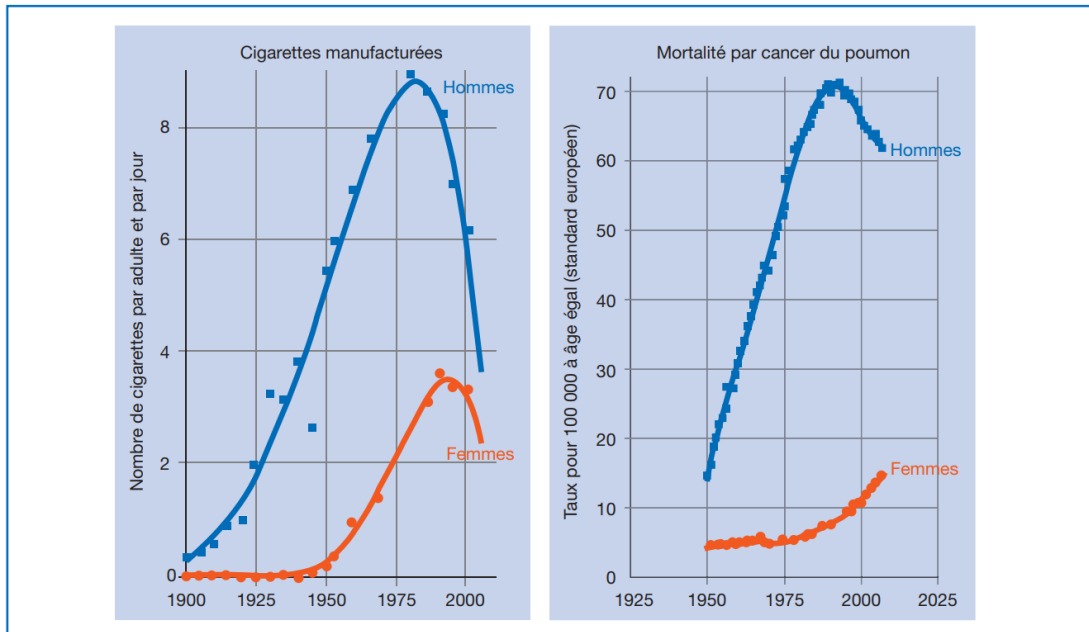


Figure 3 : Consommation moyenne de cigarettes par jour et mortalité par cancer bronchique en France en fonction du sexe (Hill, 2010)

Les traitements varient selon le type de cancer identifié, mais les principaux restent l'intervention chirurgicale, la chimiothérapie, la radiothérapie ou l'immunothérapie en cas de cancers à un stade avancé (Y. Li et al., 2023).

Dans la prise en charge du cancer du poumon, il convient également d'accompagner le patient, lorsqu'il est fumeur, dans une démarche de sevrage tabagique. Cet accompagnement est mené par plusieurs acteurs du corps médical dont les tabacologues, médecins traitants ou oncologues. L'arrêt du tabac après le diagnostic semble améliorer le pronostic des patients, notamment ceux diagnostiqués à un stade précoce du cancer du poumon ou ceux opérés (Gemine et al., 2023; Parsons et al., 2010; Sheikh et al., 2021). En complément d'un meilleur taux de survie post-diagnostic et d'un risque amoindri de progression de la maladie, le sevrage tabagique permet aux patients de limiter le risque de complications liées aux différents traitements et chirurgies, ainsi que de réduire les toxicités liées aux traitements (Peiffer et al., 2020).

Le taux de survie à 5 ans varie selon les stades du cancer, mais il peut atteindre 65 % pour les CPNPC et 30 % pour les CPPC diagnostiqués à un stade précoce et localisé. Pour un stade plus avancé, les

taux de survie à 5 ans peuvent chuter à près de 10 % (“Lung Cancer Survival Rates | 5-Year Survival Rates for Lung Cancer,” 2024).

La combinaison de l’immunothérapie et des chimiothérapies semble montrer des améliorations significatives du taux de survie des patients. En effet, une étude menée sur des patients atteints de CPNPC a démontré que l’administration de Pembrolizumab combinée à une chimiothérapie classique augmentait significativement la survie : 69,2 % contre 49,4 % (Gandhi et al., 2018)

- **La bronchopneumopathie chronique obstructive ou BPCO**

La BPCO est une pathologie respiratoire chronique évolutive et irréversible. En 2019, elle touchait près de 212 millions de personnes dans le monde, soit près de 3 % de la population mondiale (Adeloye et al., 2022; Boers et al., 2023). Cette proportion est certainement en deçà de la prévalence réelle en raison d’un nombre important de cas non diagnostiqués. Chaque année, à l’échelle mondiale, la BPCO est à l’origine de 3 millions de décès (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2024). Elle se définit par des symptômes respiratoires chroniques (toux, expectorations, dyspnée d’effort, infections respiratoires basses répétées ou trainantes) et par une obstruction permanente, progressive et irréversible des voies aériennes. Ces troubles ventilatoires obstructifs sont mis en évidence par des tests d’exploration fonctionnelle respiratoire. Sa physiopathologie repose sur une inflammation chronique des voies respiratoire, un rétrécissement du calibre des bronches et une hypersécrétion de mucus (Figure 4). D’un point de vue clinique, le patient souffre de bronchite chronique ainsi que d’une insuffisance respiratoire qui peut être plus ou moins avancée au moment du diagnostic. Il existe un score GOLD qui permet de classer l’avancement de l’obstruction bronchique dans différents stades allant de I (légère) à IV (très sévère). L’exacerbation aigüe de la BPCO accentue sa symptomatologie par une augmentation de l’inflammation chronique conduisant à un épaississement des voies respiratoires et à la limitation des échanges gazeux (Boers et al., 2023; “Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) · Inserm, La science pour la santé,” 2020; “Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO),” 2024; Guo et al., 2022; Tantucci and Modina, 2012).

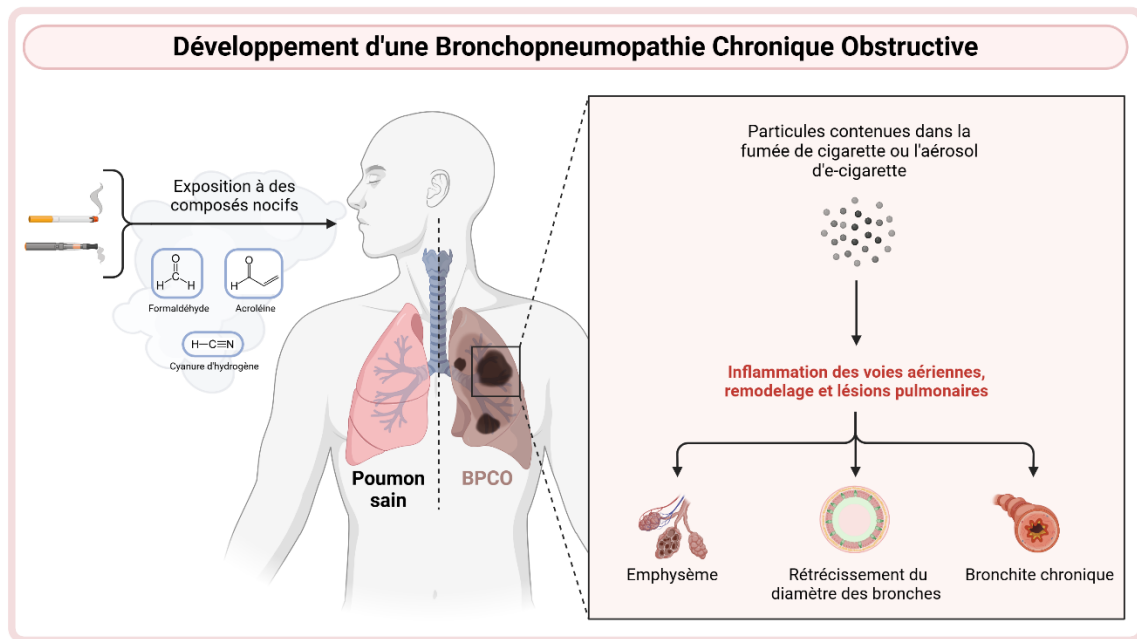


Figure 4: Schématisation du développement d'une BPCO et de ses conséquences sur l'arbre respiratoire (image créée sur Biorender.com)

Dans certains cas de BPCO, les parois des alvéoles pulmonaires se fragilisent jusqu'à être détruites et les bronchioles s'affaissent, limitant ainsi drastiquement la surface des échanges gazeux. Cette complication conduit à un emphysème pulmonaire (Figure 5).

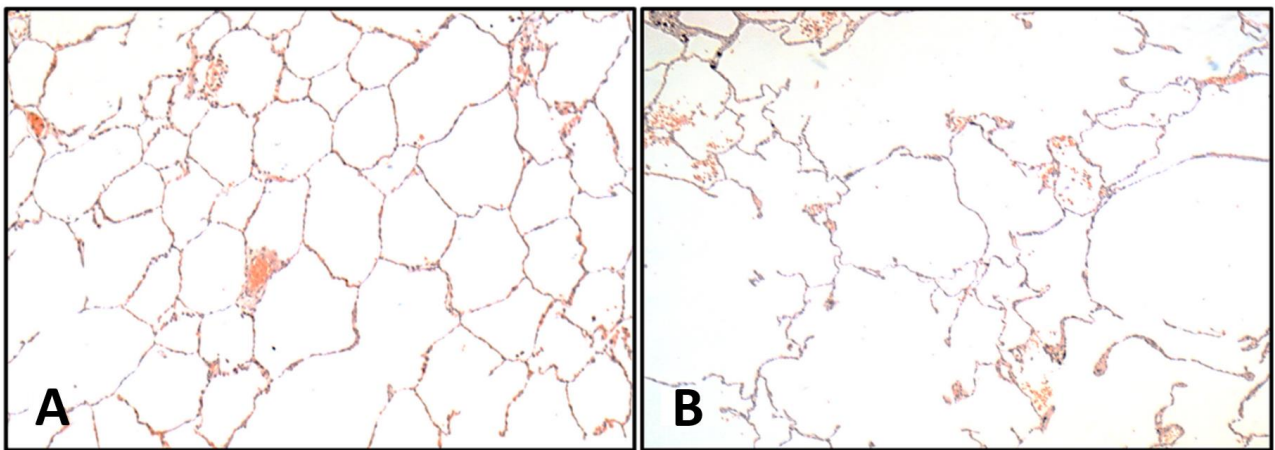


Figure 5 : Histologie pulmonaire mettant en évidence A) des sacs alvéolaires pulmonaires sains et B) un affaissement emphysémateux des sacs alvéolaires associé au tabagisme (x4) (Higham, 2019)

Les bulles emphysémateuses et la bronchite chronique augmentent l'insuffisance respiratoire globale, la dyspnée, les expectorations et le risque d'infections virales ou bactériennes.

Lorsqu'elle évolue, la BPCO est souvent associée à d'autres comorbidités ou complications comme des pathologies cardiovasculaires, des fibroses pulmonaires, des syndromes dépressifs, des cancers,

qui sont généralement la cause du décès. Aujourd'hui, il n'existe pas de traitements médicamenteux curatifs pour la BPCO.

Afin de ralentir la progression de la pathologie, il est essentiel que les patients BPCO fumeurs entament une démarche de sevrage tabagique. Cet arrêt du tabac peut être mené par des thérapies ou des traitements médicamenteux.

Les symptômes associés à la BPCO peuvent être traités par des bronchodilatateurs inhalés, en association ou non avec des corticoïdes inhalés, notamment pour les patients sujets à des exacerbations fréquentes. Lorsque les symptômes deviennent plus sévères et que l'insuffisance respiratoire devient trop importante, des traitements chirurgicaux peuvent être envisagés, comme la transplantation pulmonaire pour laquelle la BPCO représente la première indication ("Les traitements médicamenteux de la BPCO," 2020).

- **Altération du système immunitaire pulmonaire entraînant des infections respiratoires à répétition et/ou de l'asthme**

Du fait de l'exposition chronique à des irritants, la réponse immunitaire du système respiratoire est localement dérégulée. Ainsi, les fonctions « sentinelles » des macrophages alvéolaires résidents (Figure 6) sont dans certains cas inactivées, ce qui augmente le risque d'infections bactériennes et virales, et dans d'autres cas activées, ce qui provoque des crises inflammatoires asthmatiformes (Hodge et al., 2007; Lugg et al., 2022).

Si les voies aériennes du sujet sain non-fumeur sont habituellement saines, elles sont facilement colonisées chez le fumeur lorsque les défenses locales sont altérées par une BPCO, une trachéotomie ou un cancer. En effet, l'épuisement de la réponse immunitaire liée à la présence constante d'irritants pulmonaires comme les microparticules et les goudrons présents dans la fumée de cigarette se traduit par l'apparition de bronchites infectieuses à répétition. Souvent, ces infections s'installent et deviennent chroniques en raison de la disparition des cils des cellules épithéliales bronchiques qui ne participent plus à l'évacuation normale des mucus piégeant les microorganismes. Une colonisation microbienne pulmonaire peut alors se mettre en place (Laroumagne et al., 2011). Dans ces cas, le traitement d'urgence dépend des microorganismes colonisateurs, mais sur le long terme c'est

principalement l'arrêt du tabac qui permet de restaurer la clairance ciliaire et la réponse immunitaire tout en limitant les récives.

Le tabagisme est également un facteur de risque de développement de l'asthme. L'asthme est une pathologie chronique bronchique de nature inflammatoire caractérisée par une dyspnée, une gêne respiratoire qui s'accroît lors d'épisodes d'exacerbation. Près d'un quart des patients souffrant d'asthme sont fumeurs (Bellou et al., 2022). L'origine de cet asthme peut être de 2 types : soit le développement au cours du temps d'une réaction à un allergène présent dans la fumée de cigarette, soit une inflammation chronique exacerbée par la stimulation de composés de la fumée de cigarette concomitante à un système immunitaire dérégulé.

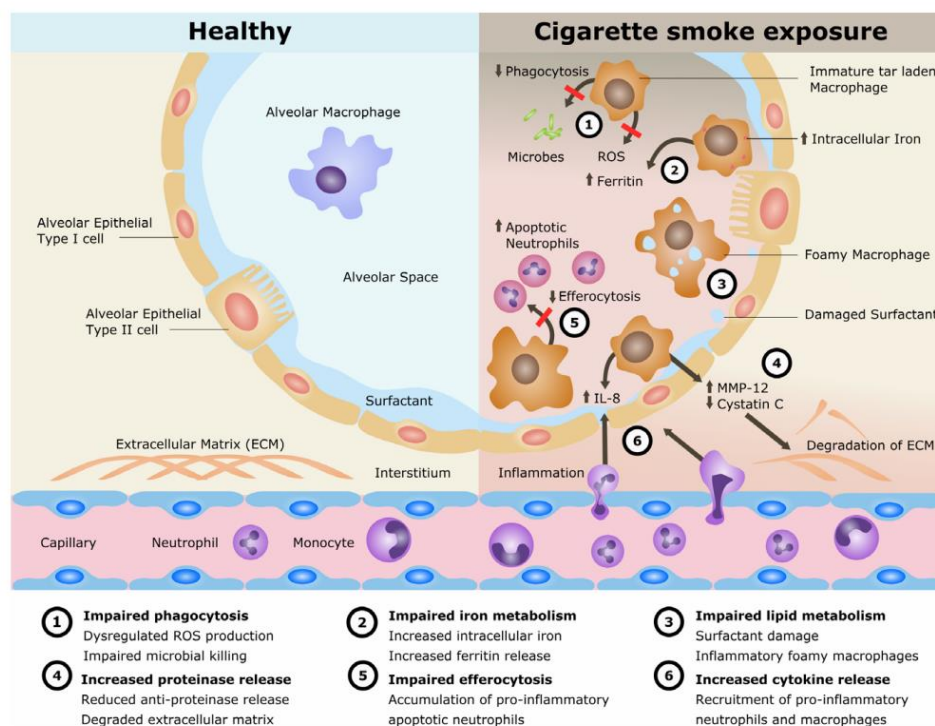


Figure 6 : Schématisation des altérations du système immunitaire alvéolaire consécutives à une exposition à la fumée de cigarette (Lugg et al., 2022)

I.1.5.b. Les pathologies non pulmonaires

Les pathologies associées au tabagisme ne se limitent pas aux pathologies pulmonaires comme les cancers du poumon ou la BPCO.

En effet, le tabagisme est associé à un cancer sur trois et reste la première cause évitable de cancer. Il favorise l'apparition d'autres cancers, classés ci-après en ordre décroissant de prévalence, tout sexe

confondu en 2022 : vessie (8^{ème} cancer le plus fréquent), col de l'utérus (9^{ème} cancer le plus fréquent), utérus (13^{ème} cancer le plus fréquent), reins (14^{ème} cancer le plus fréquent), œsophage (15^{ème} cancer le plus courant), lèvres et cavité buccale (17^{ème} cancer le plus fréquent), pancréas (20^{ème} cancer le plus fréquent) puis le larynx, nasopharynx et oropharynx (respectivement les 22^{ème}, 23^{ème} et 24^{ème} cancers les plus fréquents) ("Cancer Today," 2024; "Tabagisme, conséquences sur la santé - Santé publique France," 2023) (Figure 7). Dans le cas du cancer de la vessie, la moitié des cas est attribuable au tabagisme et il engendre chaque année environ 220 000 décès dans le monde (Ferlay et al., 2024; Freedman et al., 2011).

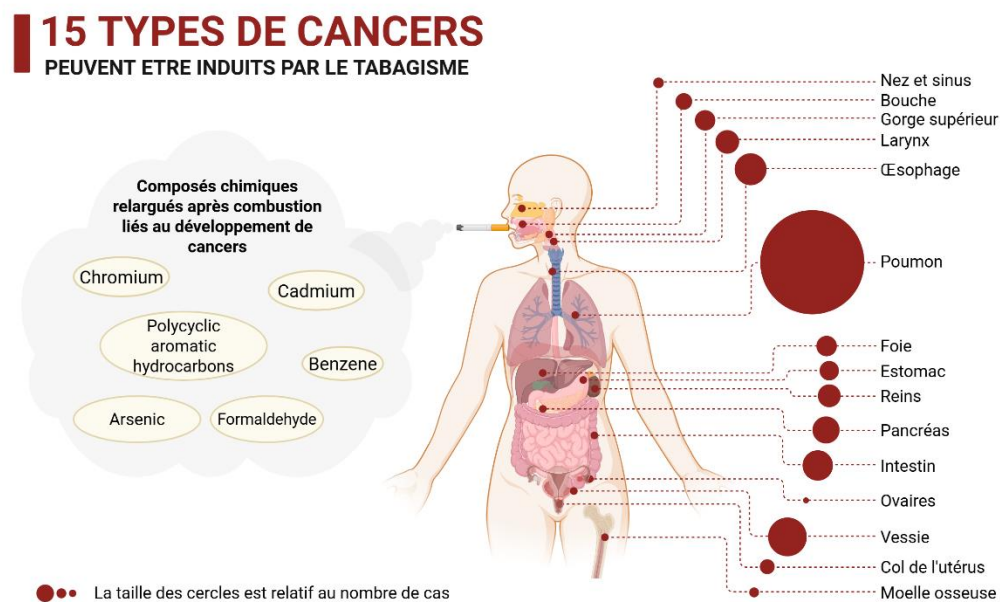


Figure 7: Représentation schématisée des différents types de cancers pouvant être induits par le tabagisme (créée sur Biorender.com)

Des pathologies cardiovasculaires peuvent également être favorisées par le tabagisme. En effet, le tabagisme augmente drastiquement le risque d'anévrismes, d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) et d'hypertension artérielle dont l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (Cassady and Reed, 2019; Peiffer et al., 2018). Le tabac est à l'origine de plusieurs mécanismes biologiques comme une inflammation chronique à bas bruit entraînant une dysfonction endothéliale. De cette dernière découle notamment une baisse de synthèse de vasodilatateurs tels que l'oxyde nitrique (NO) par l'inhibition de l'enzyme eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) (Zhang et al., 2006). En parallèle, des espèces

réactives de l'oxygène (ROS) issues de la fumée de cigarette amplifient le stress oxydant endothélial et la production de cytokines pro-inflammatoires. L'inflammation chronique des vaisseaux accentue la baisse de la biodisponibilité de NO et d'autres vasodilatateurs comme les prostacyclines (Kondo et al., 2019). Au contraire, l'endothélium lésé va produire davantage de peptide endothéline-1, vasoconstricteur majeur, par rapport à un endothélium sain (Khudhur et al., 2025). Ces différentes dysfonctions endothéliales mènent à des pathologies vasculaires graves telles que l'hypertension, l'athérosclérose ou des syndromes coronariens pouvant mener à plus long terme à des infarctus ou des AVC.

I.2. Dépendance nicotinique et sevrage tabagique

I.2.1. La nicotine : molécule clé de la dépendance tabagique

○ La nicotine : propriétés physico-chimiques

Le tabagisme est bien connu pour tous ses méfaits sur la santé, pour autant, des millions de personnes continuent de fumer de manière active (World Health Organization, 2023b). Cette consommation s'explique par le phénomène de dépendance instauré par la nicotine, aussi appelée, (S)-3-(1-méthyl-2-pyrrolidinyl)pyridine (CAS : 54-11-5). La molécule existe naturellement majoritairement sous sa forme lévogyre. C'est une amine tertiaire composée d'un cycle pyridine et d'un cycle pyrrolidine. La nicotine est une base faible dont le site de protonation est principalement l'azote pyrrolidinique et secondairement l'azote pyridinique ($pK_{a1} = 8,58$ et $pK_{a2} = 2,70$). Au-delà d'un pH de 8,58, la nicotine est hydrosoluble sous forme protonée et devient lipophile sous sa forme base à partir d'un pH supérieur à 10 (Figure 8). Ces caractéristiques lipophiles favorisent le passage de la nicotine au travers des membranes cellulaires. C'est pour cette raison que les fabricants de cigarettes, en alcalinisant le tabac, favorisent l'absorption de la nicotine au travers des différentes barrières physiologiques de l'organisme comme la barrière alvéolo-capillaire (BAC) afin d'agir au niveau du Système Nerveux Central (SNC) et plus généralement sur tout l'organisme. La nicotine peut être absorbée par inhalation, par ingestion ou par voie cutanée.

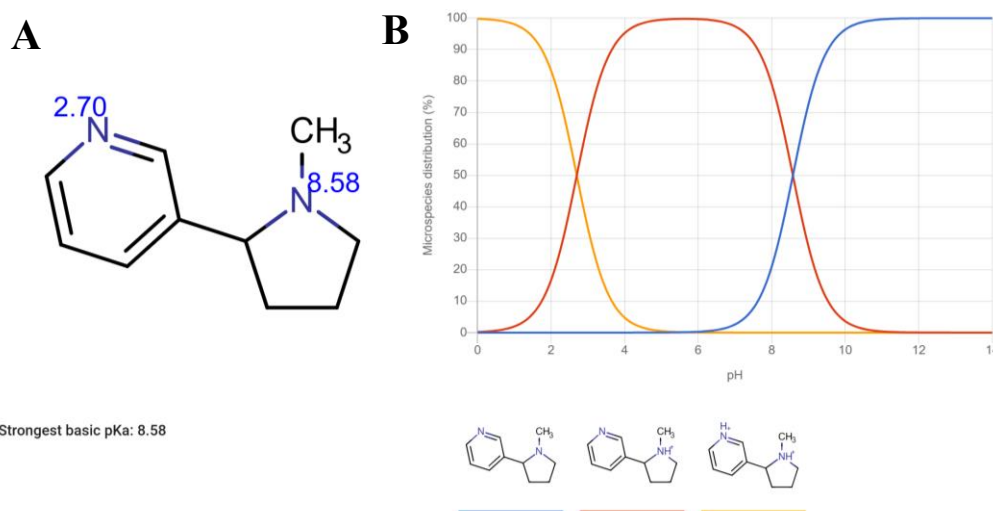


Figure 8: (A) Structure chimique de la nicotine et des atomes clés dans l'ionisation en fonction du pH. (B) Graphique de distribution des formes ionisées de nicotine selon le pH du milieu ("Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions," 2022)

○ Action pharmacologique de la nicotine

La nicotine agit comme agoniste des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs). Il existe plusieurs types de récepteurs nAChRs, tous composés de 5 sous-unités qui s'organisent pour former un canal ionique qui s'ouvre lorsque la nicotine se fixe au récepteur. Ces récepteurs sont des hétéropentamériques avec au moins une sous-unité α et une sous-unité β à une exception près : les récepteurs $\alpha 7$ (Wittenberg et al., 2020). Il existe 9 types de sous-unités α et 3 types de sous-unités β . Les sous-unités peuvent s'assembler les unes aux autres et donc composer un panel large de récepteurs nAChRs. Les récepteurs pentamériques les plus fréquemment identifiés au niveau cérébral sont les récepteurs $\alpha 7$ (composés de 5 sous-unités $\alpha 7$) et les récepteurs $\alpha 4 \beta 2$ (composés de 2 sous-unités $\alpha 4$ couplées à 3 sous-unités $\beta 2$) (Brennan et al., 2010; Le Houezec, 2003a). Ces différents récepteurs varient par leur affinité aux différents ligands, leur perméabilité aux cations (Na^+ , K^+ et Ca^{2+}), leur localisation, leur vitesse de désensibilisation (Sherafat et al., 2021). Par exemple, les récepteurs $\alpha 4 \beta 2$ ont une forte affinité pour la nicotine en comparaison des récepteurs homopentamériques $\alpha 7$ ou $\alpha 3 \beta 4$ (Improgo et al., 2010). Cependant, ces derniers se désensibilisent moins rapidement que les récepteurs $\alpha 4 \beta 2$ (Quick and Lester, 2002; Schmidt et al., 2019; Wooltorton et al., 2003).

Les récepteurs nicotiniques sont présents sur la membrane cytoplasmique de nombreuses cellules principalement au niveau de la jonction neuro-musculaire sur les cellules musculaires et au niveau des neurones du système nerveux périphérique et du SNC, mais ils sont aussi exprimés à la surface de cellules non-neurales comme les cellules immunitaires (Hiemke et al., 1996; Zoli et al., 2018). Ces multiples localisations et caractéristiques pharmacologiques expliquent les nombreux effets pharmacologiques et toxiques de la nicotine. La nicotine se fixe sur des sites à l'interface entre une sous-unité alpha, composant principal du site de liaison, et une sous-unité adjacente fournissant le site complémentaire (Taly et al., 2009). En effet, une fois le ligand fixé sur le récepteur, ce dernier change de conformation pour ouvrir le canal ionique. Le pore central laisse passer le Na^+ et le Ca^{2+} vers le cytoplasme, ce qui va enclencher une dépolarisation membranaire des neurones et permettre la libération de neurotransmetteurs. Cette entrée de cations va provoquer également des réponses cellulaires variées par l'activation de différentes voies intracellulaires via l'influx de Ca^{2+} . Dans le cas du récepteur homopentamérique $\alpha 7$, très perméable aux ions calciums, son activation peut induire la voie de signalisation JAK2-STAT3 ou AMPK-mTOR et mener à des effets anti-inflammatoires (Shao et al., 2017; Shi et al., 2016) et anti-apoptotiques (Xu et al., 2021). Cependant, une activation excessive de ces mêmes récepteurs peut rompre un équilibre et basculer vers des effets délétères comme l'induction de mort cellulaire (Li et al., 1999).

○ Actions sur le SNC

Au niveau cérébral, la nicotine agit comme un agoniste des nAChRs, notamment au niveau des neurones dopaminergiques. Les neurones dopaminergiques situés dans l'aire tegmentale ventrale (VTA) ont leurs nAChRs exprimés en région postsynaptique. La nicotine s'y fixe et provoque la libération de dopamine vers le noyau accumbens via le système mésolimbique (Figure 9). Cette voie dopaminergique contribue au système de récompense et vient peu à peu consolider la conduite addictive et la dépendance au tabac (Di Chiara, 2000; X. Li et al., 2023; Sherafat et al., 2021; Valentine and Sofuoglu, 2018; Wittenberg et al., 2020; Zoli et al., 2015).

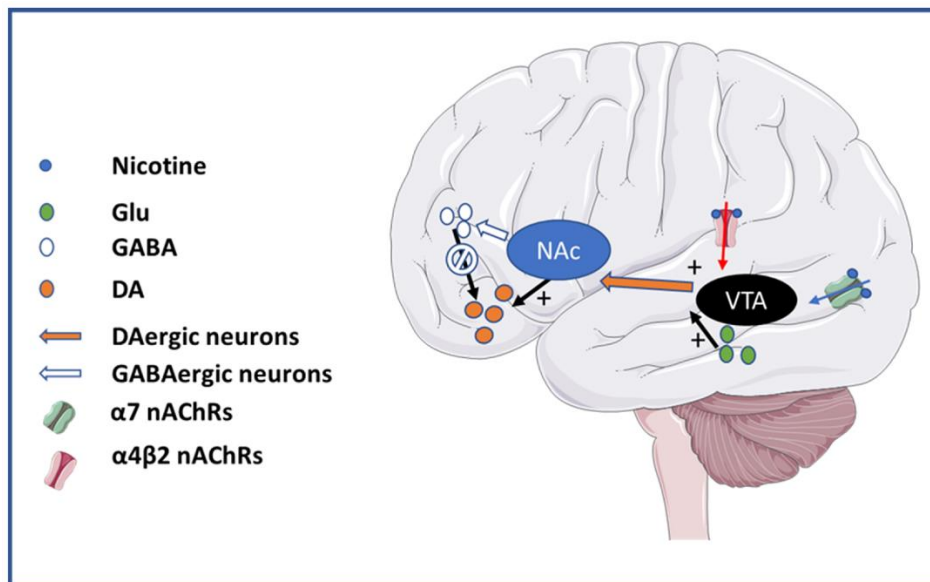


Figure 9 : Schématisation des noyaux et voies impliquées, en région cérébrale, dans l'addiction induite par la nicotine (Vallés and Barrantes, 2023)

Le pic plasmatique et intracérébral de nicotine contribue à l'activation des neurones dopaminergiques du VTA, ce qui entraîne la libération d'un certain nombre de neurotransmetteurs dont la dopamine. Cette dernière est à l'origine de la sensation de plaisir et de la modulation de l'humeur. Les nAChRs activés induisent une plasticité neuronale et un conditionnement comportemental ou apprentissage se traduisant par un besoin accru en nicotine. Ces récepteurs vont se désensibiliser en raison d'activations répétées par la nicotine. Cette désensibilisation mène à une tolérance et une diminution de la libération de dopamine et des autres neurotransmetteurs à l'origine du plaisir (Figure 10). C'est ce phénomène qui régit l'apparition des différents symptômes du sevrage tabagique dont l'irritabilité, les troubles du sommeil, l'anxiété ou encore les syndromes dépressifs légers (Benowitz, 2010; McLaughlin et al., 2015).

En réalité, certains individus peinent plus que d'autres à arrêter le tabac. En effet, la dépendance peut être plus importante chez certains fumeurs. Ces derniers présentent des symptômes de sevrage tabagique plus intenses comparé à d'autres fumeurs. La dépendance au tabac peut être évaluée par des auto-questionnaires comme le Test de Fagerström dont le score final peut aller de 0 (dépendance très faible) à 10 (dépendance très forte). Ces différences peuvent être expliquées par des facteurs génétiques. Il existe une variabilité génétique selon les individus, notamment au niveau des gènes

CHRNA5, CHRNA3 et CHRNA4 qui codent respectivement pour les sous-unités $\alpha 5$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ des nAChRs. Des polymorphismes nucléotidiques ont été identifiés et associés à une dépendance nicotinique accrue dont le Single Nucleotide Polymorphism (SNP) rs16969968 (McLaughlin et al., 2015; Pandey et al., 2017; Ramoz and Gorwood, 2015). Certains polymorphismes ou mutations génétiques peuvent également interférer avec le métabolisme de la nicotine. En effet, celle-ci est métabolisée majoritairement par le cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) en cotinine. Il peut exister des différences interindividuelles, résultantes de variations polymorphiques du gène CYP2A6. Certains individus expriment une enzyme dont l'activité métabolique est plus importante et voient donc leur concentration en nicotine baisser plus rapidement. Cette activité métabolique élevée a été corrélée à une consommation plus importante de tabac et à une dépendance à la nicotine plus prononcée (Butler et al., 2021; Kubota et al., 2006).

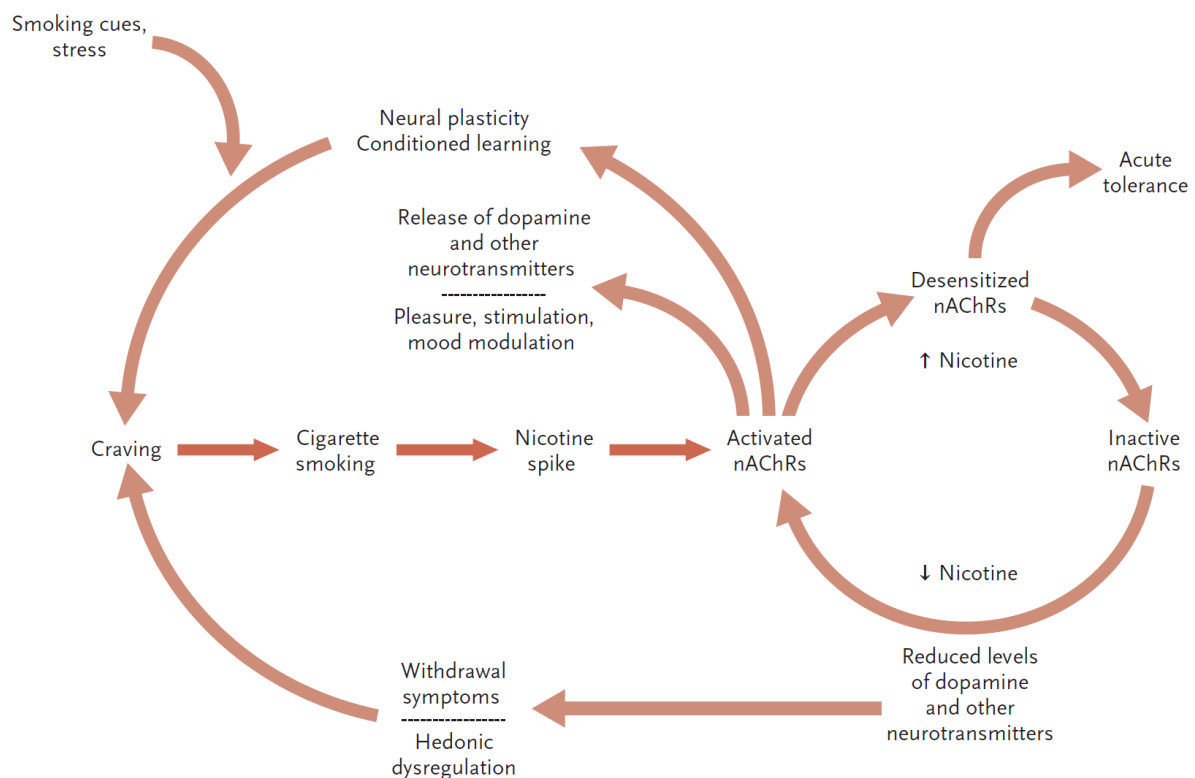


Figure 10: Schématisation du mécanisme de dépendance lié à la nicotine (Benowitz, 2010)

La conséquence de ces mécanismes est une très grande difficulté à arrêter de fumer, même pour un patient atteint d'une pathologie en lien avec un tabagisme chronique. Ainsi, le patient peut être

conscient que le tabagisme est la cause principale de sa maladie et que l'absence d'arrêt est synonyme d'une évolution défavorable de sa pathologie, sans que cela ne se traduise par un arrêt du tabac. C'est la raison pour laquelle, il est nécessaire d'apporter à ces patients des outils d'aide au sevrage tabagique.

I.2.2. Les méthodes de sevrage tabagique

La manière qui semble la plus adaptée pour lutter contre les morbidités associées au tabagisme consiste à diminuer voire arrêter la consommation de tabac. En 2020 en France, 29,9 % des fumeurs quotidiens déclaraient avoir essayé d'arrêter de fumer au cours des 12 derniers mois (Pasquereau, 2021). Cependant, le pourcentage de réussite de l'arrêt du tabagisme sans aide ne dépasse pas 20% dans la majorité des articles (Zhu et al., 2000) (Figure 11). L'accompagnement par un tabacologue est essentielle pour choisir la méthode la plus adaptée parmi les différents outils contribuant au sevrage tabagique. Si le profil du sujet ne permet pas un arrêt simple du tabac, les traitements de première intention s'orientent généralement vers des thérapies de remplacement de la nicotine puis en seconde intention vers des traitements pharmacologiques (Barua et al., 2018). Parallèlement, un suivi psychologique ainsi que l'accompagnement d'un médecin tabacologue est nécessaire pour mener à bien le sevrage tabagique et éviter les rechutes (Lindson et al., 2019; Zwar, 2020).

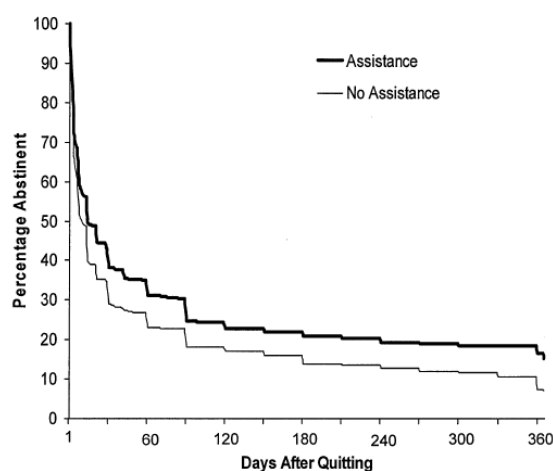


Figure 11 : Impact de l'accompagnement au sevrage tabagique sur les pourcentages d'abstinence en fonction du temps (Zhu et al., 2000)

○ Les traitements de première intention : substitutifs de la nicotine

Ces traitements visent à fournir au fumeur la concentration en nicotine nécessaire pour soulager les symptômes liés au sevrage tabagique tout en maintenant l'arrêt de consommation du tabac. Ils existent sous différentes formes galéniques : dispositifs transdermiques (patchs de nicotine), gommes à mâcher, comprimés à sucer, comprimés sublinguaux, pastilles, inhalateurs ou sprays buccaux. Ces derniers peuvent prévenir certains symptômes du sevrage tels que l'irritabilité ou les troubles du sommeil. La pharmacocinétique de ces produits est très différente en fonction de leur galénique (Figure 12).

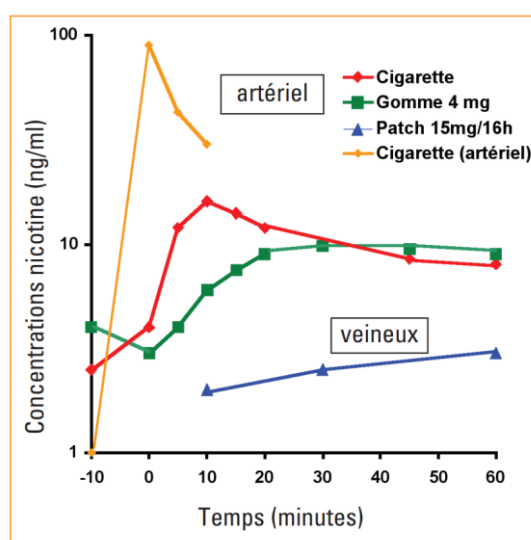


Figure 12 : Comparaison dans le temps des concentrations (log10) plasmatiques artérielles après consommation d'une cigarette (courbe orange) et des concentrations veineuses après application d'un patch de nicotine (courbe bleue), administration d'une gomme nicotine (courbe verte) ou consommation d'une cigarette (courbe rouge) (Le Houezec, 2003b)

En conséquence, les concentrations en nicotine de ces dispositifs varient mais doivent être adaptées aux besoins du fumeur pour éviter un sous- ou un surdosage pouvant être, respectivement, à l'origine d'un syndrome de manque ou d'une intoxication ("Les médicaments du sevrage tabagique," 2024).

○ Les traitements pharmacologiques de deuxième intention

Lorsque les substituts nicotiniques ne sont pas suffisants pour atteindre un sevrage tabagique complet, d'autres médicaments peuvent être administrés, en deuxième intention ou en association, pour échapper à l'apparition d'un syndrome de manque. Les deux principaux médicaments prescrits dans ce cadre du sevrage tabagique sont la varénicline (CHAMPIX®) et le bupropion (ZYBAN®). La varénicline, longtemps non disponible sur le marché en raison d'une contamination au nitroso-

varénicline, agit comme un agoniste partiel du nAChRs $\alpha 4\beta 2$ et agoniste entier du $\alpha 7$ nAChRs (Cahill et al., 2016; Mihalak et al., 2006). Le bupropion, lui, intervient sur les neurotransmetteurs clés du circuit de dépendance en inhibant la recapture de la noradrénaline et de dopamine (“Bupropion,” 2024).

Ces traitements doivent être prescrits par un professionnel de santé et ne doivent être administrés qu’en cas d’échec des traitements de première intention en raison de leurs nombreux effets secondaires.

- **L’accompagnement psychologique et motivationnel**

De nombreux articles (Mottillo et al., 2009) ont montré qu’un accompagnement psychologique augmente le pourcentage de réussite de l’arrêt du tabagisme. C’est pourquoi, il est vivement conseillé aux fumeurs d’associer un accompagnement psychologique à la prise de substituts nicotiques, comme par exemple, des thérapies comportementales et cognitives ou les entretiens motivationnels. En effet, ces derniers renforcent les autres solutions mises à disposition du fumeur pour lutter efficacement contre la dépendance au tabac. Depuis quelques années, un autre type de thérapie semble se démocratiser : l’hypnothérapie. Cette dernière se base sur un état de conscience modifié rendant le patient plus enclin à certaines suggestions qui lui sont faites, dont l’arrêt du tabac. Ce type de thérapie, seule ou en association avec d’autres traitements psychologiques, semble montrer une certaine efficacité, mais davantage d’études sur le sujet semblent nécessaires (Barnes et al., 2019; Ekanayake and Elkins, 2025).

En raison des forts taux de rechute, ces différentes solutions proposées seules aux fumeurs souhaitant arrêter semblent insuffisantes à un arrêt complet du tabac sur le long terme. C’est la raison pour laquelle de nouveaux produits ont vu le jour sur le marché des produits connexes du tabac.

I.3. Les ENDS : aide au sevrage tabagique ou une nouvelle problématique de santé publique ?

Depuis les années 2010, de nouveaux produits délivrant de la nicotine sont arrivés sur le marché. On les appelle ENDS (Electronic Nicotine Delivery Systems). Ces produits connexes du tabac regroupent

notamment les e-cigarettes, e-pipes, e-cigares, vapoteuses, vaporisateurs stylo , puffs.... Le point commun de ces dispositifs est qu'ils renferment tous un e-liquide contenant, classiquement, un mélange de nicotine, glycérine végétale (VG), propylène glycol (PG) et arômes. Le principe des ENDS consiste à chauffer cet e-liquide grâce à une résistance, alimentée par une batterie, afin d'aérosoliser l'e-liquide qui sera ainsi inhalé (FDA, 2025).

L'arrivée de l'e-cigarette sur le marché a été initialement justifiée et mise en avant comme un outil efficace de sevrage tabagique sur le long terme. En effet, les cigarettes électroniques visaient, initialement, des fumeurs souhaitant arrêter durablement le tabac. Cependant, les autorités de santé restent beaucoup plus prudentes quant à leur réelle efficacité et sécurité pour le consommateur. L'OMS déclarait en 2023 que les ENDS peuvent représenter un danger pour la santé de leurs utilisateurs, mais également qu'ils constituent une source supplémentaire d'addiction à la nicotine, notamment auprès des plus jeunes et des mineurs par un effet passerelle. Et pour cause en 2023, à l'échelle mondiale, près de 55 % des pays n'avaient à ce jour pas interdit la vente d'ENDS et d'e-liquides aux mineurs (World Health Organization, 2023d). L'autre difficulté majeure liée à ces dispositifs est qu'il n'existe pas de normes mondiales et de standardisation de ces ENDS. Les différents états peinent donc à contrôler la diversité des produits disponibles sur le marché, d'où la nécessité selon l'OMS d'établir des mesures réglementaires strictes sur ces nouveaux produits (World Health Organization, 2023d).

Pour la suite de ce manuscrit, seules les cigarettes électroniques seront décrites.

I.3.1. Historique

Dans les années soixante, les prémices de l'ère « cigarette électronique » s'amorce. En effet, en 1965, un ingénieur américain, Herbert A. Gilbert, dépose un brevet pour un modèle de cigarette sans tabac ni fumée dont le fonctionnement est basé sur le chauffage d'un air humide et aromatisé (Gilbert, 1965; Health, 2016). Ce brevet n'a cependant pas abouti à la commercialisation d'un modèle.

Une quarantaine d'années plus tard, en 2003, un pharmacien et ingénieur chinois nommé Hon Lik invente un modèle de cigarette à atomisation électronique et dépose un brevet (Hon, 2004). Le

dispositif a vu le jour peu après sous le nom « Ruyan » et a été commercialisé en Chine. Dans les années 2010, la cigarette électronique est définitivement introduite à l'échelle internationale et plus largement démocratisée aux Etats-Unis et en Europe. En France, le marché de la cigarette électronique a atteint une croissance très importante, pour représenter, en 2023, près d'1,5 milliard d'euros.

I.3.2. Utilisation et statut légal de la cigarette électronique

En 2022, la cigarette électronique a été expérimentée par plus de 40 % des adultes (18-75 ans) en France et par près de 60 % des jeunes de 17 ans (Observatoire français des drogues et des tendances addictives (OFDT), 2025). Ces statistiques démontrent bien la démocratisation de ce type de dispositifs en France, notamment auprès des plus jeunes. En usage quotidien, la prévalence du vapotage a atteint 5,5 % en 2022 chez les adultes et 6,2 % chez les jeunes de 17 ans (Figure 13) (Observatoire français des drogues et des tendances addictives (OFDT), 2025; Pasquereau et al., 2023).

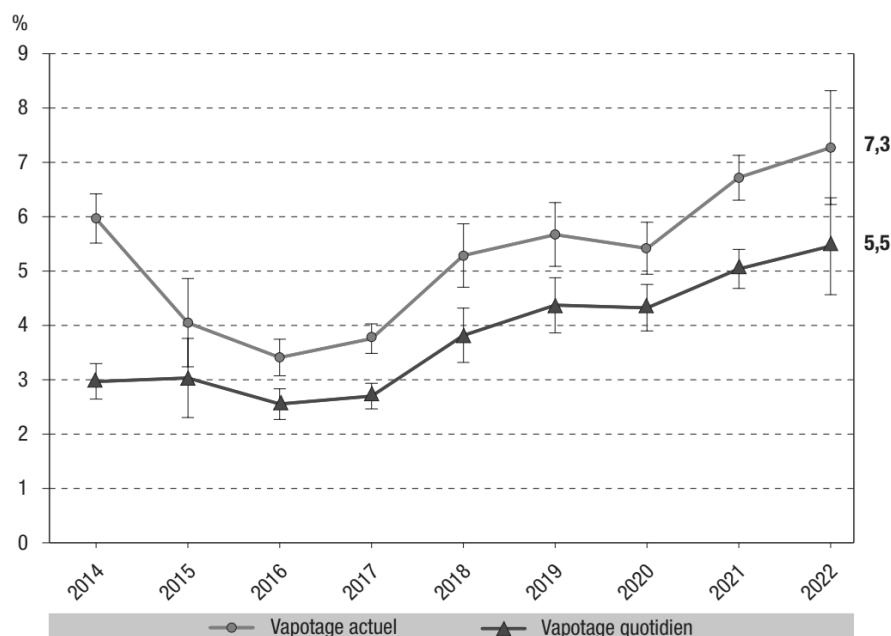


Figure 13 : Prévalence du vapotage actuel et du vapotage quotidien parmi les 18-75 ans en France métropolitaine entre 2014 et 2022. Le vapotage actuel regroupe les utilisateurs occasionnels et quotidiens. (Pasquereau et al., 2023)

Les utilisateurs d'e-cigarettes peuvent être scindés en deux grandes catégories : ceux ayant entamé une démarche de sevrage tabagique en utilisant les ENDS comme outil de sevrage et ceux attirés par ce type de dispositifs pour un aspect récréatif et « tendance », notamment par le biais des nombreux arômes et modèles disponibles.

Dans les deux cas, les cigarettes électroniques ont émergé sur le marché sans réel statut légal et sans normes compte tenu de leur nouveauté et de leur rapide de diffusion.

Dans l'Union Européenne (UE), le statut réglementaire de la cigarette électronique et son cadre légal ont été établis et harmonisés dans l'article 20 de la Directive 2014/40/UE du Parlement Européen et du Conseil du 3 avril 2014. Cette Directive est relative à la « fabrication, présentation et vente des produits du tabac et produits connexes » et remplace la précédente Directive 2001/37/CE datant de 2001, soit, peu avant l'arrivée des cigarettes électroniques sur le marché (Parlement Européen et Conseil, 2014).

L'article 20 se focalise sur les cigarettes électroniques et les flacons de recharge contenant les e-liquides. Ces derniers sont soumis à différents types de restrictions dont certaines sont énoncées ci-après. Elles concernent, entre autres, la composition et sécurité des dispositifs. En effet, la directive exige une concentration maximale en nicotine, dans les e-liquides, de 20 mg/mL ainsi que l'absence de certains types d'additifs. Un volume maximal de 10 mL pour les flacons et 2 mL pour les réservoirs des cigarettes électroniques est également exigé. Les autorités de santé doivent recevoir une notification 6 mois avant la mise sur le marché d'un produit, détaillant entre autres la composition du e-liquide, les données toxicologiques de ces ingrédients (toxicités aiguës et chroniques, seuils d'exposition, liste des produits de dégradation...), émissions du produit fini après chauffage et les données de concentration et d'inhalation de nicotine dans des conditions de consommation classiques. Il existe également des restrictions sur la publicité et l'étiquetage. En effet, la publicité des cigarettes électroniques est très restreinte et se limite à de la publicité dans les points de ventes physiques sous certaines conditions. Par exemple, il est interdit aux industriels d'utiliser un marketing ciblant spécifiquement les jeunes ou les non-fumeurs pour les attirer vers la consommation de tels produits.

L'étiquetage, lui, est soumis à une obligation d'afficher sur le produit un avertissement sur la nicotine et la forte dépendance qui lui est associée ainsi que la mention des ingrédients du liquide de vapotage et leur proportion (Parlement Européen et Conseil, 2014).

La directive exige également aux états membres de l'UE d'assurer une veille sanitaire à propos des cigarettes électroniques et d'évaluer le risque de ces produits comme une porte d'entrée vers le tabagisme. La liste des restrictions n'est pas exhaustive, mais elle traduit bien la volonté de l'UE de contrôler davantage l'utilisation de ce type de dispositifs.

En France, certains lieux sont soumis à une interdiction de vapoter en plus de l'interdiction de fumer déjà mise en application depuis 2007 dans les lieux publics fermés dont les établissements scolaires et entreprises. A l'heure actuelle, il est interdit d'utiliser une cigarette électronique, en autres, dans les établissements scolaires et structures d'accueil de mineurs, lieux collectifs de travail sans accueil du public ("Interdiction de vapoter (cigarette électronique)," 2025). Très récemment, la France a adopté une loi (Loi n°2025-175 du 24 février 2025) visant à interdire les dispositifs électroniques de vapotage à usage unique appelés « Puffs » (Lombard and Neuder, 2025).

A l'échelle mondiale, le statut légal et réglementaire de la cigarette électronique varie selon le pays considéré. Certains ont une politique plus stricte vis-à-vis de ces dispositifs de vapotage. En effet, des états comme le Mexique, la Thaïlande ou l'Argentine ont strictement interdit la vente d'e-cigarettes (Kennedy et al., 2017; World Health Organization, 2023b).

I.3.3. Composés clés d'une cigarette électronique

Une cigarette électronique peut être décomposée en 3 grands éléments : une batterie, une résistance et un réservoir contenant l'e-liquide (Figure 14).

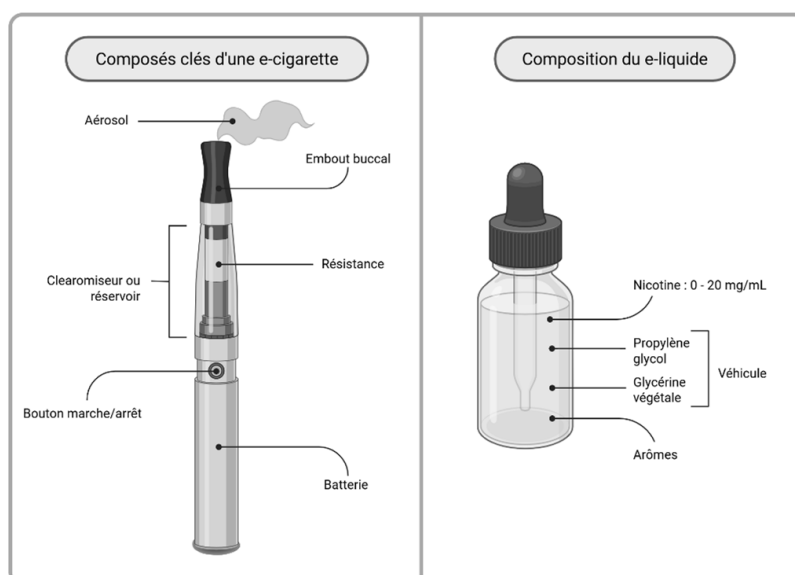


Figure 14 : Représentation schématique d'une cigarette électronique et de la composition d'un e-liquide (créée sur Biorender.com)

Le type de résistance peut varier selon les choix du consommateur. Il en existe différents types variant selon leur structure : maille plate (résistance « Mesh ») ou fil résistif enroulé (résistance « Coil »). La résistance permet un chauffage plus ou moins homogène de la mèche (coton ou silice) imbibée d'e-liquide puis l'aérosolisation de ce dernier.

Le chauffage de ces résistances et leur contact étroit avec l'e-liquide expose l'utilisateur à différents types de métaux si la qualité de la résistance n'est satisfaisante ou si elle n'est pas changée régulièrement par l'utilisateur. En effet, parmi un nombre important d'e-cigarettes et résistances présentes sur le marché, près d'une dizaine de métaux différents ont pu être fréquemment identifiés dans l'aérosol : nickel, chrome, cuivre, étain, aluminium, silicium, zinc. D'autres métaux ont également pu être retrouvés, mais, en moindre mesure dans certains dispositifs comme le fer, le plomb ou le titane (Williams et al., 2019). En effet, ce sont principalement le nickel, l'argent et le zinc qui sont retrouvés dans les émissions d'e-cigarette et ces métaux lourds proviennent très probablement des éléments métalliques de la résistance (Saffari et al., 2014; Williams et al., 2019). Ces métaux peuvent jouer un rôle non négligeable dans la toxicité pulmonaire et systémique de ces dispositifs.

I.3.4. Les différents types de cigarettes électroniques

Les cigarettes électroniques se sont déclinées en 4 générations :

- **Première génération : Cigalike**

La première génération d'e-cigarette, appelée « Cigalike », a la particularité de ressembler très fortement à une cigarette classique (Figure 15). Elles s'adressaient aux fumeurs souhaitant arrêter le tabac tout en gardant une expérience la plus similaire possible au tabagisme classique. Elles sont majoritairement jetables, même s'il existe certains modèles rechargeables. Il s'agit d'un système fermé. En effet, l'utilisateur utilise un dispositif dont la cartouche/réservoir d'e-liquide est déjà prérempli(e) et scellé(e) par le fabricant. En outre, les paramètres de voltage et puissance sont fixés sur ce type d'appareil, l'utilisateur ne peut donc pas les faire varier selon ses préférences.

- **Deuxième génération : Vape pen**

La seconde génération d'e-cigarette regroupe les dispositifs dont la forme se rapproche d'un stylo, elles sont classiquement dénommées « Vape Pen ». Leur apparence est modifiée par rapport à la première génération puisqu'elles adoptent une forme plus imposante et introduisent les « clearomiseurs » (Figure 15). Ces réservoirs, souvent transparents, stockent l'e-liquide choisi par l'utilisateur. Il s'agit d'un système ouvert dans la majorité des cas, mais il existe des modèles dont les réservoirs sont préremplis et scellés par les industriels. Ces dispositifs permettent une plus grande capacité de puissance et une plus grande capacité de volume d'e-liquide. Cette génération introduit davantage de diversité dans les e-liquides, notamment en termes d'arômes. Les e-cigarettes de deuxième génération permettent aux utilisateurs de faire varier certains paramètres comme le voltage appliqué par la résistance. Ces systèmes sont considérés comme plus efficaces pour délivrer la nicotine que la première génération, mais leur efficacité en termes de puissance reste cependant assez faible (Rüther et al., 2018).

○ **Troisième génération : Tank**

Les cigarettes électroniques de 3^e génération sont des dispositifs surnommés « Tank » en raison de leur taille imposante (Figure 15). Ils sont dotés d'une batterie plus performante permettant une modulation des différents paramètres plus importante, dont la puissance et le voltage. Le système est également ouvert et il permet à l'utilisateur d'utiliser l'e-liquide et le clearomiseur de son choix (contenant la résistance). Par sa puissance plus importante, l'e-cigarette de 3^e génération délivre une quantité de nicotine plus proche des concentrations de nicotine retrouvées lors de l'inhalation de fumée de cigarette classique. Avec cette génération de e-cigarette, le consommateur a une délivrance de nicotine beaucoup plus adaptable à ses besoins qu'avec toutes les précédentes générations. Le risque majeur ici est l'apparition d'une addiction à la nicotine plus précoce (Hajek et al., 2017).

○ **Quatrième génération : Pod**

La quatrième génération de cigarette électronique regroupe les dispositifs de type « pod ». Ces derniers sont des systèmes discrets, peu encombrants et régulièrement assimilés à la forme d'une clé USB (Figure 15). Par leur gabarit et leur style épuré, ils attirent particulièrement les jeunes. Ces systèmes sont des systèmes ouverts ou fermés selon les modèles. Les utilisateurs peuvent donc opter pour des « pods » préremplis ou à remplir soi-même. La particularité de ces e-cigarettes est qu'elles ont démocratisé l'utilisation de sels de nicotine à la place de la nicotine dite « free-base ». Les sels de nicotine correspondent à une forme protonée de la nicotine. Cette forme peut être obtenue par ajout d'acides organiques dans une solution de nicotine « free-base ». Il existe une dizaine d'acides organiques utilisés pour former des sels de nicotine : l'acide benzoïque, glycolique, lactique, lévulinique, pyruvique, fumarique, succinique, salicylique, tartrique, citrique et malique (Harvanko et al., 2020; Talhout and Leventhal, 2024; Tran et al., 2024). Ces sels de nicotine sont appréciés du grand public car ils paraissent moins irritants et plus doux pour les voies aériennes que la nicotine « free-base » (Christen et al., 2024; Talhout and Leventhal, 2024). Cependant, ils permettent une meilleure absorption de la nicotine au niveau pulmonaire et donc un pic de concentration plasmatique artérielle puis veineuse plus élevée qu'avec de la nicotine free-base (Gholap et al., 2020; Talhout and

Leventhal, 2024; Wall et al., 2022). Il semble indispensable de rester prudents face à l'attractivité de ce type de dispositifs vis-à-vis des plus jeunes, d'autant plus si ces « pods » exposent l'utilisateur à des pics de concentration plus importants de nicotine et donc à un risque de dépendance augmenté.

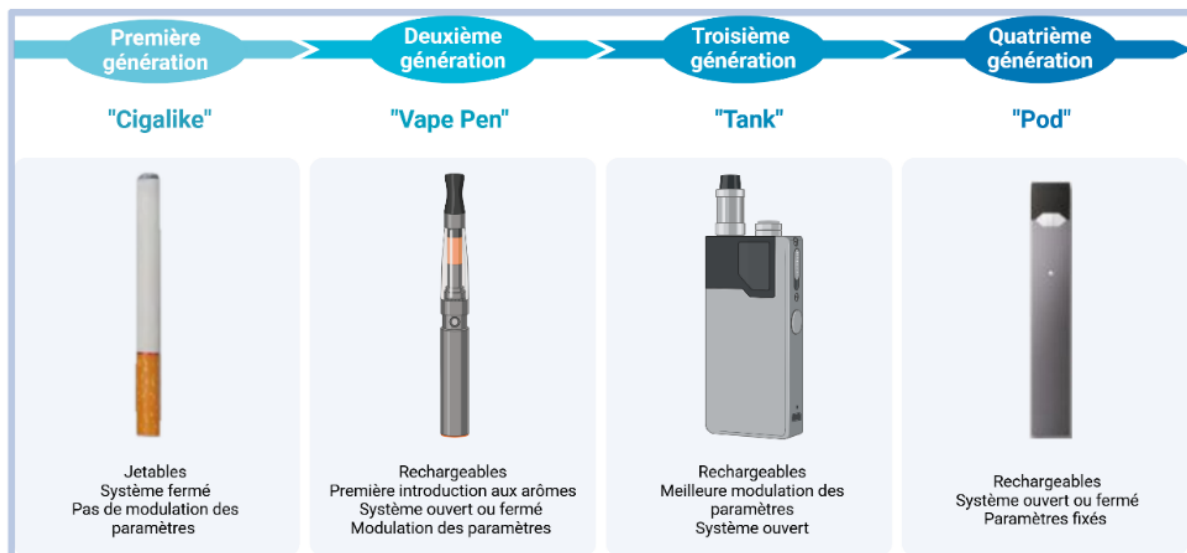


Figure 15: Représentation schématique des 4 différentes générations d'e-cigarettes (créée sur Biorender.com)

I.3.5. Composition des e-liquides

On retrouve dans les e-liquides 4 principaux éléments : le propylène glycol (PG), la glycérine végétale (VG), la nicotine et des arômes.

Le PG et la VG servent de véhicule à la nicotine et aux arômes et permettent d'aérosoliser le mélange à des températures variant de 150°C à 300°C selon les préférences du consommateur et les capacités de puissance du dispositif utilisé.

○ Le propylène glycol

Le propylène glycol ou propane-1,2-diol (numéro CAS 57-55-6) est un liquide incolore doté d'une certaine viscosité. Il est miscible à l'eau et est notamment utilisé pour ses propriétés hygroscopiques. En effet, le PG peut être utilisé pour maintenir un certain degré d'humidité dans des produits tels que des denrées alimentaires, des produits cosmétiques ou des médicaments pour des formulations orales, injectables ou topiques. Dans le cas de l'industrie agroalimentaire, il peut servir de solvant aux

colorants et arômes alimentaires (E1520) et servir d'exhausteur de goût, humectant et émulsifiant (National Center for Biotechnology Information, 2025a).

Le PG est largement utilisé depuis quelques années comme solvant et véhicule pour la nicotine et les arômes contenus dans les liquides de cigarette électronique. Il sert d'exhausteur de goût et d'arômes et participe à la génération d'un aérosol semblable à la fumée de cigarette (Institut National de Recherche et de Sécurité, 2020).

Le PG est absorbé au niveau du système digestif avant d'être métabolisé, par oxydation dans le foie, en acide lactique et acide pyruvique (Figure 16). La demi-vie du PG avoisine les 2 heures et il faut compter environ 10 heures pour qu'il soit totalement éliminé du système sanguin.

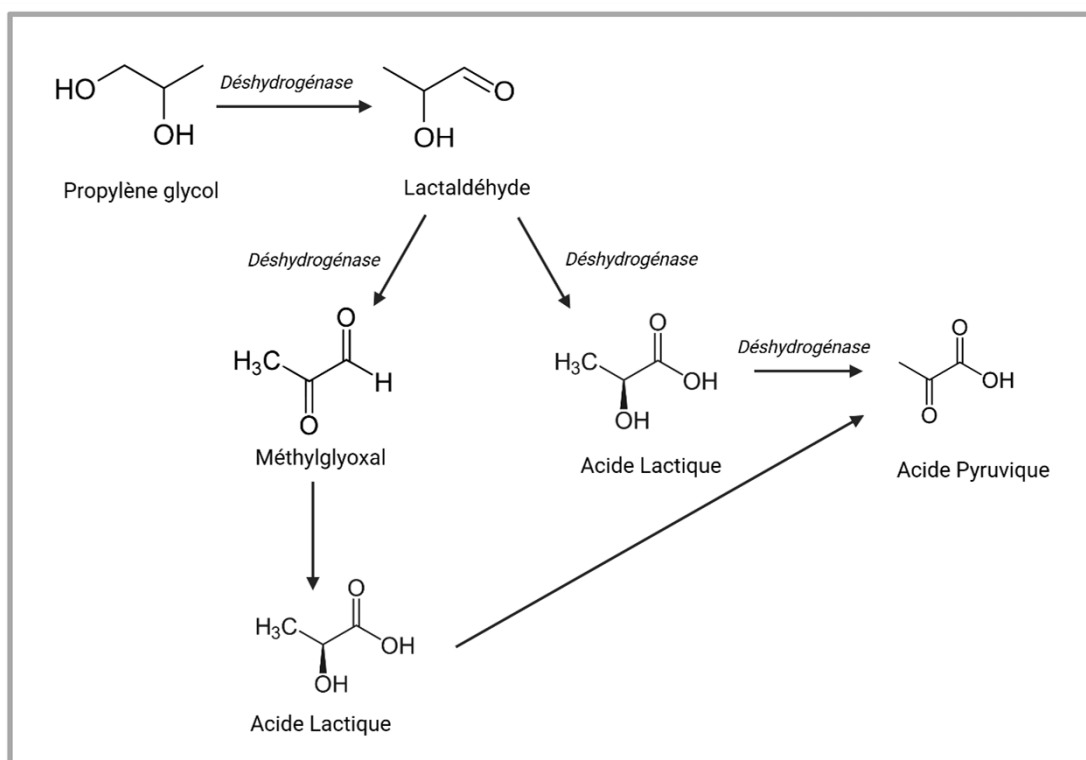


Figure 16: Représentation du métabolisme du Propylène Glycol (adaptée de Institut National de Recherche et de Sécurité, 2020 et créée sur Biorender.com)

○ La glycérine végétale

La glycérine, glycérol ou 1,2,3-propanetriol (numéro CAS 56-81-5) est un composé retrouvé dans la plupart des e-liquides. Elle est hydrosoluble, incolore et particulièrement visqueuse. Elle est, au même titre que le PG, utilisée comme humectant et exhausteur de goût dans différents types d'industries.

Cet additif (E422) peut être soit d'origine végétale, soit d'origine synthétique (National Center for Biotechnology Information, 2025b).

Dans le cadre de son utilisation dans les liquides pour cigarettes électroniques, la glycérine agit comme un véhicule pour la nicotine et permet la production d'un aérosol plus dense et plus volumineux que PG. Plus il y a de VG dans la composition du e-liquide plus les aérosols seront visibles en générant un « nuage » dense, recherché par certains utilisateurs.

La glycérine végétale est absorbée au niveau de la sphère orale et du système digestif et sa demi-vie avoisine 40 minutes. Elle est métabolisée en glycéraldéhyde 3-phosphate par une glycérol kinase dans toutes les cellules mais plus particulièrement dans le foie et les reins avant d'être utilisée comme substrat dans la formation des triglycérides, dans la glycolyse et dans la fourniture d'énergie par le cycle de Krebs.

- La nicotine

Cet alcaloïde, responsable de l'addiction nicotinique, est un constituant majeur des liquides pour cigarettes électroniques.

La nicotine est véhiculée par le complexe PG/VG lors de l'aérosolisation du mélange. L'inhalation de nicotine va produire des sensations différentes au consommateur en fonction du ratio PG/VG choisi, du réglage de sa e-cigarette et de sa manière de vapoter. En effet, une proportion en PG plus importante qu'en VG va augmenter le « hit » (irritation) ressenti au niveau de la gorge par l'utilisateur (Committee on the Review of the Health Effects of Electronic Nicotine Delivery Systems et al., 2018). Au contraire, quand la proportion de VG est plus importante dans le mélange, la sensation de « hit » est atténuée et l'inhalation paraît plus douce pour le consommateur.

Dans l'UE, la concentration en nicotine est strictement contrôlée et régulée. En effet, cette concentration ne doit pas dépasser 20 mg/mL selon article 20 de la Directive 2014/40/UE (Parlement Européen et Conseil, 2014). Cette réglementation vise à limiter les risques d'intoxication à la nicotine, notamment par ingestion accidentelle. Une étude menée par les centres antipoison français révèle que

les jeunes enfants sont particulièrement à risque de s'intoxiquer à la nicotine par le biais des e-liquides. En effet, entre juillet 2019 et décembre 2020, les enfants de moins de 5 ans représentaient plus de 50 % des cas d'expositions involontaires aux e-liquides et donc, à la nicotine (Franchitto et al., 2024).

Dans d'autres pays, il n'existe pas de législation relative à la concentration en nicotine et celle-ci peut atteindre des valeurs élevées comme 50 mg/mL voire plus dans certains cas.

La nicotine peut être ajoutée dans les e-liquides sous forme de « free-base » ou sous forme de sels de nicotine, comme c'est majoritairement le cas pour les cigarettes de 4^e génération.

○ **Les arômes**

Les arômes font partie intégrante des liquides pour cigarettes électroniques. En effet, ces derniers permettent d'attirer un public plus large grâce au vaste choix d'arômes disponible sur le marché du vapotage. Ces additifs sont également décrits comme potentiellement dangereux puisqu'ils peuvent agir comme voie d'entrée vers la dépendance à la nicotine. Le nombre précis d'arômes existants sur le marché de la cigarette électronique et de l'e-liquide est difficile à déterminer. Cependant, plusieurs études ont évalué le nombre d'arômes disponibles sur le marché à environ 15 000 d'après l'étude de plusieurs centaines de sites d'e-commerces (Havermans et al., 2021; Hsu et al., 2018; Krüsemann et al., 2021; Ma et al., 2022). Le nombre d'arômes présents sur le marché est d'autant plus difficile à estimer qu'il existe des combinaisons complexes de saveurs de « base », menant à des mélanges aromatiques très variés. Dans le cas des e-liquides, ces arômes peuvent être décomposés en plusieurs grandes familles aromatiques. En effet, Krüsemann et al. ont établi, d'après la littérature, une classification des 13 types d'e-liquides et d'arômes retrouvés sur le marché : desserts, bonbons, autres sucreries, fruits, boissons alcoolisées, thé/café, autres boissons, menthe/menthol, tabac, fruits à coque, épices, autres familles d'arômes et e-liquides non aromatisés (Krüsemann et al., 2018).

Les arômes retrouvés dans les e-liquides sont majoritairement des arômes utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Ces derniers sont, d'un point de vue toxicologique, autorisés par les agences de santé dont la FDA (Food and Drug Administration) et sont « généralement reconnus comme sûrs » (de

l’anglais « Generally Recognized As Safe » : GRAS). Cependant, cette classification « GRAS » fait suite à des analyses toxicologiques de ces composés par ingestion et non par inhalation (Buettner-Schmidt et al., 2024; Effah et al., 2022).

Plusieurs groupes chimiques sont régulièrement utilisés comme composés aromatiques dans les liquides pour cigarettes électroniques. La liste ci-dessous les regroupe de manière non exhaustive par famille chimique (Committee on the Review of the Health Effects of Electronic Nicotine Delivery Systems et al., 2018; Effah et al., 2022; Page and Goniewicz, 2021) :

- Alcools : menthol, linalol, cis-3-hexenol
- Aldéhydes : benzaldéhyde, vanilline, cinnamaldéhyde
- Acides : acide butyrique, acide malique
- Esters : acétate d’éthyle, éthyle butyrate
- Cétones : éthyl-maltol, frambinone

Chacun des composés aromatisants a une signature aromatique spécifique, certains d’entre eux sont regroupés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Exemples de composés chimiques aromatisants identifiés dans des e-liquides (Tierney et al., 2016)

Composé aromatisant	N° CAS	Famille chimique	Goût associé
Acétal de benzaldéhyde propylène glycol	2568-25-8	Acétal	Amande / Doux
trans-2-Hexène-1-ol	928-95-0	Alcool	Herbacé / Vert
Cis-3-Hexenol	928-96-1	Alcool	Herbacé / Feuille verte
Néomenthol	4919-01-0	Alcool	Menthe
Alcool benzylique	100-51-6	Alcool	Fleuri / Balsamique
Eugénol	97-53-0	Alcool	Clou de girofle / Épicé
Menthol	2216-51-5	Alcool	Menthe
Maltol	118-71-8	Alcool	Sucré / Bonbon
Ethyl-maltol	4940-11-8	Alcool	Caramel / Sucré

Vanilline	121-33-5	Aldéhyde	Vanille
Pipéronal	120-57-0	Aldéhyde	Vanille / Floral
Benzaldéhyde	100-52-7	Aldéhyde	Amande amère / Cerise
Cinnamaldéhyde	104-55-2	Aldéhyde	Cannelle
Ethyl-vanilline	121-32-4	Aldéhyde	Vanille
Anthranilate de méthyle	134-20-3	Ester	Raisin / Baies
Acétate d'hexyle	142-92-7	Ester	Poire / Fruité
Hexanoate d'éthyle	6378-65-0	Ester	Ananas / Fraise
Ethyle butyrate	105-54-4	Ester	Ananas / Fruité
Acétate d'éthyle	141-78-6	Ester	Fruité (ananas, framboise)
Acétate de benzyle	140-11-4	Ester	Jasmin / Fruité
Acétate de 2-méthylbutyle	624-41-9	Ester	Banane / Fruité
Isovalerate d'éthyle	108-64-5	Ester	Pomme / Fruité
γ-Undecalactone	104-67-6	Ester cyclique	Pêche
Menthone	14073-97-3	Cétone	Menthe
Carvone	6485-40-1	Cétone	Menthe verte
Limonène	138-86-3	Monoterpène	Agrume (orange, citron)
Acétoïne	513-86-0	Cétone hydroxylée	Beurre
Diacétyl	431-03-8	Cétone	Beurre / fromage
2,3,5,6-Tétraméthylpyrazine	1124-11-4	Pyrazine	Noisette / Grillé

Ces différents arômes, naturels ou synthétiques, peuvent être à l'origine de toxicités par inhalation en raison de l'étape très réactive d'aérosolisation.

- **Autres éléments**

D'autres composés peuvent être ajoutés aux mélanges complexes que sont les e-liquides. En effet, par souci d'une meilleure solubilité de certains composés aromatiques, de l'éthanol ou de l'eau peuvent être ajoutés au mélange (Poklis et al., 2017; Soulet et al., 2019).

Un autre type de solvant peut être retrouvé dans la composition de certains e-liquides : l'éthylène glycol (Hahn et al., 2014). Le profil toxicologique de ce dernier est plus néfaste que les autres humectants comme le PG et la VG. En effet, il est classé comme irritant des voies respiratoires par inhalation et comme composé toxique par ingestion pour l'Homme (Institut National de Recherche et de Sécurité, 2023; National Center for Biotechnology Information, 2025c).

I.3.6. L'e-liquide : un mélange complexe et toxique ?

Avec l'émergence de nouveaux produits comme les ENDS et les nombreux e-liquides mis à disposition des consommateurs, il paraît nécessaire d'étudier les effets potentiellement néfastes de ces produits sur la santé de l'utilisateur. Même si plusieurs composants toxiques semblent présents dans les aérosols à des concentrations bien inférieures que dans la fumée de cigarette, ces éléments ne sont pas à négliger et doivent être étudiés d'un point de vue toxicologique (Azzopardi et al., 2016). En effet, il existe dans les produits d'aérosolisation d'une e-cigarette des composés dont le profil toxicologique est connu et considéré comme néfaste. Parmi ces éléments, les composés carbonylés comme le formaldéhyde, l'acétaldéhyde ou encore l'acroléine peuvent être cités (Kulháněk and Baptistová, 2020; Lai and Qiu, 2020). Ces produits d'aérosolisation sont issus de l'oxydation des véhicules PG et VG retrouvés dans la grande majorité des liquides pour cigarettes électroniques. Ils sont, par ailleurs, classifiés comme carcinogènes ou potentiels carcinogènes et sont issus du processus de chauffage du e-liquide, lui-même dépendant des paramètres choisis par le consommateur sur sa e-cigarette (puissance, voltage, température, etc).

Les arômes utilisés dans les e-liquides sont des composés considérés comme « sûrs » en cas d'ingestion, mais très peu de données permettent de confirmer leur innocuité dans le cas d'une consommation par inhalation. En effet, il est supposé que ces arômes puissent, à l'instar du véhicule

PG/VG, libérer des produits de dégradation par l'action de la chaleur émise par la résistance. Cette hypothèse est appuyée par le fait les arômes font souvent partie de familles chimiques sensibles aux réactions d'oxydo-réduction (Lai and Qiu, 2020; Sachdeva et al., 2023). Certains composés aromatiques peuvent interférer avec le véhicule et former des composés toxiques comme de l'acétal (Jabba et al., 2020). Par exemple, la vanilline, le benzaldéhyde ou le cinnamaldéhyde peuvent réagir avec du PG sous la forme d'une réaction d'acétalisation dont la résultante aboutit à la formation respectivement, de Vanilline PG Acétal, Benzaldéhyde PG Acétal et Cinnamaldéhyde PG Acétal (Erythropel et al., 2018). Outre les produits issus de réactions chimiques entre les arômes et les véhicules, les composés aromatiques seuls peuvent être à l'origine de réponses cellulaires spécifiques. En effet, des agents aromatisants largement répandus dans la composition d'e-liquides peuvent, notamment, jouer un rôle pharmacologique. Le menthol, à l'origine de la sensation de froid et de fraîcheur, est un agoniste des récepteurs TRPM8 exprimés dans les voies respiratoires (Figure 17) (Effah et al., 2022; Sabnis et al., 2008). Les récepteurs de la famille TRPM sont des canaux calciques non spécifiques et sont sensibles à la température, l'osmolalité et/ou à la pression. La vanilline et le cinnamaldéhyde sont des agonistes, respectivement, des récepteurs TRPV1 et TRPA1 (Figure 17) (Dietrich et al., 2017). La stimulation, fréquente et répétée, de ces récepteurs par les constituants des e-liquides peut altérer les réponses physiologiques découlant de leur activation en région pulmonaire d'autant qu'ils sont présents à la surface des cellules immunitaires (Yan et al., 2024).

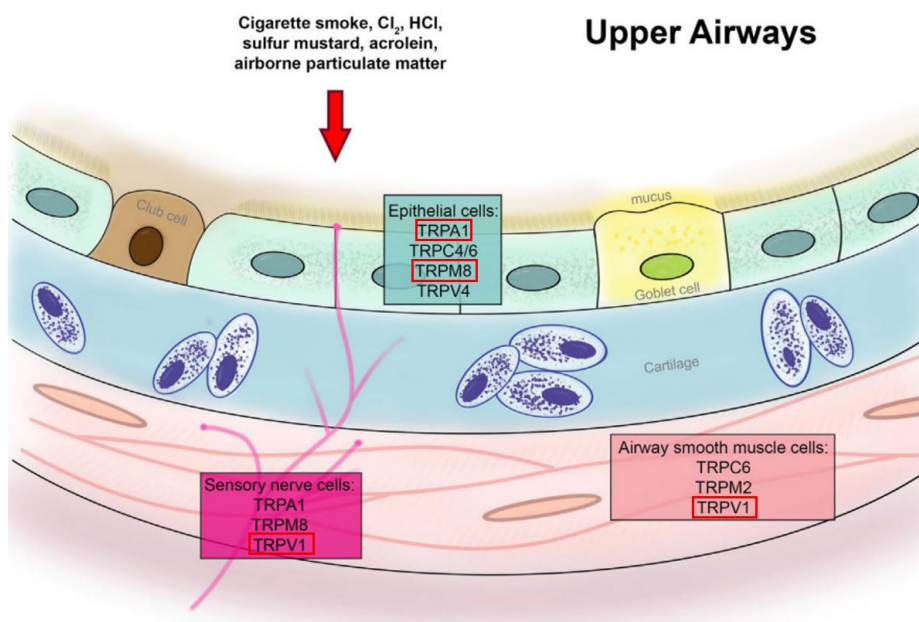


Figure 17: Représentation schématisée de la localisation des récepteurs TRPA1, TRPM8 et TRPV1 dans la région supérieure des voies aériennes (Dietrich et al., 2017)

I.3.6.a. Caractérisation chimique des aérosols et des e-liquides aromatisés

Différentes stratégies peuvent être adoptées pour investiguer la composition des e-liquides et des aérosols produits par les cigarettes électroniques. En effet, les e-liquides sont connus comme étant des mélanges complexes de composés chimiques. Le véhicule composé de PG et de VG représente, en proportion, la majorité des constituants des e-liquides. La fraction restante est composée de nicotine, de nombreux composés aromatiques et d'additifs.

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes intéressés essentiellement, aux arômes et à leurs potentiels produits de dégradation. Ces derniers sont majoritairement des cétones et des aldéhydes qui appartiennent à la famille des composés carbonylés. Lors de la dégradation thermique du véhicule PG/VG, un certain nombre de composés carbonylés peuvent être identifiés comme le formaldéhyde, l'acroléine ou encore l'acétaldéhyde. Les agents aromatisants, eux, subissent également une dégradation thermique pouvant provoquer la formation d'autres dérivés carbonylés, nombreux et variés. En effet, les composés aromatiques étant majoritairement pourvus de groupement alcools, ils peuvent subir des réactions d'oxydation et se transformer en composés carbonylés. Ces transformations peuvent être amplifiées selon les paramètres choisis par l'utilisateur comme, par

exemple, la tension appliquée à la résistance (Ogunwale et al., 2017). Des composés organiques volatils, des composés phénoliques et des hydrocarbures aromatiques polycycliques ont également été mis en évidence dans les aérosols de cigarette électronique (Cheng, 2014).

Tous ces composés peuvent être identifiés, voire, quantifiés par différentes méthodes dont les principales sont basées sur la chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse (Figure 18). Cette technique d'analyse et d'identification se base sur une séparation des composés d'un mélange complexe grâce à une phase stationnaire et une phase mobile et les interactions chimiques des composés avec ces 2 phases. Selon l'affinité des molécules pour les phases stationnaire et mobile, un temps de rétention spécifique à chaque composé sera obtenu et la molécule sera détectée en sortie de colonne par un spectromètre de masse. Après une phase d'ionisation des molécules par une source, un analyseur sépare les molécules chargées selon leur rapport masse sur charge (m/z), un détecteur compte et amplifie le signal, avant qu'il ne soit traité et retranscrit sur un spectre de masse et un chromatogramme par un système informatique. La chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC) couplées à la spectrométrie de masse (MS) peuvent toutes les deux être appliquées à l'étude des molécules présentes dans les aérosols et les e-liquides de cigarettes électroniques (Kavvalakis et al., 2015; Shah et al., 2021). Dans la littérature, l'équipe de Golpe et al. a caractérisé la composition en éléments volatils et semi-volatils de différents e-liquides par une technique de GC-MS. Ces derniers ont pu mettre en évidence la présence de plus de 250 composés chimiques distincts (Golpe et al., 2023). D'autres études se sont concentrées sur les arômes présents dans les e-liquides afin de les catégoriser et d'évaluer leur concentration (Behar et al., 2018; Krüsemann et al., 2020; Omaiye et al., 2022). En revanche, ce type d'analyse ne retranscrit pas à 100 % la composition des aérosols car un certain nombre de composés thermoformés suite au chauffage de la résistance peut apparaître à l'inhalation (Omáiyé et al., 2019). Afin d'analyser ces composés thermoformés, il faut mettre en œuvre un piégeage préanalytique efficace sur des colonnes de type Tenax®. Ainsi, près de 150 composés organiques volatils ont été identifiés via une analyse non ciblée d'un puff d'aérosol à l'aide d'une méthode de GC-MS couplée à la thermo-désorption

(Herrington and Myers, 2015). La thermo-désorption possède l'avantage de simplifier la préparation de l'échantillon puisqu'elle permet d'extraire thermiquement les composés volatils ou semi-volatils, directement d'un échantillon, ou après que les composés volatils aient été adsorbés sur une cartouche de type Tenax®. Les molécules thermo-désorbées sont concentrées par cryogénie, avant d'être éluées par un gaz vecteur vers une colonne chromatographique de GC.

Outre les méthodes par GC/MS, plusieurs études utilisant la LC ont permis de mettre en avant des résultats similaires (Cheng, 2014; Kavvalakis et al., 2015; Tehrani et al., 2021). Pour l'analyse des aérosols par LC, une étape pré-analytique de condensation des aérosols est nécessaire, avant d'analyser les molécules en solution comme pour les e-liquides.

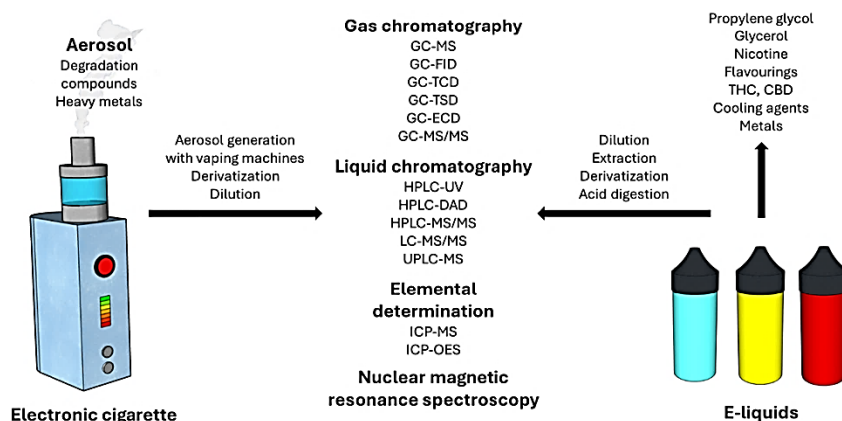


Figure 18: Représentation schématisée des différentes techniques utilisées dans l'analyse des e-liquides et aérosols d'e-cigarettes (Rantaša et al., 2025)

Les arômes ne sont pas les seules cibles de ce type d'analyse et de screening. En effet, la nicotine ou les membres de la famille des cannabinoïdes peuvent également être identifiés et quantifiés par ces techniques chromatographiques. Dans le cas des métaux lourds libérés dans les aérosols, c'est principalement la méthode de spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) qui est utilisée. Cette technique analytique est favorisée lors de l'étude des métaux lourds présents sous forme de traces. Sa haute sensibilité permet de détecter des concentrations très faibles d'éléments inorganiques pouvant aller jusqu'à une partie par milliard. Certains métaux lourds ont été identifiés dans les aérosols à la suite de la dégradation thermique de la résistance. Pour permettre l'analyse, l'échantillon est tout d'abord injecté dans une chambre de nébulisation grâce à une pompe

péristaltique. La chambre de nébulisation va produire et sélectionner de fines gouttelettes d'échantillon qui sont ensuite ionisées par une torche à plasma d'argon. La torche à plasma par induction est constituée d'une bobine électromagnétique qui ionise un gaz en le chauffant à très haute température pour obtenir un gaz ionisé appelé plasma. Lorsque l'échantillon nébulisé passe dans ce plasma, il s'évapore et les molécules organiques se désagrègent. C'est alors que les atomes métalliques constitutifs de l'échantillon s'ionisent avant d'être focalisés et analysés par spectrométrie de masse en fonction de leur m/z . Enfin, les éléments atteignent un détecteur d'ions qui induit un signal électrique qui peut être ensuite transformé en concentration.

I.3.6.b. Effets des e-liquides et aérosols sur les voies respiratoires et autres systèmes biologiques : études in vivo et in vitro

L'altération de plusieurs voies physiopathologiques peut découler de l'utilisation des cigarettes électroniques contenant des e-liquides aromatisés, même en l'absence de nicotine. Dans le paragraphe et le tableau qui suivent, un résumé des modèles in vivo ou in vitro retrouvés dans la littérature depuis une dizaine d'années pour l'étude des effets potentiellement toxiques d'e-liquides aromatisés est présenté.

○ **Modèles in vivo**

Afin d'investiguer les effets des aérosols d'e-cigarette et des e-liquides sur le système pulmonaire et au niveau systémique, plusieurs études ont été menées sur des modèles animaux variés. Ces derniers sont majoritairement des modèles murins (souris et rats). Il existe également des modèles ovins (brebis) qui paraissent pertinents pour faciliter certains types d'expérimentations/prélèvements et qui se rapprochent davantage de l'anatomie humaine (taille et structure des voies aériennes).

Dans le cadre de ce travail de recherche bibliographique, la toxicité de la nicotine ne sera pas abordée dans la mesure où mon projet de thèse a été mené sur des e-liquides aromatisés et sans nicotine.

Les différentes études ayant mené des expérimentations in vivo sur la toxicité des véhicules PG et VG, ainsi que des arômes sont regroupées et succinctement décrites dans le tableau 2.

Parmi les différents mécanismes physiopathologiques induits par l'exposition des modèles animaux aux e-cigarettes, l'inflammation est largement décrite dans la littérature. En effet, dans divers modèles murins, après une exposition chronique aux véhicules PG et VG et à certains arômes (tabac et fruits rouges) par une chambre d'aérosolisation, une inflammation systémique a pu être décrite (Chen et al., 2018; Cirillo et al., 2019a; Garcia-Arcos et al., 2016). Cette inflammation s'est notamment traduite par l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines 6 et 8 (IL-6 et IL-8) et de marqueurs de l'inflammation, principalement d'origine macrophagique comme les chimiokines CCL3 et CCL4. Glynos et al. ont également décrit une augmentation de la cellularité et du nombre de macrophages dans les liquides broncho-alvéolaires (LBA), mais seulement après une exposition aiguë des souris (Glynos et al., 2018). Au contraire, certaines études n'ont pas révélé d'accentuation de processus inflammatoires après exposition aux e-liquides par rapport aux animaux exposés à l'air (Ha et al., 2019; Lechasseur et al., 2017; Madison et al., 2019; Zelikoff et al., 2018).

Certaines expérimentations menées sur modèles murins ont également mis en évidence une dérégulation du stress oxydant. En effet, Glynos et al. ont décrit une augmentation des marqueurs du stress oxydant comme le produit terminal de la peroxydation lipidique, le malondialdéhyde, dans les LBA et l'homogénat pulmonaire après une exposition aiguë aux aérosols (véhicules +/- arôme tabac) (Glynos et al., 2018). Une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), de la peroxydation des lipides et de la carbonylation des protéines, ainsi que la perturbation de la capacité antioxydante ont également été décrites après une exposition aiguë aux aérosols produits par un e-liquide aromatisé aux fruits rouges (Cirillo et al., 2019a; Vivarelli et al., 2019). Il existe un équilibre fragile entre les espèces oxydantes sécrétées et le système anti-oxydant établi par les cellules via des enzymes clés de régulation. Hinds et al. ont mis en évidence l'augmentation de l'expression de la superoxyde dismutase 2 (SOD2), enzyme mitochondriale clé du système anti-oxydant cellulaire, après exposition aux véhicules aérosolisés dans un modèle de hamster (Hinds et al., 2022). La rupture

de cet équilibre peut mener à des dérégulations de l'homéostasie cellulaire, de l'inflammation ou à la mort cellulaire, qui sont étroitement liées au stress oxydant.

Outre les processus inflammatoires et oxydants, les aérosols d'e-liquides semblent altérer l'organisation structurelle des tissus, principalement pulmonaires, ainsi que leurs fonctions. En effet, Larcombe et al. ont décrit dans leurs travaux une diminution du volume thoracique, des altérations mécaniques du tissu pulmonaire, ainsi qu'une hyperréactivité bronchique (Larcombe et al., 2017). Une augmentation significative de l'élasticité tissulaire et de la résistance des voies aériennes a également pu être mise en évidence après exposition aiguë aux aérosols (Glynos et al., 2018). Les voies aériennes inférieures, dont les bronchioles et alvéoles, sont soumises à une désorganisation structurelle et une altération des fonctions ciliaires essentielles à la clairance mucociliaire (Cirillo et al., 2019a). Des zones d'expansions emphysémateuses des alvéoles ainsi que des épaissements des septas alvéolaires ont également été mis en évidence chez des rats mâles exposés aux aérosols de PG/VG seuls (Yanina et al., 2023). De toutes ces altérations peuvent découler des processus pathologiques préoccupants corrélés à une limitation des échanges gazeux, une inflammation localisée chronique associée à des fonctions immunitaires amoindries, ainsi qu'une clairance mucociliaire réduite. Cette dernière est essentielle au système pulmonaire pour éviter l'accumulation d'agents pathogènes ou substances nocives et leur passage systémique. Une clairance mucociliaire altérée peut entraîner une accumulation de mucus et des remodelages pulmonaires. Glynos et al. ont décrit une augmentation de la sécrétion de la mucine MUC5AC par les cellules caliciformes des épithéliums pulmonaires (Glynos et al., 2018). L'expression de MUC5AC peut être augmentée par les signalisations intracellulaires associées au stress oxydant (Song et al., 2005). Une surproduction de mucus peut à plus long terme entraîner une obstruction des voies aériennes, comme cela est décrit dans la BPCO.

D'autres tissus peuvent voir leurs structures et fonctions dégradées par l'exposition aux composants des e-liquides. En effet, Vivarelli et al. ont focalisé leurs études sur les fonctions gonadiques de rats mâles adultes après une exposition chronique à des aérosols d'e-liquides aromatisés aux fruits rouges.

Ces derniers ont décrit une augmentation des altérations tissulaires gonadiques, dont une baisse de la masse testiculaire et une diminution de l’expression d’enzymes clés dans la production de la testostérone (Vivarelli et al., 2019). Ces différents processus pourraient être à l’origine d’altérations fonctionnelles des fonctions gonadiques.

Enfin, des études expérimentales se sont basées sur l’utilisation de modèles ovins, plus précisément de brebis, afin de se rapprocher des structures anatomiques humaines. Kim et al. ont investigué les effets des aérosols de VG 100 % ou de PG 100 % sur le système pulmonaire de brebis femelles (Kim et al., 2023, 2022). L’exposition par intubation nasale des aérosols de VG a induit une augmentation des médiateurs pro-inflammatoires plasmatiques (IL-6 et IL-8) chez les brebis. Une augmentation de la présence de mucus, ainsi qu’une augmentation de l’activité de la métalloprotéase MMP-9 ont également été mises en évidence après exposition aux aérosols de PG et VG 100 %. Cette métalloprotéase est sur-exprimée chez les patients atteints de BPCO et peut induire des remodelages conséquents des tissus pulmonaires, ainsi qu’une réduction de l’élasticité pulmonaire (Dimic-Janjic et al., 2023).

Tableau 2 : Etudes in vivo sur modèles murins et ovins ciblant la toxicité des véhicules et arômes présents dans les e-liquides pour cigarettes électroniques

Modèle animal	Système utilisé et paramètres	Conditions expérimentales	Investigations	Résultats majeurs (par rapport au CTL)	Référence
Souris A/J de 12 semaines	Exposition via une chambre d’aérosolisation (corps entier) E-liquide PG/VG (50/50)	<u>Exposition</u> : 1 heure, 5 fois/j pendant 4 mois	Inflammation, fonctions pulmonaires, structures alvéolaires	Tendance à l’augmentation du nombre de cellules immunitaires (majoritairement des macrophages)	Garcia-Arcos et al., 2016

Souris femelles BALB/c de 4 semaines	Exposition via une pompe à seringue reliée à une e-cigarette et à une chambre d'exposition (corps entier) E-liquides composé de PG ou VG (véhicules)	<u>Protocole</u> : 35 mL d'aérosol/min <u>Exposition</u> : 1 heure, 1 fois/j, 5 j/semaine pendant 7 semaines Puis 1 heure, 2 fois/j, 5 j/semaine pendant 2 semaines	Masse corporelle, inflammation, fonctions et volumes pulmonaires, hyperréactivité bronchique	Augmentation de la masse corporelle. Diminution du volume respiratoire courant (volume d'air contenu dans les poumons à la fin d'une expiration normale), altération mécanique pulmonaire et augmentation de l'hyperréactivité bronchique. Diminution du nombre de cellules sécrétrices de mucus.	Larcombe et al., 2017
Souris femelles BALB/c de 6 à 8 semaines	Exposition via une chambre d'aérosolisation (corps entier) E-liquides composés de PG/VG (70/30) ou PG 100 % ou VG 100 %	<u>Protocole</u> : 3 puffs par minute <u>Exposition</u> : 2 heures, 5 j/semaine pendant 8 semaines	Rythme circadien, expression de gènes de la chronobiologie	Altération de l'expression de gènes du rythme circadien (dans les poumons, SNC, foie, reins et muscles squelettiques) par les véhicules PG et VG. Absence d'inflammation	Lechasseur et al., 2017
Souris femelles BALB/c de 7 semaines	Exposition via une chambre d'aérosolisation (corps entier) E-liquides composés de PG/VG en proportion 50/50 et arôme Tabac	<u>Protocole</u> : 4 puffs de 5 secondes toutes les 20 secondes <u>Exposition</u> : 15 min 2 fois/j pendant 6 semaines avant gestation puis pendant 6 semaines post gestation	Masse corporelle, marqueur de développement des poumons, inflammation, méthylation de l'ADN	<u>Femelles parturientes</u> : Moindre gain de poids. Augmentation IL-6 et TFN- α . Augmentation de voies de signalisation de l'inflammation. <u>Progéniture</u> : A 20 j post naissance : masse corporelle plus élevée (masse grasse ++), augmentation de l'expression du facteur de croissance PDGF lié au développement des alvéoles A 13 semaines de vie : diminution IL- β et tendance à augmentation IL-6. Augmentation de certaines voies de signalisation impliquées dans l'inflammation.	Chen et al., 2018
Souris mâles C57BL/6 de 8-12 semaines	Exposition via une pompe à seringue reliée à une e-cigarette et à une chambre d'exposition (corps entier) E-liquides composés de PG/VG (50/50) avec ou sans arôme Tabac	<u>Protocole</u> : 8 puffs/min <u>Exposition</u> : 2 min 4 fois/j pendant 3 j ou 4 semaines	Cellularité du LBA, marqueurs du stress oxydant, inflammation, fonctions pulmonaires, hyperréactivité bronchique	<u>Exposition aiguë</u> : Augmentation de la cellularité et du nombre de macrophages dans le LBA. Augmentation des marqueurs du stress dans le LBA et l'homogénat pulmonaire. Augmentation de MUC5AC impliquée dans la sécrétion de mucus. Augmentation de l'élasticité tissulaire et de la résistance des voies aériennes <u>Exposition chronique</u> : pas de différences significatives	Glynos et al., 2018

Souris femelles C57BL/6J gestantes et allaitantes	Exposition via une chambre d'aérosolisation (corps entier)	<u>Protocole :</u> Puffs de 4 secondes toutes les 30 secondes		<u>Chez la progéniture :</u> diminution de l'expression de facteurs de croissance cérébraux, diminution de cytokines pro-inflammatoires périphériques, augmentation de l'activation microgliale (neuro- inflammation). Risques pour le développement du SNC	Zelikoff et al., 2018
	E-liquides sans nicotine aromatisés au tabac	<u>Exposition :</u> 3h/j, 5 j/semaine pendant 6 semaines (3 semaines de gestation et 3 semaines d'allaitement)	Inflammation cérébrale, expression de facteurs de croissances cérébraux		
Souris femelles BALB/c	Exposition via une chambre d'aérosolisation (corps entier)	<u>Exposition :</u> 2 expositions de 15 minutes espacées de 5 minutes, 2 fois/jour		<u>Chez la progéniture :</u> Anxiété réduite, augmentation de la méthylation de l'ADN, expression augmentée d'enzymes clés de modification des histones et méthylation de l'ADN.	Nguyen et al., 2018
	E-liquides composés de PG/VG (50/50) avec arôme Tabac	Pendant 6 semaines avant, pendant la gestation et pendant l'allaitement	Comportement, capacités cognitives, méthylation de l'ADN, enzymes clés des processus épigénétiques		
Rats mâles Sprague Dawley de 7 semaines	Exposition via une chambre d'aérosolisation (corps entier)	<u>Protocole :</u> 2 puffs de 6 secondes espacées de 5 secondes		Augmentation des ROS, désorganisation structurelle des alvéoles et bronchioles, perte des cils, tendance à l'augmentation de marqueurs inflammatoires (dont macrophagiques) : chimiokines CCL3 et CCL4	Cirillo et al., 2019
	E-liquides composés de PG/VG (50/50) avec un arôme fruits rouges	<u>Exposition :</u> 11 fois/j pendant 28 j	Inflammation, marqueurs oxydants, altérations structurelles pulmonaires et trachéales		
Souris femelles C57BL/6J de 2 mois	Exposition via une chambre d'aérosolisation (corps entier)	<u>Protocole :</u> 1 puff de 3 secondes toutes les 20 secondes pendant 6 minutes et 25 secondes		Pas d'inflammation des voies aériennes. Accumulation de gouttelettes lipidiques dans les macrophages alvéolaires. Augmentation des phospholipides associées au surfactant mais diminution de l'expression des protéines du surfactant. Altération des fonctions assurées par les macrophages alvéolaires et des fonctions immunitaires	Madison et al., 2019
	E-liquides composés de PG/VG (40/60)	<u>Exposition :</u> 4 fois/j, 5 j/semaine pendant 4 mois	Inflammation, altérations lipidiques des macrophages alvéolaires, lipides associés aux protéines du surfactant		

Rats mâles Sprague Dawley de 7 semaines	Exposition via une chambre d'aérosolisation (corps entier) E-liquides composés de PG/VG (50/50) avec un arôme fruits rouges	<u>Protocole</u> : 2 puffs de 6 secondes espacées de 5 secondes <u>Exposition</u> : 11 fois/j pendant 28 j	Masse corporelle et testiculaire, expression d'enzymes de la stéroïdogénèse, marqueurs tumoraux, stress oxydant	Poids corporel inchangé mais diminution de la masse testiculaire. Enzymes clés dans la production de la testostérone plus faiblement exprimées et augmentation d'altération tissulaires. Augmentation de marqueurs de stress oxydant (ROS, Malondialdéhyde etc...) Diminution des enzymes clés de processus anti-oxydants. Risque d'altération des fonctions gonadiques	Vivarelli et al., 2019
Souris C57BL/6	Exposition via une chambre d'aérosolisation (corps entier) E-liquides composés de PG/VG	<u>Protocole</u> : Puffs de 3 secondes espacés de 20 secondes <u>Exposition</u> : 31 min 40x/j, 5 j/semaine pendant 16 semaines	Réponses inflammatoires et immunitaires dans le larynx	Pas de réponses immunitaires ou inflammatoires modifiées par rapport au contrôle	Ha et al., 2019
Hamsters Golden Syrian mâles de 6 à 8 semaines	Exposition via une chambre d'aérosolisation (corps entier) E-liquide PG/VG (50/50)	<u>Protocole</u> : Puffs de 3,3 secondes espacés de 30 secondes <u>Exposition</u> : 2 heures/j pendant 2 j	Altérations structurelles en région nasale et pulmonaires, réponses inflammatoires et processus oxydants	Cellularité du LBA inchangée, surexpression de SOD2 (enzyme essentielle du système anti-oxydant) et de VEGF (associé à la néoangiogenèse) en région épithéliale nasale	Hinds et al., 2022
Brebis femelles adultes	Exposition par intubation nasale E-liquides composés de VG 100 %	<u>Exposition</u> : 40 puffs par session, 2 fois/j pendant 5 j	Concentration de mucus, de protéases et de médiateurs inflammatoires	Augmentation de la concentration de mucus et de l'activité de métalloprotéases dans les sécrétions trachéales. Augmentation de médiateurs inflammatoires (IL-6, IL-8...) dans le plasma.	Kim et al., 2022
Brebis femelles adultes	Exposition par intubation nasale E-liquides composés de PG 100 %	<u>Exposition</u> : 40 puffs par session, 2 fois/j pendant 5 j	Concentration de mucus, de protéases et de médiateurs inflammatoires	Augmentation de la concentration de mucus et de l'activité de la métalloprotéase MMP-9 dans les sécrétions trachéales.	Kim et al., 2023
Rats mâles Wistar	Exposition via une chambre d'aérosolisation (corps entier) E-liquide PG/VG (40/60)	<u>Exposition</u> : 5 expositions dans la chambre d'aérosolisation (0,6 mL d'e-liquide consommé à chaque exposition)	Altérations structurelles des tissus pulmonaires	Zones d'expansions emphysémateuses des alvéoles et épaississement des septas alvéolaires	Yanina et al., 2023

○ **Modèles in vitro**

Plusieurs modèles in vitro ont été mis au point afin d'étudier certaines problématiques liées aux aérosols de cigarettes électroniques. Des différences existent dans le type de matériel cellulaire utilisé : lignée cellulaire ou culture primaire. Les lignées cellulaires sont appréciées pour leur reproductibilité, mais leur phénotype peut dévier légèrement du phénotype in vivo. Les cultures primaires sont plus difficiles à obtenir et plus exigeantes à entretenir, mais leur phénotype reste plus fidèle au tissu d'origine.

Outre le type de matériel cellulaire utilisé, il est indispensable de reproduire au mieux l'appareil pulmonaire. Pour étudier les effets d'aérosols produits par les cigarettes électroniques en région profonde des voies aériennes, il paraît intéressant de reproduire le plus fidèlement possible l'organisation cellulaire, voire tissulaire, de la barrière alvéolo-capillaire. Cette dernière est composée de deux compartiments différents : un compartiment alvéolaire en contact avec l'extérieur et un compartiment vasculaire en contact avec la circulation systémique. Pour modéliser ces deux compartiments, il existe des types cellulaires divers, répondant à des fonctions bien précises. In vitro, il est possible de développer des modèles cellulaires mettant en relation plusieurs lignées cellulaires afin de former une coculture. Les méthodes d'exposition aux différents traitements peuvent également varier, selon une exposition immergée ou par une Interface Air-Liquide (ALI).

Au même titre que pour les modèles in vivo, la toxicité de la nicotine ne sera pas abordée dans la suite de ce chapitre.

Contrairement aux modèles in vivo pour lesquels le type d'exposition ne varie que rarement, avec en grande majorité une exposition corps entier pour chaque animal, les modèles in vitro sont exposés aux différents composés de manières diverses. En effet, les méthodes d'exposition peuvent être décomposées en trois grandes catégories :

- Par dilution des e-liquides (véhicule +/- arômes) dans le milieu de culture
- Par piégeage de l'aérosol (majoritairement dans du milieu de culture)

- Par exposition directe des aérosols par ALI

Les expositions directes sont notamment possibles grâce à des dispositifs et appareils capables de produire un aérosol à partir d'une cigarette électronique et de le distribuer de manière homogène aux différents échantillons. Les appareils des marques Vitrocell® et Cultex® sont largement utilisés pour les expérimentations centrées sur cet axe de recherche en toxicologie d'inhalation mais de nombreux laboratoires ont leur système « maison ».

Les différentes études de la littérature ayant porté sur des expérimentations in vitro sur la toxicité des e-liquides ou des aérosols d'e-liquides sont regroupées et décrites dans le Tableau 3.

Au même titre que les modèles in vivo, les processus inflammatoires semblent être des réponses majeures induites par les cellules après exposition aux e-liquides/aérosols. En effet, de nombreuses études ont décrit une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et IL-6 notamment) après exposition par dilution à des e-liquides aromatisés ou non (arôme menthol ou tabac). Cette induction cytokinique a été observée pour des cultures primaires (cellules trachéobronchiques humaines hTBE) ou des lignées cellulaires humaines (cellules épithéliales alvéolaires de type II NCI-H441, cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B, cellules monocytaires THP-1) (Morris et al., 2021; Sabo et al., 2023; Wu et al., 2014). Une étude menée par Muthumalage et al. a mis en évidence une différence de réponses liée à l'inflammation selon les agents aromatiques utilisés. En effet, après dilution des e-liquides aromatisés dans le milieu de culture, les réponses varient selon l'arôme complexe utilisé ou la molécule aromatique seule. Par exemple, la sécrétion d'IL-8 par la lignée monocyttaire U937 est augmentée de manière significative après une exposition aux e-liquides aromatisés à la cannelle ou au melon. Au contraire, les arômes aux fruits rouges semblent induire une diminution de la sécrétion de cette cytokine. Les investigations reconduites après traitement à des agents aromatiques seuls révèlent également des différences majeures selon l'agent aromatique considéré. En effet, un traitement des cellules par du diacétyl (utilisé dans l'arôme beurré) ou du cinnamaldéhyde (utilisé dans l'arôme cannelle) provoque une augmentation

significative de la sécrétion d'IL-8 contrairement à l'acétoïne (utilisée dans l'arôme beurré) qui provoque, elle, une diminution significative de ce marqueur (Muthumalage et al., 2018).

Par une exposition de l'aérosol piégé dans le milieu de culture, les résultats mis en évidence montrent des processus inflammatoires similaires que par dilution du e-liquide dans le milieu de culture. Après exposition d'un aérosol aromatisé au tabac et barboté dans le milieu de culture, les réponses cellulaires induites par des neutrophiles humains isolés de patients sains sont en partie pro-inflammatoires (Higham et al., 2016). Cette réponse cellulaire, caractérisée par l'augmentation d'IL-8, s'est confirmée dans la lignée cellulaire monocyttaire THP-1 exposée à des aérosols aromatisés à la pomme. Cependant, un certain nombre de cytokines, comme l'IL-6 et le TGF- β , ont vu leur sécrétion diminuer après exposition à l'aérosol aromatisé par rapport aux aérosols composés des véhicules PG et VG (Ween et al., 2017). Les arômes semblent donc jouer un rôle indépendant des véhicules sur le plan inflammatoire.

Enfin, les processus inflammatoires ont pu être étudiés dans des conditions plus proches et réalistes de l'inhalation classique des consommateurs d'e-cigarettes. En effet, cela est possible grâce à l'exposition d'aérosol aux modèles cellulaires par le biais d'une interface Air-Liquide. Nair et al. ont montré que l'exposition directe d'un modèle 3D de tissu bronchique humain (EpiAirway™) à des aérosols aromatisés au menthol induit une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans les processus inflammatoires (NF- κ B, CD27, CD28) et des cytokines (IL-6 et IL-8) (Nair et al., 2020). Ce type de résultat a également été décrit dans les travaux de Lerner et al. qui ont exposé des cellules épithéliales bronchiques humaines H292 en ALI à des e-liquides aromatisés à la cannelle (Lerner et al., 2015). Sur d'autres modèles cellulaires comme un modèle de coculture visant à reproduire la muqueuse nasale humaine à partir de cellules épithéliales ou encore des fibroblastes humains issus de patients sains, des résultats similaires ont été obtenus. En effet, après une exposition à des aérosols aromatisés au tabac en ALI, les cellules en coculture ont augmenté significativement leur concentration en cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF α , et MCP-1) (Rouabhia et al., 2020). L'aérosolisation d'un liquide comportant uniquement de la VG, a par ailleurs suffi à induire une

augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 dans un modèle ALI de cellules primaires bronchiques humaines HBECs (Kim et al., 2022)

L'acétate de vitamine E ou acétate d' α -tocophérol est un composé chimique lipophile, ajouté dans les e-liquides véhiculant du tétrahydrocannabinol (THC) afin de favoriser son aérosolisation. Son effet a été investigué dans deux études par une exposition ALI sur des cellules primaires épithéliales nasales humaines HNEC (Manna et al., 2024) et sur des macrophages alvéolaires primaires (Matsumoto et al., 2022). Ces deux études ont fait le même constat puisqu'elles ont mis en évidence une augmentation de la production de biomarqueurs pro-inflammatoires (CCL15, IL-6, Interleukin-6 soluble receptor - IL-6sR et CCL2 pour la première étude, et MCP-1, MIP-1 α , SDF-1 α , GRO- α , RANTES et eotaxine pour la deuxième étude).

Les processus inflammatoires étant étroitement liés aux déséquilibres du système redox cellulaire, des investigations ont également été menées sur la libération de ROS dans les modèles in vitro. En effet, après une exposition par dilution, plusieurs études ont démontré une augmentation de la libération de ROS par différents modèles in vitro. Lerner et al. ont mis en évidence la présence augmentée de ROS (H₂O₂ et autres ROS mesurées par la sonde fluorescente sensible à l'oxydo-réduction : dichlorofluorescéine ou DCF) suite à l'aérosolisation par les ENDS (Lerner et al., 2015).

Les arômes sucrés et fruités ont une activité oxydante plus importante que d'autres arômes comme les arômes tabac. Les travaux de Muthumalage et al. ont également mis en évidence la libération de ROS exogènes (H₂O₂) issues des différents composés aromatiques tels que le maltol, le cinnamaldéhyde ou le diacétyl, régulièrement utilisés dans les e-liquides (Muthumalage et al., 2018).

Ces conclusions ont été confirmées par les travaux de Morris et al. qui ont exposé des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B et la lignée monocyttaire THP-1 à des composés aromatiques tels que le cinnamaldéhyde, la vanilline ou l'eugénol (Morris et al., 2021). Au contraire, une étude d'Effah et al. a démontré que les cellules épithéliales des voies respiratoires Calu-3 diminuent leur production de ROS après exposition à un e-liquide aromatisé à la cannelle par dilution (Effah et al., 2023). Les cellules BEAS-2B (Nair et al., 2020) et les cellules NCI-H441 (Sabo et al., 2023) une fois

exposées, respectivement, à des e-liquides aromatisés au menthol et aux fruits rouges ont induit une augmentation des ROS (anions superoxydes), notamment au niveau mitochondrial. Par exposition directe d'un modèle 3D de tissu bronchique à l'aérosol grâce à un dispositif Cultex[®], l'e-liquide aromatisé au menthol augmente l'expression de protéines liées au stress oxydant (NRF-2 et SOD2) (Nair et al., 2020).

Ces différents processus inflammatoires et oxydants peuvent mener à d'autres mécanismes pouvant être délétères comme la diminution de la viabilité cellulaire et l'altération de fonctions cellulaires. En effet, Lerner et al. ont mis en évidence une altération structurelle et morphologique des fibroblastes humains HFL-1 après exposition aux e-liquides par dilution dans le milieu de culture (Lerner et al., 2015). Une tendance à l'augmentation de la mort cellulaire des cellules épithéliales Calu-3 mesurée par la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu a été décrite après exposition à différents e-liquides aromatisés (cannelle et noisette) dilués dans le milieu de culture (Effah et al., 2023). D'autres études *in vitro* ont identifié une baisse de la viabilité cellulaire de la lignée monocyttaire U937 et de la lignée monocyte-macrophage MM6 après exposition à des composés aromatiques, tels que le cinnamaldéhyde ou la vanilline, et à des e-liquides aromatisés au melon (Muthumalage et al., 2018). Ces effets ont également été démontrés sur les cellules BEAS-2B et THP-1 après une exposition à des composés aromatiques tels que la vanilline ou le cinnamaldéhyde (Morris et al., 2021). Les travaux de Nair et al. ont également mis en évidence un impact délétère des e-liquides aromatisés au menthol sur la prolifération cellulaire des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B (Nair et al., 2020).

Dans les modèles 3D et de coculture décrits par Effah et al. et Sabo et al., les valeurs de résistance transépithéliale, qui sont inversement corrélées à la perméabilité paracellulaire, ont diminué de manière significative après exposition aux e-liquides aromatisés (fruits rouges, menthol, cannelle, tabac vanillé) (Effah et al., 2023; Sabo et al., 2023).

Par exposition aux aérosols piégés composés de véhicules PG/VG dans du milieu de culture cellulaire, Hwang et al. ont mis en évidence une augmentation de la cytotoxicité (libération de LDH) et de la

mort cellulaire mesurée par un marquage au bleu de trypan de la coculture composée de cellules épithéliales alvéolaires A549 et de kératinocytes HaCaT (Hwang et al., 2016).

Enfin, des études ont démontré des effets cytotoxiques similaires après une exposition directe aux aérosols de cigarette électronique selon une méthode ALI. Une exposition directe aux véhicules aérosolisés par un dispositif Cultex® sur des cellules épithéliales bronchiques NHBE a induit une diminution du nombre de cellules sécrétant le mucus, ainsi qu'une diminution de leurs fonctions sécrétrices. Il a également été décrit une augmentation de l'expression de cytokératine pouvant être à l'origine d'une différenciation des cellules épithéliales (Aufderheide and Emura, 2017). Rouabhia et al. ont également décrit des différences morphologiques et une baisse de la viabilité cellulaire pour les cellules épithéliales nasales en monocouche et pour leur modèle 3D de muqueuse nasale après une exposition à de l'aérosol aromatisé au tabac (Rouabhia et al., 2020). Les travaux de Kim et al. ont été menés sur des cellules épithéliales bronchiques humaines HBECs exposées à des aérosols de VG par le biais d'un dispositif Vitrocell®. Une augmentation de la sécrétion de mucus et une diminution de la fréquence des mouvements ciliaires ont pu être mises en évidence (Kim et al., 2022). Manna et al. ont également mis en évidence une diminution de la population de cellules multiciliées en région nasale après exposition aux aérosols de PG/VG (Manna et al., 2024). D'autres cellules épithéliales, les cellules Calu-3, ont été exposées à des aérosols d'e-liquides composés de véhicules seuls ou aromatisés à la noisette et à la cannelle. Cette exposition a induit une augmentation de la libération de LDH et une diminution de la résistance transépithéliale (Effah et al., 2023). Enfin, la composante immunitaire des voies aériennes semble également être touchée. Matsumoto et al. ont démontré dans leurs travaux exposant des macrophages alvéolaires humains à des aérosols d'acétate de vitamine E pur, qu'il y avait une augmentation de la mort cellulaire ainsi que des altérations morphologiques et fonctionnelles de macrophages, touchant notamment leur capacité d'efferocytose (Matsumoto et al., 2022).

Tableau 3 : Études in vitro ciblant la toxicité des véhicules et arômes présents dans les e-liquides pour cigarettes électroniques

Modèle in vitro	Conditions expérimentales	Investigations	Résultats majeurs (par rapport au CTL)	Référence
Cellules épithéliales trachéobronchiques normales (hTBE) (culture primaire)	Exposition à l'e-liquide par dilution à différentes concentrations : 0,01 ; 0,1 et 0,3 % pendant 24 et 48h E-liquide aromatisé au tabac et sans nicotine	Cytotoxicité, expression de marqueurs inflammatoires, susceptibilité à l'infection par le rhinovirus humain	Pas d'effet cytotoxique. Augmentation de la production d'IL-6 à 0,3 % à 24 et 48h. Infection au rhinovirus favorisée à 6 et 24h ainsi que l'induction de la production d'IL-6 suite à l'infection. Diminution de l'expression de protéines antimicrobiennes	Wu et al., 2014
Cellules épithéliales bronchiques humaines H292 (lignée cellulaire) Fibroblastes pulmonaires humains fœtaux HFL1 (lignée cellulaire) Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B (lignée cellulaire)	Exposition à différents types d'e-liquides (véhicules seuls, e-liquides aromatisés, etc.) par dilution dans le milieu de culture et par Interface Air-Liquide (ALI) Puffs de 4 secondes espacés de 30 secondes pendant 5, 10 ou 15 minutes	Génération de H ₂ O ₂ et stress oxydant cellulaire général, morphologie cellulaire, réponse inflammatoire	Production élevée de H ₂ O ₂ et d'autres espèces oxydantes par les ENDS. Activité pro-oxydante plus importante pour les e-liquides aromatisés et particulièrement ceux fruités, sucrés. Altérations morphologiques des fibroblastes pulmonaires humains après exposition par dilution aux e-liquides. Augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) notamment avec l'arôme cannelle	Lerner et al., 2015
Neutrophiles humains isolés du sang périphérique de patients	Piégeage d'un aérosol dans du milieu de culture : puffs de 10 secondes espacés de 30 secondes pendant 13 minutes Exposition à des e-liquides aromatisés au tabac	Expression des marqueurs inflammatoires et de protéases matricielles	Augmentation de la métalloprotéinase MMP-9 et de cytokine IL-8	Higham et al., 2016
Kératinocytes humains HaCaT (lignée cellulaire) Cellules épithéliales alvéolaires de type II humaines A549 (lignée cellulaire) Neutrophiles humains isolés du sang périphérique	Piégeage d'un aérosol dans du milieu de culture : 30 puffs, pendant 15 min Exposition à des e-liquides composés de véhicules PG et VG	Investigation des fonctions antimicrobiennes et de la cytotoxicité induite par les e-liquides	HaCaT et A549 en coculture : augmentation de la cytotoxicité et de la mort cellulaire après exposition aux véhicules aérosolisés Neutrophiles : Diminution des fonctions antimicrobiennes après exposition aux véhicules PG/VG aérosolisés	Hwang et al., 2016

Cellules épithéliales bronchiques humaines NHBE immortalisées : CL-1548	Cultex RFS module 50 puffs de 2 secondes espacés de 10 secondes 8 cycles d'exposition : pendant 5 jours consécutifs puis un arrêt de 2 jours avant 3 derniers jours consécutifs d'exposition Exposition à des e-liquides composés de véhicules PG et VG	Changements phénotypiques cellulaires, sécrétion de mucus	Diminution des cellules sécrétant du mucus (dont les cellules club), et diminution de leurs activités sécrétrices (MUC5AC et MUC5B), augmentation de l'expression de cytokératine (possible différenciation des cellules épithéliales)	Aufderheide and Emura, 2017
Lignée monocyttaire humaine (THP-1) différenciée en macrophages	Piégeage d'un aérosol dans du milieu de culture : 50 puffs de 3 secondes espacés de 5 secondes E-liquides aromatisés à la pomme et véhicules seuls (PG, VG ou PG/VG)	Capacités phagocytaires des macrophages, expression de récepteurs de l'immunité innée et de cytokines	Pas de cytotoxicité induite par l'aérosol piégé. Diminution de la capacité phagocytaire des macrophages et de l'expression de leurs récepteurs de l'immunité innée après exposition aux e-liquides aromatisés (contrairement aux véhicules seuls et combinés). Augmentation de l'expression d'IL-8 contrastée avec la diminution d'un ensemble d'autres cytokines comme l'IL- 6, l'IL-1β ou MCP-1 après exposition aux e-liquides aromatisés (contrairement aux véhicules seuls et combinés)	Ween et al., 2017
Lignée monocyttaire humaine (U937) Lignée mature monocyte-macrophage humain (Mono Mac 6 MM6)	Exposition aux e-liquides par dilution dans le milieu de culture ou par piégeage pour l'étude des ROS Exposition à des agents aromatisants (de 10 à 1 000 μM) et à différents e- liquides à 0,25 et 5 %)	ROS exogènes, expression de cytokines, viabilité cellulaire	Viabilité cellulaire des U937 diminuée après exposition à du Pentanedione, Cinnamaldéhyde, o-vanilline et aux e-liquides aromatisés au melon Viabilité cellulaire des MM6 diminuée après exposition à du Cinnamaldéhyde à la plus forte concentration Libération de ROS exogènes issus des composants aromatiques (Diacétyl, Maltol, Cinnamaldéhyde, etc.) U937 : Modulation de l'expression d'IL-8 selon l'agent aromatisant (diminution à 100 μM d'Acétoïne et augmentation à partir de 100 μM pour les autres) et le type de e-liquide aromatisé	Muthumalag e et al., 2018

Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B (lignée cellulaire) Cellules épithéliales alvéolaires de type II humaines A549 (lignée cellulaire) Tissu EpiAirway™ : modèle 3D de tissu bronchique humain	Exposition aux e-liquides par dilution dans le milieu de culture		Par dilution et aérosols piégés : Induction par le menthol d'influx calciques par activation du récepteur TRPM8 des cellules BEAS-2B, inhibition de la prolifération cellulaire et libération de ROS.	Nair et al., 2020
	Exposition aux aérosols piégés dans du milieu de culture (6 puffs)	Après exposition au menthol par 3 méthodes :	Par exposition à de l'aérosol mentholé non-chauffé et sans véhicules par le Cloud Chamber (Vitrocell®) : Augmentation du stress oxydant, changements morphologiques et augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) des cellules BEAS-2B.	
	Exposition directe aux aérosols en ALI : par Vitrocell® Cloud Chamber ou Cultex® RFS compact exposure module (30 puffs de 4 secondes espacés d'une minute)	Viabilité cellulaire, libération de ROS et de Ca ²⁺ intracellulaire, inflammation	Par exposition du modèle EpiAirway™ à l'aérosol mentholé : Expression de protéines liées au stress oxydant, à l'inflammation, aux fonctions mitochondriales, à la tumorigenèse. Augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8)	
Muqueuse nasale humaine conçue à partir de cellules épithéliales nasales et fibroblastes humains issus de patients sains	Exposition via une chambre d'aérosolisation		Changements morphologiques et diminution de la viabilité cellulaire des cellules épithéliales nasales en monocouche	Rouabhia et al., 2020
	2 expositions/j pendant 3 j : puff de 5 secondes toutes les 30 secondes pendant 15 minutes E-liquides composés de PG/VG (50/50) avec arôme tabac	Altérations structurelles, viabilité et prolifération cellulaire, réponses inflammatoires	Changement structurel, diminution de la prolifération cellulaire et augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires de la muqueuse nasale (coculture)	
Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B (lignée cellulaire) Lignée monocyttaire humaine (THP-1) différenciée en macrophages alvéolaires	Exposition aux composés aromatisants par dilution dans un mélange PG/VG 50/50 dilué dans du PBS	Viabilité cellulaire, génération de ROS	Viabilité cellulaire drastiquement réduite et augmentation de la génération de ROS pour les différentes lignées après exposition à certains composés aromatiques comme le cinnamaldéhyde, le décanal, l'eugénol, le nonanal et la vanilline. L'éthyl-maltol, le butyrate d'éthyle et l'hexanal responsables d'une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules THP-1	Morris et al., 2021

Cellules épithéliales bronchiques humaines HBECS (culture primaire)	Exposition directe aux aérosols en ALI via le dispositif VC1 de Vitrocell® 2 sessions/j de 50 puffs de 3 secondes espacés de 20 secondes : pendant 5 à 7 j consécutifs E-liquides composés de VG 100 %	Viabilité cellulaire, inflammation, sécrétion de mucus et mouvements ciliaires	Augmentation de la sécrétion de mucus, diminution de la fréquence des mouvements ciliaires. Pas de cytotoxicité apparente. Dysfonction du canal CFTR : altération de la fluidité membranaire et de la sécrétion de mucus. Augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires	Kim et al., 2022
Macrophages alvéolaires humains (culture primaire)	Exposition via une chambre d'aérosolisation 10 puffs pendant 1 minute, puis 1 puff toutes les 30 secondes pendant 1 heure/j pendant 3 jours consécutifs Acétate de vitamine E pur	Viabilité cellulaire, inflammation, altérations fonctionnelles des macrophages	Augmentation de la mortalité cellulaire, altérations structurelles et fonctionnelles (diminution de la capacité d'efférocytose) des macrophages et de la production de cytokines pro-inflammatoires	Matsumoto et al., 2022
Cellules épithéliales humaines des voies respiratoires Calu-3 (lignée cellulaire)	Exposition aux e-liquides par dilution ou par exposition aux aérosols 60 puffs de 5 secondes toutes les 30 secondes E-liquides aromatisés à la noisette, à la cannelle ou au tabac vanillé ou véhicule seul (PG/VG 60/40)	Viabilité cellulaire, mesure de la résistance trans-épithéliale, stress oxydant	Par dilution : Diminution de la résistance transépithéliale après exposition par dilution au PG/VG seul et aux e-liquides tabac vanillé et cannelle. Tendance à l'augmentation de la mort cellulaire après expositions aux e-liquides. Diminution de la production de ROS après exposition au e-liquide aromatisé à la cannelle. Par exposition aux aérosols : diminution de la résistance transépithéliale et augmentation de la mort cellulaire après exposition aux aérosols de véhicule PG/VG ou d'e-liquides aromatisés à la cannelle et à la noisette	Effah et al., 2023
Cellules endothéliales de la microvascularisation pulmonaire HULEC-5a (lignée cellulaire) Cellules épithéliales alvéolaires de type II NCI-H441 (lignée cellulaire)	Exposition par dilution des e-liquides dans le milieu de culture E-liquides composés aromatisés au tabac blond, menthe-eucalyptus et fruits rouges (ratio PG/VG 76/24)	Résistance transépithéliale, viabilité cellulaire, stress oxydant mitochondrial, inflammation	Modulation de l'expression de protéines de jonction comme l'occludine après exposition aux véhicules. Augmentation du stress oxydant mitochondrial, de la mort cellulaire et diminution de l'intégrité de la barrière après exposition à des e-liquides aromatisés à la menthe-eucalyptus et aux fruits rouges. Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires après exposition à l'e-liquide aromatisé à la menthe-eucalyptus	Sabo et al., 2023

Cellules épithéliales nasales humaines HNEC (culture primaire)	Exposition via une chambre d'aérosolisation		Diminution de la population de cellules caliciformes, des cellules progénitrices et des cellules multiciliées après exposition au PG/VG.	Manna et al., 2024
	Chaque jour pendant 2, 4 ou 5 semaines : 10 cycles avec 1 puff de 8 secondes espacés de 60 secondes	Viabilité, prolifération cellulaire, inflammation	Augmentation de la population de cellules caliciformes après exposition à l'acétate de vitamine E	
	E-liquide composé d'un mélange PG/VG 50/50 ou acétate de vitamine E utilisé seul		Augmentation de cytokines pro-inflammatoires après exposition au PG/VG et à l'Acétate de Vitamine E	

○ **Impact clinique de l'utilisation des cigarettes électroniques**

Les différentes investigations menées, tant sur les modèles in vivo qu'in vitro, démontrent bien que les aérosols d'e-cigarettes ne sont pas sans innocuité sur les systèmes biologiques. En effet, de nombreux processus physiopathologiques ont pu être mis en évidence comme l'augmentation du stress oxydant, la mise en place d'un processus inflammatoire, des remodelages tissulaires et des altérations des fonctions cellulaires. De plus, les métaux lourds identifiés dans les aérosols d'e-cigarettes, comme le cadmium et le manganèse, présentent des risques majeurs pour les consommateurs. En effet, ces éléments peuvent être à l'origine de processus de carcinogenèse et de toxicité par bioaccumulation dans certains organes comme les reins (Rantaša et al., 2025). Cependant, aucun lien direct n'a encore été établi entre l'utilisation de ENDS et le développement de cancer du poumon chez l'homme (Petrella et al., 2025). D'autres pathologies ont, au contraire, été associées de manière directe au vapotage. En effet, en 2019, une nouvelle pathologie pulmonaire a été identifiée chez des sujets jeunes et vapoteurs. La pneumopathie associée au vapotage (EVALI en anglais pour E-cigarette or Vaping use Associated Lung Injury). Elle se caractérise par une altération des structures alvéolaires, une réduction du débit respiratoire et une inflammation aigüe. Elle a émergé lors de l'utilisation d'acétate de vitamine E dans des e-liquides « fait maison » pour consommer de manière illicite du THC. La présence d'acétate de vitamine E dans les liquides a été mise en cause dans l'apparition de ce type de pneumopathie (Petrella et al., 2025). Un autre type de pneumopathie, proche d'EVALI, a été décrit : la bronchiolite oblitérante ou « maladie du popcorn ». Cette dernière est principalement causée par l'inhalation de diacétyl (arôme beurre) dans l'industrie

agroalimentaire. Cependant, le diacétyl présent dans le liquide pour cigarettes électroniques pourrait entraîner les mêmes effets (Carey et al., 2024). Cette pathologie se caractérise par une inflammation chronique du tissu pulmonaire et une fibrose des bronchioles. Une cohorte a montré que l'utilisation de cigarettes électroniques est associée à un risque accru de développer des maladies respiratoires telles que la BPCO, de l'asthme ou un emphysème pulmonaire (Xie et al., 2020).

Le système cardiovasculaire est également impacté par l'utilisation des ENDS. En effet, les différents constituants des e-liquides peuvent interagir avec le système cardiovasculaire. Ils peuvent être à l'origine de dysfonction endothéliale, de thrombogenèse, d'effets hémodynamiques aigus et plus largement d'infarctus et maladies coronaires (Buchanan et al., 2020; Neczypor et al., 2022) (Figure 19).

Tous ces éléments et pistes biologiques renforcent la nécessité d'identifier plus clairement les processus physiopathologiques pouvant être engendrés par l'inhalation de tels produits. Par ailleurs, il est important d'investiguer la répartition des rôles joués par la nicotine et chaque type d'arôme contenu dans les e-liquides. Ainsi, il paraît également indispensable d'identifier clairement les agents chimiques ou aromatiques pouvant être responsables des réponses pathologiques décrites par l'ensemble des études menées.

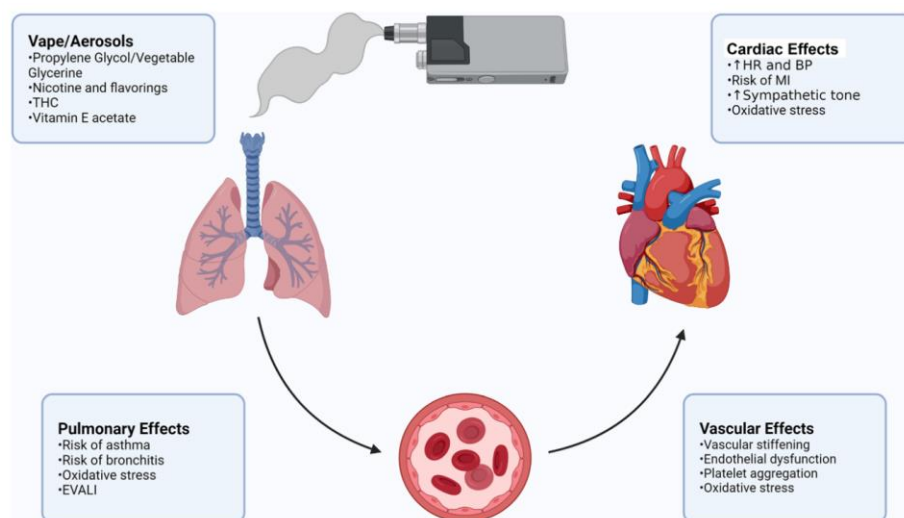


Figure 19: Représentation schématisée des effets cardiopulmonaires liés à l'utilisation de cigarettes électroniques (Neczypor et al., 2022)

OBJECTIFS DE LA THESE

II. Objectifs de la thèse

Les cigarettes électroniques sont régulièrement présentées comme une alternative moins nocive que les cigarettes classiques. Initialement destiné aux personnes souhaitant arrêter le tabac, le vapotage a rapidement connu un essor important et s'est orienté vers un public jeune et parfois non-fumeur. Beaucoup de jeunes consommateurs ne perçoivent pas la cigarette électronique comme un produit potentiellement toxique, et justifient leur utilisation notamment par leur praticité et discrétion. Cette large consommation peut s'expliquer en partie par la diversité des arômes proposés aux consommateurs dont certains peuvent être décrits comme récréatifs. Parmi ces derniers, certains sont largement plébiscités par les consommateurs comme les arômes mentholés et fruits rouges. Le marché des e-liquides ne cesse de croître et de se développer, notamment par l'élaboration de mélanges aromatiques de plus en plus complexes et originaux. Comme certaines études *in vitro* et *in vivo* l'ont démontré, les e-liquides sans nicotine aromatisés peuvent représenter un réel risque pour le système respiratoire et d'autres systèmes biologiques comme les fonctions cardiovasculaires. En effet, certains composés aromatiques semblent participer à différents processus physiopathologiques tels que la dérégulation du système de stress oxydant, de l'inflammation ou l'altération fonctionnelle et structurelle des voies aériennes. Ces études ont pu être menées selon différentes méthodes d'expositions : par exposition aux e-liquides, aux e-liquides piégés et aux aérosols.

Au regard de ces différentes observations, il paraît nécessaire de poursuivre les études menées sur les effets potentiels de ces e-liquides chez l'Homme en prenant en compte la popularité de certains mélanges d'arômes. C'est pourquoi mes travaux porteront sur l'étude des e-liquides aromatisés aux fruits rouges. Pour répondre aux différentes questions et problématiques, ce projet de thèse vise à répondre aux objectifs suivants :

- (1) Développer puis valider phénotypiquement et fonctionnellement un modèle cellulaire de coculture mimant la barrière alvéolo-capillaire afin de les exposer aux e-liquides et aérosols aromatisés aux fruits rouges. Le projet vise également à mettre en place 3 méthodes

d'exposition différentes en vue de comparer leurs toxicités cellulaires respectives. L'étude de cytotoxicité se focalisera sur l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire, la viabilité et activité métabolique cellulaire, ainsi que le stress oxydant mitochondrial. Enfin, le modèle cellulaire de coculture sera optimisé à l'aide d'une composante immunitaire essentielle en condition physiologique.

- (2) Développement de méthodes de chromatographie en phases gazeuse et liquide en vue d'identifier des composés aromatiques spécifiques à l'aérosolisation de chaque arôme de fruits rouges afin de les mettre en relation avec des toxicités observées sur le modèle cellulaire de coculture.

MATERIELS ET METHODES

III. Matériels et méthodes

III.1. Mise en place du modèle in vitro et étude des toxicités

III.1.1. Dispositifs utilisés et mise en place des méthodes d'exposition

III.1.1.a. E-cigarette et e-liquides utilisés

Lors de ces expérimentations, un seul type d'e-cigarette a été utilisé et les différents éléments (e-cigarettes et e-liquides) ont été fournis par la société GAIATREND. Ce dispositif est une cigarette électronique de troisième génération iStickTC40W de la marque Eleaf®. Un clearomiseur RIOK® d'un volume stock de e-liquide de 2 mL ainsi que des résistances Mesh de 0,7 Ohm ont été choisis.

Le voltage des e-cigarettes a été fixé à 3V, soit une puissance d'environ 11 watts.

Les e-liquides utilisés dans le cadre de ces travaux sont composés d'un ratio 76/24 en PG/VG. Ces e-liquides ont été aromatisés par 4 arômes distincts : un e-liquide aromatisé à la fraise, un aromatisé à la framboise, un aromatisé à la mûre et enfin un aromatisé à la myrtille. Les arômes ont été filtrés à l'aide d'un filtre 0,22 µm avant l'exposition sur les cellules pour garantir une stérilité.

Les différents e-liquides ont été élaborés directement en laboratoire à partir des différentes matières premières : PG, VG et mélanges aromatiques. L'éthanol a été ajouté comme additif au mélange pour les e-liquides aromatisés à la framboise, mûre et myrtille.

III.1.1.b. 1^{ère} méthode d'exposition : par dilution

La première méthode d'exposition utilisée est basée sur la dilution du e-liquide dans le milieu de culture cellulaire et une exposition du modèle cellulaire pendant 24h. Plusieurs concentrations d'e-liquides ont été préparées allant de 0,2 à 10 %. Dans le cas de la coculture, les solutions issues de la dilution des e-liquides dans le milieu sont déposées en région apicale de l'insert qui correspond au compartiment alvéolaire (volume de dépôt = 200 µL) (Figure 20).

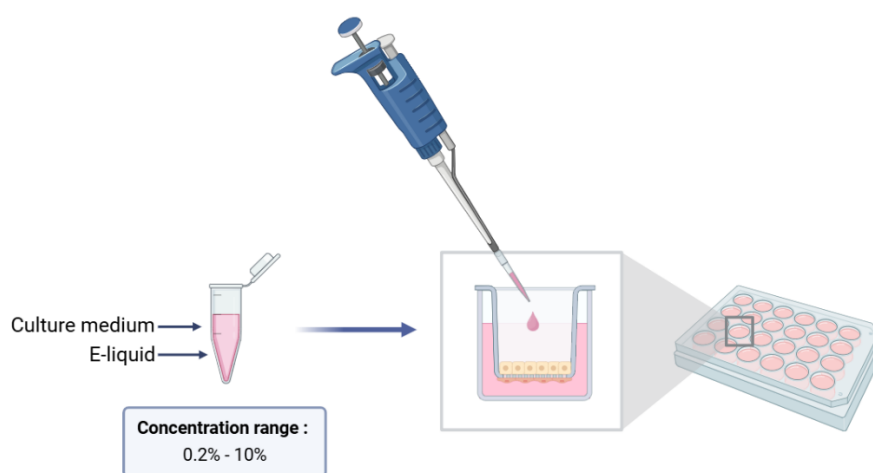


Figure 20 : Schéma illustrant la méthode d'exposition par dilution (créée sur Biorender.com)

III.1.1.c. 2^{ème} méthode d'exposition : par piégeage de l'aérosol dans le milieu de culture cellulaire

La seconde méthode d'exposition se base sur le piégeage d'un aérosol dans du milieu de culture sans sérum ou dans une solution saline HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). L'aérosol est produit par activation manuelle de la cigarette électronique. Cette dernière est reliée par un tube en silicone à une pompe péristaltique Flexicon® PF6-B dont le débit est fixé à 480 mL/min. Le barboteur ou, flacon laveur de gaz, est composé d'un verre fritté de porosité 2. Le protocole de génération de puffs est standardisé suivant les recommandations CORESTA ("Routine Analytical Machine for E-Cigarette Aerosol Generation and Collection - Definitions and Standard Conditions | CORESTA," 2015) : un puff de 3 secondes est produit toutes les 30 secondes en faisant varier le nombre total de puffs de 10, 20, 30, 60, 120 à 240 puffs. La concentration maximale de 240 puffs a été retenue afin d'assurer une cohérence avec la consommation quotidienne moyenne observée chez les vapoteurs, estimée entre 200 et 300 puffs par jour.

Le milieu de culture dans lequel a été piégé l'aérosol est ensuite, dans le cas de la coculture, déposé en région apicale de l'insert cellulaire pendant 24h (volume de dépôt = 200 µL) (Figure 21).

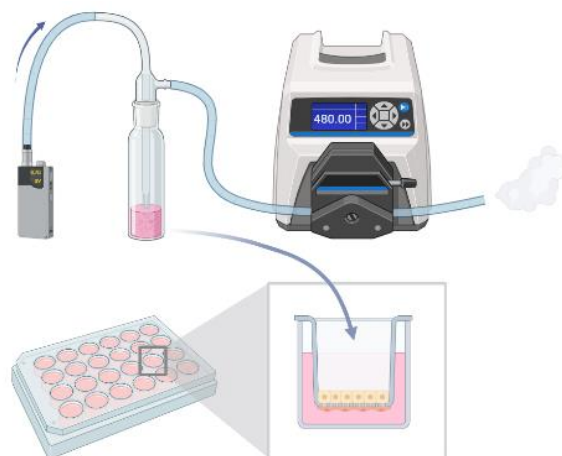


Figure 21 : Schéma illustrant la méthode d'exposition par piégeage de l'aérosol dans le milieu de culture cellulaire sans sérum (créée sur Biorender.com)

III.1.1.d. 3^{ème} méthode d'exposition : par exposition directe des cellules à l'aérosol

La troisième méthode d'exposition consiste à exposer de manière directe le modèle de coculture à l'aérosol via un appareil Vitrocell®. Le dispositif choisi est le modèle de machiner à fumer (Smoking Machine) VC1 complété par un module d'exposition 24/6 (Figure 22). Ce dernier permet d'utiliser des inserts cellulaires 24 puits et d'exposer les cellules aux aérosols générés par la machine à fumer. Six inserts peuvent être exposés simultanément : 3 sont exposés à l'air et 3 sont exposés à l'aérosol d'e-cigarette choisi pour l'expérimentation.

La smoking machine permet, par l'intermédiaire d'un enclenchement automatisé de l'e-cigarette et d'un piston, de produire et de transporter l'aérosol formé à travers les différentes tubulures. Cette automatisation est possible grâce au logiciel Smoke Robot Control permettant de régler différents paramètres comme le type de profil de puff, le volume de puff, la durée d'exposition et le nombre total de puffs. Pour ces expérimentations, le volume et la durée du puff ont été fixés à, respectivement, 55 mL et 3 secondes ("Routine Analytical Machine for E-Cigarette Aerosol Generation and Collection - Definitions and Standard Conditions | CORESTA," 2015). Les puffs ont été espacés de 30 secondes et le nombre total de puffs a été fixé à 10, 20, 30, 60, 120 et 240 puffs, de la même manière que pour la seconde méthode d'exposition (piégeage de l'aérosol). Le profil utilisé pour les puffs est un profil en cloche. Cela consiste à faire varier le volume de l'aérosol pendant la durée du

puff (3 secondes) : il est initialement faible, puis augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale avant de diminuer progressivement. Les aérosols, dilués avec de l'air stérile, sont conduits et répartis de manière homogène vers le module d'exposition et les inserts grâce à un flux continu d'air.

En amont de l'exposition des cellules, le module d'exposition a été préalablement rempli avec du milieu de culture en région basolatérale de l'insert et chauffé à une température de 37°C. De cette manière, les cellules sont maintenues dans des conditions de température et humidité optimales afin d'éviter un stress cellulaire pouvant interférer avec les expérimentations découlant de ces expositions. Une fois les expositions finalisées, les inserts cellulaires sont placés dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO₂ pendant 24 heures avant d'être utilisés pour les différents tests.

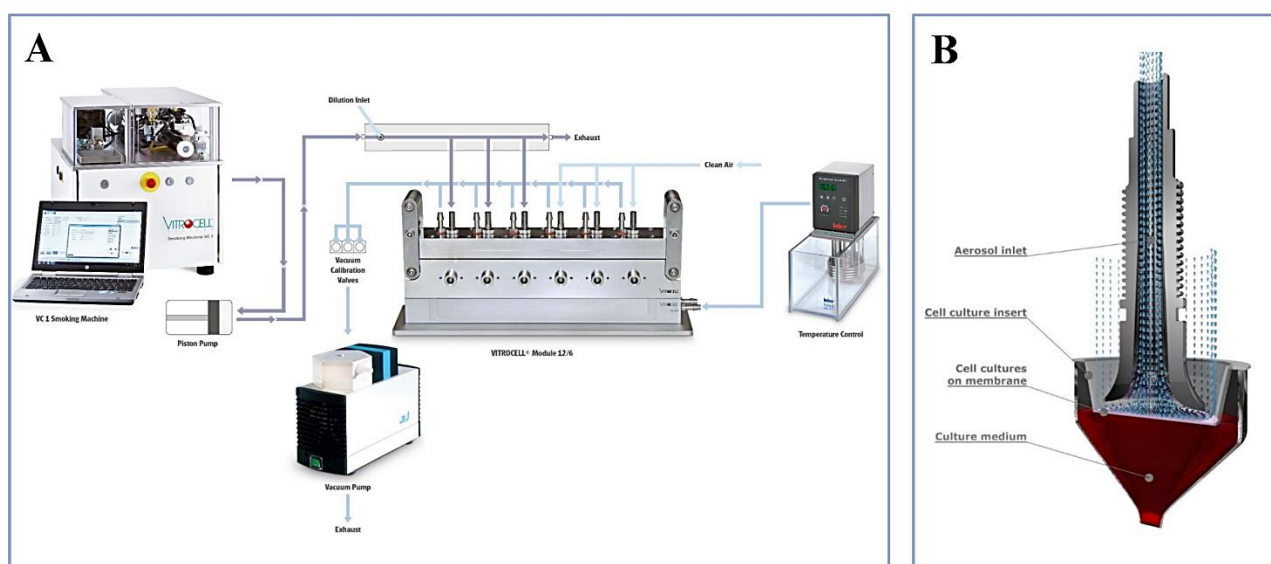


Figure 22 : (A) Représentation schématisée du principe et fonctionnement de l'appareil Vitrocell® VC1 Smoking machine et son module d'exposition (B) Figure illustrant le principe de l'interface Air-Liquide générée dans le module d'exposition (illustrations fournies par Vitrocell®)

III.1.2. Culture cellulaire

III.1.2.a. Lignée épithéliale alvéolaire NCI-H441

Afin de mimer le compartiment alvéolaire de la BAC, la lignée humaine épithéliale NCI-H441 a été utilisée (ATCC® HTB-174™). Il s'agit de cellules épithéliales alvéolaires de type II issues d'un patient atteint d'un adénocarcinome papillaire. Les cellules NCI-H441 sont maintenues dans du milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 0,5 % d'antibiotiques à

spectre large (Pénicilline-Streptomycine, Pen-Strep® 10 000 U/mL-10 000 µg/mL). Elles sont entretenues dans des conditions stériles dans des flasques de 75 cm² à 37°C avec un apport en CO₂ de 5 %. Les expérimentations ont été menées avec des cellules ayant moins de 25 passages.

III.1.2.b. Lignée endothéliale HULEC-5a

Au début des expérimentations, la lignée humaine HULEC-5a (ATCC® CRL-3244™), correspondant à des cellules endothéliales de la microvascularisation pulmonaire, a été utilisée. Ces cellules, issues d'un poumon sain, ont été immortalisées par transfection du vecteur pSVT contenant le gène 40A codant pour l'oncoprotéine SV40 large T antigen. Les cellules HULEC-5a sont maintenues dans du milieu de culture MCDB131 enrichi en SVF (10 %), antibiotiques Pen-Strep® (0,5 %), glutamine (10 mM), facteur de croissance épidermique EGF (10 ng/mL) et hydrocortisone (1 µg/mL). Les cellules ont été maintenues dans des conditions stériles à 37°C et 5 % CO₂ dans des flasques de 75 cm².

Cette lignée a été précédemment utilisée au sein du laboratoire. Son utilisation pour le projet a donc été initialement envisagée (Sabo et al., 2023). Cependant, plusieurs mois après le début des expérimentations sur les e-liquides aromatisés aux fruits rouges, des difficultés ont été rencontrées avec les cellules HULEC-5a. En effet, la croissance ralentie et le phénotype devenu instable des HULEC-5a ne nous permettaient plus de procéder à des expérimentations reproductibles et robustes. Il a donc été envisagé de commander un nouveau lot de cellules, mais plusieurs directives et réglementations internationales ont récemment limité l'importation de cellules de niveau 2 de sécurité biologique. Nous avons donc été contraints à devoir développer un nouveau modèle de coculture avec une autre lignée endothéliale.

III.1.2.c. Lignée endothéliale EA.hy926

La lignée cellulaire humaine choisie pour remplacer les cellules HULEC-5a est la lignée EA.hy926 (ATCC® CRL2922™). Ces cellules sont des cellules endothéliales issues de la fusion de cellules primaires de la veine ombilicale humaine HUVEC avec un clone résistant à la thioguanine de la lignée

A549 (cellules épithéliales alvéolaires de type II). Ces cellules sont maintenues dans du milieu DMEM supplémenté avec du SVF (10 %), des antibiotiques Pen-Strep[®] (0,5 %) et du Glutamax[™] (4 mM). Elles ont été entretenues en conditions stériles dans des flasques de 75 cm² à 37°C et 5 % CO₂. Le nombre de passage n'a pas excédé un nombre de 25 lors des expérimentations.

III.1.2.d. Lignée monocyttaire THP-1

Afin de représenter la composante immunitaire présente en région alvéolaire, nous avons souhaité mettre au point un protocole permettant d'obtenir des cellules macrophagiques. La lignée cellulaire choisie est la lignée THP-1 (ATCC[®], TIB-202[™]). Ce sont des cellules monocytaires humaines issues d'une leucémie monocyttaire aiguë. Les cellules, en suspension, sont maintenues dans des flasques de 75 cm² dans du milieu RPMI-1640 complété à 10 % en SVF et 0,5 % en antibiotiques Pen-Strep[®].

III.1.2.e. Mise en place de la coculture : validation phénotypique et fonctionnelle

Le modèle de coculture mis en place se base sur l'utilisation d'un insert cellulaire Transwell[®] composé d'une membrane microporeuse (pores de 0,4 µm ; 1x10⁸ pores/cm²) pour des plaques de 24 puits. En effet, le modèle de coculture est élaboré en ensemençant de part et d'autre de l'insert cellulaire la lignée épithéliale NCI-H441 et la lignée endothéliale EA.hy926. A J0 les cellules endothéliales EA.hy926 sont ensemencées sur un insert inversé (30 µL) à une concentration cellulaire égale à 1,67x10⁶ cellules/mL. Après 4h dans une étuve à 37°C et 5 % CO₂, l'insert est renversé et est placé dans une plaque 24 puits dans laquelle du milieu spécifique des EA.hy926 a été placé en région basolatérale (800 µL) puis en région apicale de l'insert (200 µL). A J2, les cellules NCI-H441 sont ensemencées en région apicale de l'insert à une densité de 2,5 x 10⁵ cellules/mL. A partir de J2, les deux lignées cellulaires partagent un milieu commun. Ce dernier, placé en région apicale et basolatérale de l'insert, est composé de DMEM et de RPMI-1640 complétés dans un ratio 50/50, auquel est ajouté de l'hydrocortisone (concentration finale 1 µg/mL). C'est à J8 que les expositions peuvent être effectuées. Après les protocoles d'exposition, les cellules sont laissées 24h dans un

incubateur à 37°C et 5 % CO₂. Le lendemain, à J9, les différentes investigations comme les tests de cytotoxicités peuvent être menées (Figure 23). Les milieux ont été changés tous les deux jours en amont des expositions et investigations.

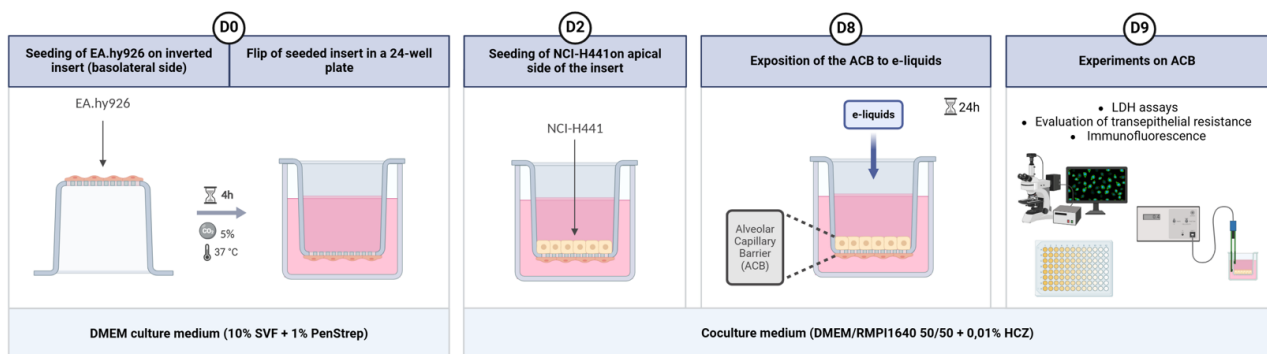


Figure 23 : Mise en place du modèle de coculture mimant la barrière alvéolo-capillaire (Filaudeau et al., soumis pour publication)

Avant de pouvoir utiliser ce modèle cellulaire, il a été validé sur le plan phénotypique et fonctionnel afin de vérifier que la coculture est un modèle valide et pertinent de BAC.

○ Validation phénotypique

Pour cela, nous avons dans un premier temps procédé à une validation phénotypique du modèle pour nous assurer que les différentes lignées cellulaires expriment des marqueurs spécifiques des cellules épithéliales et endothéliales. Pour la lignée NCI-H441, cellules épithéliales alvéolaire de type II, l'expression de plusieurs ARN messagers (ARNm) et protéines a été investiguée dont les protéines du surfactant SP-A et SP-D, et les protéines de jonctions cellulaires comme l'occludine et zonula occludens 1 (ZO-1). Pour la lignée EA.hy926, l'expression de l'ARNm codant pour eNos, le facteur de Willebrand (vWF) et le cluster de différenciation CD31 et leur traduction en protéines ont été investiguées.

Pour ce faire, l'expression des ARNm a été étudiée par méthode de transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative (qRT-PCR). L'ensemble du protocole est détaillé dans l'article page 112.

L'expression des différentes protéines a été investiguée par Western Blot et immunofluorescence. Les protocoles relatifs à ces deux expérimentations sont décrits dans l'article Filaudeau et al., soumis pour publication (page 112).

○ **Validation fonctionnelle**

Une fois la caractérisation phénotypique effectuée, le modèle de coculture a été validé d'un point de vue fonctionnel. Pour ce faire, l'intégrité de la barrière a été évaluée par l'intermédiaire de la mesure de la résistance transépithéliale électrique (TER). Cette méthode de référence, non-invasive, permet de valider le modèle de coculture avant chaque expérimentation et d'évaluer l'impact des expositions sur l'intégrité de la barrière. Une diminution des valeurs de TER est synonyme d'une diminution de l'intégrité de la barrière in vitro accompagnée d'une potentielle baisse de l'expression des protéines des jonctions cellulaires. L'intégrité de la barrière mimée par la coculture a été évaluée dans différentes conditions de culture et a permis de valider le protocole d'ensemencement des deux lignées, ainsi que la temporalité liée aux expositions (Filaudeau et al., article soumis pour publication). La TER a été mesurée par l'intermédiaire d'un ohmmètre épithélial Evom2® (World Precision Instruments, Hitchin, UK) connecté à des électrodes STX2. Les valeurs de TER relevées sont multipliées par la surface de l'insert et exprimées en Ohm.cm².

○ **Expression de la protéine du surfactant SP-D**

Les concentrations de SP-D exprimées par les cellules NCI-H441 et la coculture ont été mesurées par un kit de dosage ELISA) (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; SP-D SingleStep ELISA® kit (#ab239431)). Ce dosage a été réalisé à partir du surnageant de culture cellulaire. La coculture a été ensemencée sur l'insert comme expliqué précédemment. Au jour 9, le surnageant de la région apicale de l'insert a été prélevé et conservé à -20°C (recommandations du fournisseur), pour mesurer la quantité de protéine SP-D sécrétée par les cellules épithéliales NCI-H441 en monoculture et en coculture. La protéine est capturée par un anticorps de capture fixé au support de la plaque à 96 puits, et sera reconnue par un anticorps de détection lié à l'enzyme HRP (Horseradish Peroxidase). Après addition du substrat HRP, le TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine), une réaction enzymatique génère

un signal colorimétrique proportionnel à la quantité de protéine SP-D, mesurable à 450 nm par spectrophotométrie. Les concentrations sont calculées à partir des résultats obtenus avec la gamme standard et sont normalisées par rapport à la concentration en protéines totales. Pour chaque expérience, les échantillons et les points de la gamme ont été préparés en double.

III.1.2.f. Optimisation du modèle par l'ajout d'une composante immunitaire : les cellules THP-1

L'inflammation occupe une place majeure dans les processus cellulaires mis en place après exposition aux e-liquides (Han et al., 2023). Il paraît donc intéressant d'ajouter une composante immunitaire à notre modèle de coculture. Dans les voies respiratoires inférieures, les macrophages alvéolaires sont des acteurs clés des réponses immunitaires et représentent la première ligne de défense contre les agressions exogènes (particules fines, composés chimiques) (DeFranco et al., 2009; Lugg et al., 2022). Ces macrophages alvéolaires peuvent se polariser en différents phénotypes dont le phénotype M1 qui correspond à une activation classique du macrophage M0 en macrophage pro-inflammation ou en phénotype M2 qui correspond à une activation alternative du macrophage M0. Le macrophage de type M2 est, lui, impliqué dans la réparation et le remodelage tissulaire (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Afin d'optimiser le modèle in vitro de BAC, une partie des travaux de thèse se sont concentrés sur la mise au point d'un protocole de différenciation de monocytes humains en macrophages polarisés soit de type M1 ou de type M2.

L'objectif de cet axe du projet de recherche vise à mettre au point un protocole de différenciation d'une lignée monocyttaire humaine THP-1 en macrophages M0 afin de les polariser vers un profil M1 ou M2 (Figure 24). A plus long terme et une fois le protocole de différenciation/polarisation validé, l'objectif sera d'ensemencer en région apicale, correspondant au compartiment alvéolaire, des macrophages et d'étudier les réponses inflammatoires et cytokiniques découlant des différentes expositions et leurs impacts sur la BAC.

○ **Différenciation des cellules monocytaires en macrophages M0**

Les monocytes THP-1 ont été différenciés en macrophages à l'aide de Phorbol 12-Myristate-13-Acétate (PMA) qui est un puissant activateur réversible de la Protéine Kinase C. L'ensemencement initial de THP-1 a été effectué à partir d'une suspension de 3×10^5 cellules/mL, dans des flacons de culture de 75 cm². Une gamme de concentration de PMA allant de 2,5 à 100 nM a été utilisée afin d'établir la concentration optimale pour le protocole de différenciation. Deux durées de traitement avec le PMA ont été testées : 24 et 48 heures. L'adhésion au support constitue un premier indicateur de réussite d'une différenciation des monocytes, circulants, en macrophages, adhérents. Cela a été évalué par une observation en microscopie optique inversée (EVOS – Fisher Scientific).

○ **Polarisation des macrophages M0 en macrophages M1**

Les cellules adhérentes M0 obtenues ont été mises en culture en présence de lipopolysaccharides (LPS) et d'interféron gamma (IFN- γ), conformément aux protocoles décrits dans la littérature (Genin et al., 2015; Zajac et al., 2013).

Différentes concentrations de LPS (10 pg/mL ; 100 ng/mL ; 250 ng/mL) associées à 20 ng/mL d'IFN- γ et différents temps de traitement (24 et 48 h) ont été testés. Les changements phénotypiques des cellules ont d'abord été validés par microscopie inversée puis par l'analyse des marqueurs moléculaires spécifiques des macrophages M1 par technique de RT-qPCR et d'immunofluorescence.

○ **Polarisation des macrophages M0 en macrophages M2**

Les cellules M0 ont été traitées avec 20 ng/mL d'interleukine-4 (IL-4) et d'interleukine-13 (IL-13) comme cela est décrit dans la littérature (Baxter et al., 2020; Genin et al., 2015; Zajac et al., 2013). Différentes durées de traitement ont été testées : 24 h et 48 h. La validation phénotypique de ces macrophages M2 a été effectuée par technique de qRT-PCR et d'immunofluorescence.

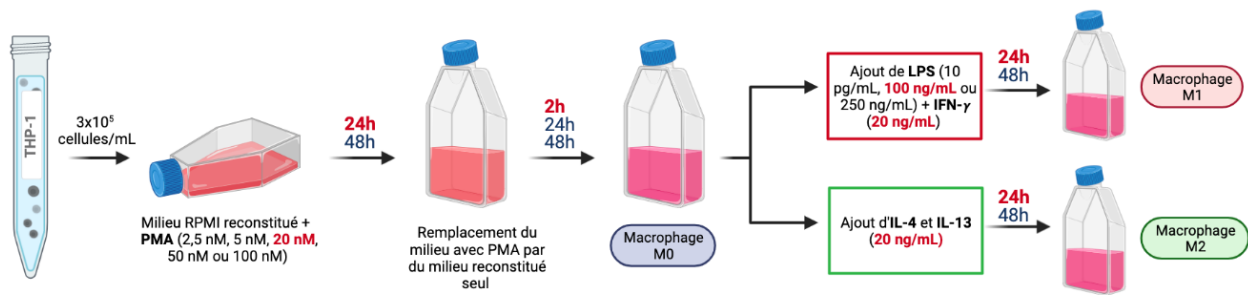


Figure 24: Représentation schématique du protocole permettant l'obtention des sous-types macrophagiques : M0, M1 et M2. Les conditions en rouges sont celles retenues pour la suite des expérimentations (figure créée sur Biorender.com)

○ Recherche des marqueurs spécifiques des populations macrophagiques par qRT-PCR

La qRT-PCR est une méthode semi-quantitative basée sur une réaction de polymérisation en chaîne. Une première étape permet grâce à une enzyme transcriptase inverse de rétrotranscrire l'ARN total en ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est dans une seconde étape amplifié grâce à un couple d'amorces spécifique de l'ARNm ciblé.

L'extraction des ARN totaux des différents types cellulaires (THP-1, M0, M1 et M2) est effectuée avec une solution de TRIzol™ (Life Technologies®). Après retrait du milieu de culture cellulaire, les cellules sont solubilisées dans du TRIzol™ puis les ARN totaux sont isolés grâce à une solution de chloroforme avant d'être précipités par ajout d'isopropanol puis lavés avec une solution d'éthanol/eau ultrapure (75/25, V/V). La concentration d'ARN peut ensuite être quantifiée à l'aide d'un NanoDrop One® (ThermoFisher Scientific®). Les étapes de transcription inverse et d'amplification sont effectuées par l'intermédiaire d'un thermocycleur Bio-rad® (CFX96 – C1000 Touch™). La rétrotranscription des ARNm totaux en ADNc est possible par l'utilisation d'un mix iScript (Bio-rad®) : les échantillons sont chauffés pendant 5 min à 25°C, puis à 46°C pendant 20 min et enfin à 95°C pendant une minute. La dernière étape d'amplification de la séquence cible à l'aide d'amorces spécifiques est effectuée à l'aide d'un mix (SsoAdvanced, Biorad®) renfermant les dNTP, l'ADN polymérase et un indicateur fluorescent, le SYBR Green. Le cycle permettant l'amplification se décompose en 2 grandes étapes : la dénaturation des ADNc (30 secondes à 95°C), puis l'hybridation et l'élongation des amorces (30 secondes à 60°C). Il est répété 45 fois.

Afin d'interpréter les résultats, ces derniers ont été normalisés par rapport à l'expression de l'ARNm de différents gènes de référence dont l'expression est ubiquitaire : le 18S (ref : qHsaCED0037454), la GAPDH (ref : qHsaCED0038674) et l'actine (ref : qHsaCED0005010).

Toutes les amorces proviennent de Bio-rad (Hercule, USA). Les gènes suivants ont été ciblés par qRT-PCR :

- Marqueurs des macrophages M1

- o Arg2 (# qHsaCED0057160),
- o Fpr2 (# qHsaCED0037673),
- o iNos (# qHsaCID001605),
- o IL-1 β (# qHsaCID0022272),
- o IL-12 β (# qHsaCID0016458),

- Marqueurs des macrophages M2

- o Arg1 (#qHsaCED0003959),
- o Erg2 (# qHsaCID0036482),
- o Myc (# qHsaCID0012921),

o **Validation phénotypique des populations macrophagiques par immunofluorescence**

La technique d'immunofluorescence est une méthode semi-quantitative permettant d'évaluer l'expression d'un marqueur protéique cellulaire et d'évaluer sa localisation spatialement dans la cellule.

Dans notre étude, 3 marqueurs, CD11c-PE (#301605, Biolegend®), CD86-APC (#374207, Biolegend®) et CD206-Alexa488® (ab195191, Abcam®), qui marquent respectivement les macrophages M0, M1 et M2, ont été investigués.

Des cellules THP-1 ont étéensemencées à une densité de 3×10^5 cellules/mL dans des chambres de culture sur lame Lab-tek™ II (Thermo Scientific®, France) puis elles ont été traitées avec du PMA et

des cytokines pour obtenir les différents sous-types de macrophages M0, M1 ou M2. Le volume de travail a été de 500 µL par chambre de culture.

Après l'obtention des différents sous-types macrophagiques, le milieu de culture a été retiré de la chambre pour être remplacé par une solution de formaldéhyde à 4 % pendant 15 minutes afin de fixer les cellules. Un lavage de 5 minutes par une solution de tampon phosphate PBS, répété 3 fois, a été réalisé avant l'ajout pendant 60 minutes dans les chambres de culture d'un tampon de blocage (PBS + Sérum de chèvre 5 % + Triton 0,3 %) visant à bloquer les sites aspécifiques de l'anticorps primaire et de perméabiliser les cellules. Une fois le blocage effectué, les solutions d'anticorps cibles sont mises en contact avec les cellules pendant une nuit à 4°C. Chaque anticorps primaire a été dilué (dilution 1/2 000 pour le CD206 ; dilution 1/1 000 pour le CD11c et le CD86) dans une solution de PBS contenant 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) et 0,3 % de Triton. L'anticorps utilisé étant conjugué, c'est-à-dire directement couplé à un fluorochrome (Alexa488®, Allophycocyanine-APC et Phycoérythrine -PE), il n'a pas été nécessaire d'utiliser d'anticorps secondaire. Le lendemain, des lavages de 5 minutes par une solution de PBS, effectués 3 fois, ont été réalisés avant l'ajout de Hoeschst 33258 dilué au 10 000^{ème} pendant 5 minutes afin de marquer l'ADN des noyaux cellulaires. Après 3 derniers lavages de 5 minutes, les lames ont été montées à l'aide d'une lamelle en utilisant un milieu de montage aqueux, le Fluoromount™ (Sigma®). Les lames ont été analysées à l'aide d'un microscope confocal Leica® TCS SP5 MP. Les fluorochromes Alexa488®, PE et APC ont respectivement des longueurs d'onde d'excitation de 495, 561 et 650 nm et des longueurs d'onde d'émission de 519, 578 et 660 nm. Les conditions d'acquisition (intensité d'excitation et amplification de signal émis) ont été les mêmes pour toutes les images acquises afin de mesurer et de pouvoir comparer l'intensité des marquages fluorescents.

III.1.3. Investigations : réponses cellulaires

III.1.3.a. Mesure de l'intégrité de la barrière : Résistance transépithéliale électrique et expression des protéines de jonction

De la même manière que pour la validation fonctionnelle du modèle de coculture, l'intégrité de la BAC a été évaluée avant et après chaque exposition aux e-liquides et aérosols. En effet, la mesure de l'intégrité permet d'évaluer l'état fonctionnel du modèle avant l'expérimentation et l'impact des expositions au niveau fonctionnel de la BAC formée par la coculture. Pour ce faire, la TER a été relevée avant exposition aux aérosols ou aux e-liquides à J8 puis à J9 soit 24h après les protocoles d'exposition. La TER a été mesurée par l'intermédiaire d'un ohmmètre épithélial Evom2® (World Precision Instruments, Hitchin, UK) connecté à des électrodes STX2.

III.1.3.b. Mesure de la viabilité et activité métabolique cellulaire

○ **Mort cellulaire**

Après les différentes expositions, l'impact des e-liquides et des aérosols sur la viabilité cellulaire, a été évalué. La mort cellulaire par nécrose a été étudiée par la mesure de l'activité enzymatique de la LDH libérée dans le milieu de culture cellulaire. Cette méthode repose sur un test colorimétrique lui-même basé sur la réaction enzymatique suivante : la LDH, enzyme cytoplasmique, est libérée dans le milieu extracellulaire après altération de la membrane cytoplasmique. Cette enzyme oxyde le lactate en pyruvate en utilisant la forme oxydée du Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) comme cofacteur qui se transforme en forme réduite du Nicotinamide adénine dinucléotide (NADH, H^+). Ce dernier réagit avec du sel de Tétrazolium WST en formant alors un composé coloré jaune quantifiable par spectrophotométrie : le formazan. L'absorbance mesurée à 450 nm par l'intermédiaire d'un lecteur de plaque iMark™ (Biorad® ; Hercule, USA) est proportionnelle au nombre de cellules lysées et non-viables. Après le protocole d'exposition par dilution ou aux aérosols, 10 μL de surnageant sont prélevés en région apicale et basolatérale de la coculture et déposés dans une plaque 96 puits pour effectuer la mesure de l'activité enzymatique de la LDH par un kit LDH (#ab65393 ; Abcam, Cambridge, UK). Un volume de 100 μL de substrat WST est ensuite ajouté dans chaque puits

contenant les 10 μ L de surnageant, puis la plaque est incubée 30 minutes à température ambiante avant de relever les valeurs d'absorbance à 450 nm.

○ **Activité enzymatique/viabilité cellulaire**

Pour évaluer l'activité enzymatique et la prolifération cellulaire, un test au sel de Tétrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tétrazolium) (MTS) a été utilisé. Ce dernier se base sur la réduction par les cellules métaboliquement actives du sel de tétrazolium MTS en formazan, un produit coloré, quantifiable par spectrophotométrie. Cette réduction en formazan repose sur l'action des déshydrogénases dépendantes de l'activité des coenzymes NAD(P)H, H⁺. L'absorbance mesurée à 490 nm par spectrophotométrie, est proportionnelle à l'activité métabolique et à la viabilité cellulaire. Après les différents protocoles d'exposition, le milieu de culture est retiré des deux compartiments de la coculture et est remplacé par du milieu sans SVF contenant 10 % de réactif MTS. La mesure de l'absorbance est effectuée après 3 h d'incubation des cellules à 37°C et 5 % CO₂.

III.1.3.c. Mesure du stress oxydant mitochondrial des cellules épithéliales alvéolaires

La production d'anions superoxydes mitochondriaux par les cellules épithéliales alvéolaires NCI-H441 a été investiguée pour évaluer l'impact des e-liquides sous forme diluée ou des aérosols piégés. Les cellules NCI-H441 ont étéensemencées à 1×10^6 cellules/mL (volume de dépôt par puits = 10 μ L) sur une plaque à 96 puits à fond noir, puis placées à 37°C, 5 % CO₂ pendant deux jours. Le milieu cellulaire est ensuite retiré et les cellules lavées deux fois avec du HBSS. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 minutes avec une solution de MitoSOX[®] diluée dans du HBSS à une concentration finale du MitoSOX[®] de 5 μ M. Après deux lavages avec du HBSS, la lecture de la fluorescence a été effectuée à 510/580 nm sur le lecteur de fluorescence Varioskan[®] LUX (ThermoFisher Scientific[®]) : la fluorescence a été lue pendant une heure, toutes les minutes, pour établir une cinétique de la production mitochondriale d'anions superoxydes par les cellules.

III.2. Développement de méthodes analytiques pour l'identification des composés chimiques

Afin d'identifier les composés potentiellement responsables des différentes toxicités étudiées (baisse de l'intégrité de la barrière, stress oxydant, mort cellulaire), plusieurs stratégies analytiques ont été développées. Les deux techniques d'analyses chimiques privilégiées dans ce projet sont l'analyse par thermodésorption associée à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (TD-GC-MS) et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (LC-MS-TOF).

III.2.1. Analyse par thermodésorption associée à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (TD-GC-MS)

Premièrement, un volume de 3 μL d'e-liquide ou 3 puffs d'aérosol produit par l'appareil Vitrocell est/sont récolté(s) dans une cartouche Tenax[®] (#N9307005 ; Perkin Elmer[®]) contenant une matrice en polymère poreux. Ces échantillons ont ensuite été analysés par un appareil ATD-GC-MS 3 de la marque Perkin Elmer[®] a été utilisé (Figure 25). Dans un premier temps, l'échantillon est thermodésorbé afin d'extraire ses différents composés volatils. Pour ce faire, la cartouche est chauffée à 250°C sous un flux d'hélium pendant 3 minutes afin d'éluer les composés organiques volatils piégés dans la matrice poreuse. Les composés sont ensuite piégés par effet Peltier dans un espace refroidi avoisinant les -30°C pendant 1 minute afin de concentrer les analytes avant injection. Une deuxième étape de vaporisation est ensuite menée avec des températures graduellement croissantes, allant de -30°C à 250°C (à raison de 40 degrés toutes les secondes) pendant moins d'une minute afin d'injecter les gaz générés dans le chromatographe en phase gazeuse. La partie GC est composée d'une colonne Elite-WAX (Polyéthylène glycol, longueur : 30 m, diamètre interne : 0,25 mm ; épaisseur de la phase stationnaire : 0,25 μm) placée dans un four dont la température augmente de manière graduelle afin d'optimiser la séparation des composés. Cette séparation est basée sur le caractère volatil des composés chimiques ainsi que sur leur affinité avec la phase stationnaire (colonne Elite-WAX). Les

temps de rétention pour chacun des composés analysés est spécifique et vont permettre, en partie, leur identification. Enfin, les analytes, une fois séparés, sont détectés par un spectromètre de masse en mode scan ce qui permet d'avoir le spectre de masse de chaque composé. Une fois les chromatogrammes et spectres de masse analysés, les composés chimiques sont identifiés par une bibliothèque NIST. Les échantillons sont préparés et analysés de manière extemporanée.



Figure 25 : Chromatographe en phase gazeuse couplée à la thermodésorption et à la spectrométrie de masse ATD GC MS 3 (Perkin Elmer®) ("Thermal Desorption – Clarus GC with TurboMatrix ATD," n.d.)

III.2.2. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (LC-MS-TOF)

Les analyses en TD-GC-MS permettent d'étudier les composés organiques volatils tandis que la LC-MS-TOF permet d'analyser et d'identifier des composés chimiques présents en mélanges complexes, hydrosolubles ou semi-volatils. Ces deux méthodes sont complémentaires. Les arômes présents dans les e-liquides pour cigarettes électroniques sont dotés de structures chimiques diverses, appartenant à des groupes aromatiques variés. La LC-MS-TOF est particulièrement adaptée à une analyse de type « screening » d'e-liquides ou dite sans à priori. En effet, cette méthode permet, par sa haute résolution, de caractériser de manière non ciblée des arômes ou sous-produits comme les produits de dégradation. La mise au point d'une méthode analytique sur l'appareil Agilent® 6230B LC-MS-TOF (Figure 26) constitue l'essentiel de cette partie du projet et sera détaillée dans la partie Résultats de ce manuscrit.

Plusieurs paramètres ont pu être mis au point afin d'optimiser l'identification des composés : le débit, le volume d'injection, les pressions (gaz de nébulisation, gaz de séchage...), le type de colonne, les tensions appliquées ... Les identifications ont été menées par l'utilisation d'une bibliothèque intégrée au logiciel Qualitative Analysis 10.0 (Agilent®).



Figure 26 : Modèle 6230B de LC-MS-TOF ("6230B Time-of-Flight LC/MS | Agilent," n.d.)

III.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par l'intermédiaire du logiciel GraphPadPrism Version 10 (San Diego, USA). Les analyses statistiques des résultats relatifs aux mesures de la TER, aux tests LDH, aux tests MTS, aux tests MitoSOX® et aux expressions protéiques (western blot) ont été effectuées par un test ANOVA à un facteur suivi d'un post-test de comparaison multiple de Dunnett. Enfin, les analyses statistiques des aires et périmètres cellulaires des THP-1 non traitées versus traitées ont été effectuées grâce à un test de Student (t-test). Les caractéristiques morphologiques différentielles, les expressions normalisées relatives des marqueurs et des composantes du système sérotoninergique ainsi que les valeurs d'intensité de fluorescence ont été comparées par test ANOVA à un facteur suivi d'un post-test de comparaison multiple de Tukey.

RESULATS

IV. Résultats :

IV.1. Résultats liés à la coculture associant des cellules HULEC-5a aux cellules NCI-H441

Ce modèle de culture, composé de la lignée NCI-H441 et HULEC-5a, a été utilisé afin de modéliser in vitro la BAC et a été validé d'un point de vue phénotypique et fonctionnel (Sabo et al., 2023). Ce modèle a été exposé à différents types d'e-liquides pour cigarettes électroniques : des e-liquides composés de véhicules seuls dans un ratio PG/VG 50/50 et 76/24, des e-liquides sans nicotine aromatisés au tabac blond, menthe-eucalyptus ou fruits rouges et des e-liquides avec nicotine aromatisés au tabac blond.

Ces travaux ont pu mettre en évidence l'importance majeure des arômes dans les e-liquides. En effet, les arômes semblent jouer un rôle dans la diminution de l'intégrité de la BAC, dans des processus inflammatoires, de mortalité cellulaire et de stress oxydant. Les arômes investigués ne semblent pas égaux en termes de réponses cellulaires. L'e-liquide aromatisé au tabac blond a montré des effets relativement faibles et proches de ceux obtenus avec des véhicules seuls, tandis que les arômes fruits rouges et menthe-eucalyptus ont, au contraire, induit des effets cytotoxiques plus sévères. Cette étude a également démontré l'impact des véhicules sur l'intégrité de la BAC par la modulation de l'expression de protéines de jonction comme l'occludine (Figure 27).

Les différentes expérimentations sont décrites dans l'article **Sabo et al.**, « Flavoured and Nicotine-Containing e-Liquids Impair Homeostatic Properties of an Alveolar-Capillary Cell Model » (Annexe 1).

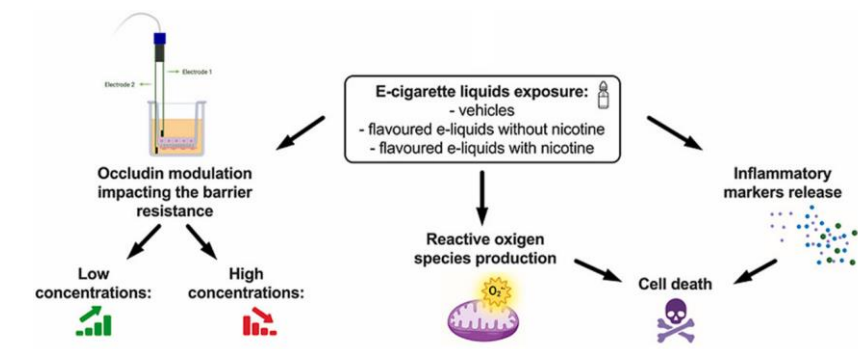


Figure 27 : Illustration résumant les différentes investigations menées et principaux résultats liés au modèle de coculture associant les cellules HULEC-5a aux cellules NCI-H441 (Sabo et al., 2023)

Les résultats obtenus après exposition du modèle à l'e-liquide PG/VG 76/24 aromatisé aux fruits rouges ont mis en évidence un stress oxydant mitochondrial augmenté et une réponse inflammatoire de la BAC face à ces arômes. Nous avons souhaité investiguer cet e-liquide aromatisé de manière plus approfondie pour, éventuellement, identifier une ou plusieurs molécules responsables de ces réponses cellulaires. L'arôme fruits rouges, élaboré par l'entreprise GAIATREND, se compose de plusieurs « sous-arômes » : fraise, framboise, mûre et myrtille. Il paraît intéressant d'identifier des effets spécifiques à chacun de ces sous-arômes. Par ailleurs, nous n'avons testé qu'une méthode d'exposition : la méthode par dilution. Cette méthode simple à mettre en œuvre ne tient pas compte de l'étape d'aérosolisation du e-liquide qui est essentielle lors du vapotage. Nous avons donc initié les expérimentations relatives aux expositions par dilution pour différents sous-arômes (mûre, framboise, myrtille) parallèlement aux expositions aux aérosols piégés aromatisés à la mûre (seconde méthode d'exposition). Malheureusement, des difficultés rencontrées avec la lignée HULEC-5a ne nous ont pas permis de finaliser les investigations pour l'e-liquide fraise par dilution et pour les e-liquides framboise, myrtille et fraise par exposition à l'aérosol piégé.

IV.1.1. Intégrité de la BAC après 24h d'exposition à un milieu de culture cellulaire contenant des e-liquides dilués ou des aérosols piégés de e-liquides

Au même titre que les données obtenues pour l'e-liquide « complet » fruits rouges, l'intégrité de la barrière semble augmenter après une exposition de 24h à de faibles concentrations d'e-liquides dilués avant de chuter à des concentrations plus fortes. En effet, la mesure de la TER a mis en évidence un effet biphasique des e-liquides mûre, framboise et myrtille dilués. L'augmentation de la TER est significative après l'exposition aux e-liquides mûre ($p < 0,05$), framboise ($p < 0,001$) et myrtille ($p < 0,05$) dès 2,5 % (Figure 28). A partir de 5 %, la TER a vu ses valeurs chuter de manière significative pour l'e-liquide mûre ($p < 0,05$) et cette chute semble apparaître à des concentrations plus faibles que pour les autres e-liquides. En effet, pour les deux e-liquides, framboise ($p < 0,0001$) et myrtille ($p < 0,01$) la TER ne diminue de manière significative qu'à partir de 10 %. Ces résultats démontrent globalement l'existence de processus cellulaires engendrant l'augmentation de l'intégrité

de la barrière à de faibles concentrations avant de chuter et d'atteindre un plateau à partir d'un seuil avoisinant 5-10 % d'e-liquides. L'hyperosmolalité des véhicules du e-liquide (PG/VG) est un facteur favorisant la rupture de la BAC, mais la présence d'arômes comme ceux contenus dans l'e-liquide mûre semble accentuer la réponse.

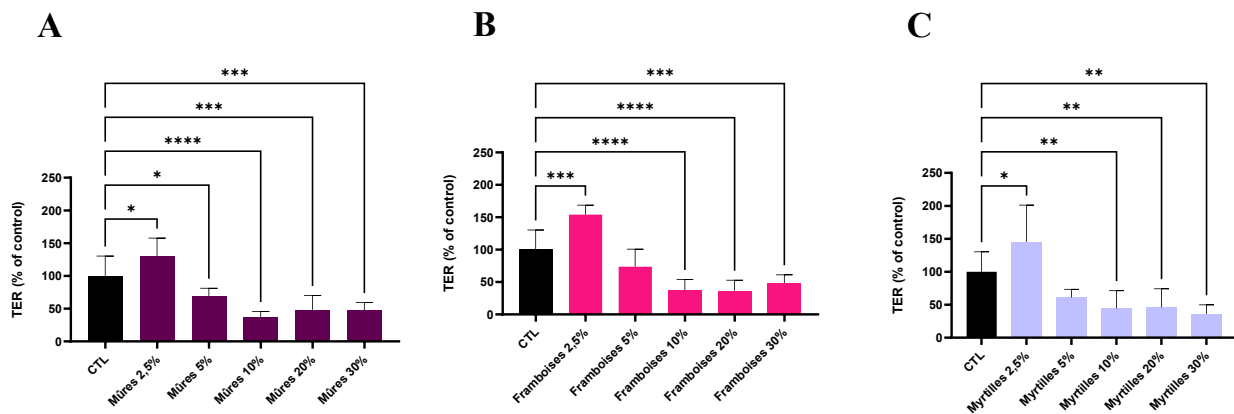


Figure 28 : Mesure de la TER (% CTL) en fonction de la concentration d'e-liquides dilués dans le milieu de culture cellulaire et après une exposition de 24h. Chaque graphique représente un e-liquide aromatisé spécifique : (A) e-liquide mûre, (B) e-liquide framboise et (C) e-liquide myrtille. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD, $n = 2$ expérimentations en triplicata. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$ (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$)

Une fois la deuxième méthode d'exposition mise en place, nous avons investigué l'évolution de l'intégrité de notre modèle de BAC après exposition à un aérosol aromatisé à la mûre piégé dans le milieu de culture. Nous avons établi, à partir du caractère hyperosmolaire des véhicules présents dans les e-liquides, une équivalence entre les valeurs de concentration par dilution (en pourcentage) et les valeurs de concentration par piégeage (en nombre de puffs). En effet, nous avons établi que 2,5 % par dilution équivaut environ à 240 puffs et 1 % par dilution équivaut environ à 120 puffs. Une échelle des équivalences est disponible dans l'article Filaudeau et al. (page 112).

Nous avons investigué de manière préliminaire l'évolution de la TER en fonction du nombre de puffs d'aérosol mûre piégé dans du milieu de culture. Au même titre qu'après une exposition aux e-liquides dilués dans le milieu de culture, l'intégrité de la BAC in vitro semble augmenter graduellement en fonction du nombre de puffs. En effet, à partir de 60 puffs et 120 puffs, les valeurs de TER deviennent significativement plus importantes que celles du contrôle ($p < 0,01$) (Figure 29). Cet intervalle de concentrations correspond par équivalence à des valeurs de dilution oscillant entre 0,2 et 1 %. Ces

résultats démontrent que des processus modulant l'intégrité de la BAC interviennent également après exposition aux aérosols piégés.

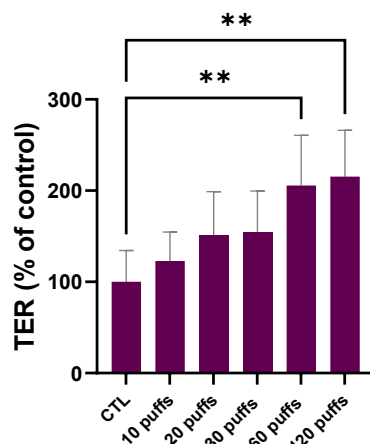


Figure 29 : Mesure de la TER (% CTL) en fonction du nombre de puffs d'aérosols d'e-liquide mûre piégés dans le milieu de culture et après une exposition de 24h. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD, $n = 2$ expérimentations en triplicate. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$ (** : $p < 0,01$)

IV.1.2. Cytotoxicité après 24h d'exposition à un milieu de culture cellulaire contenant des e-liquides dilués ou des aérosols d'e-liquides piégés

Afin d'expliquer ces processus de modulation de l'intégrité de la BAC, nous avons investigué différentes réponses cellulaires découlant de ces expositions. Dans un premier temps, nous avons étudié les réponses cellulaires liées à la perméabilisation de la membrane plasmique par le biais d'un test de mortalité LDH. De la même manière que pour l'étude de l'intégrité de la BAC, nous avons ciblé trois e-liquides différents : aromatisés à la mûre, framboise et myrtille. Par dilution des e-liquides mûre et framboise, une augmentation de la LDH dans le milieu extracellulaire a été mise en évidence de manière significative à partir de 20 % ($p < 0,0001$), qui correspond à une concentration relativement élevée (Figure 30.A et B). Pour l'e-liquide myrtille, à une concentration de 2,5 % d'e-liquide dilué dans le milieu, nous avons pu observer une augmentation significative ($p < 0,05$), de la mort cellulaire, mais ce résultat n'a pas été équivalent pour des concentrations de 5 et 10 %, contrairement à ce qui était attendu. A 20 % d'e-liquide myrtille dilué, la libération de LDH dans le milieu est statistiquement plus élevée que le contrôle ($p < 0,0001$), comme cela a été conclu pour les deux autres e-liquides aromatisés (mûre et framboise) (Figure 30.C).

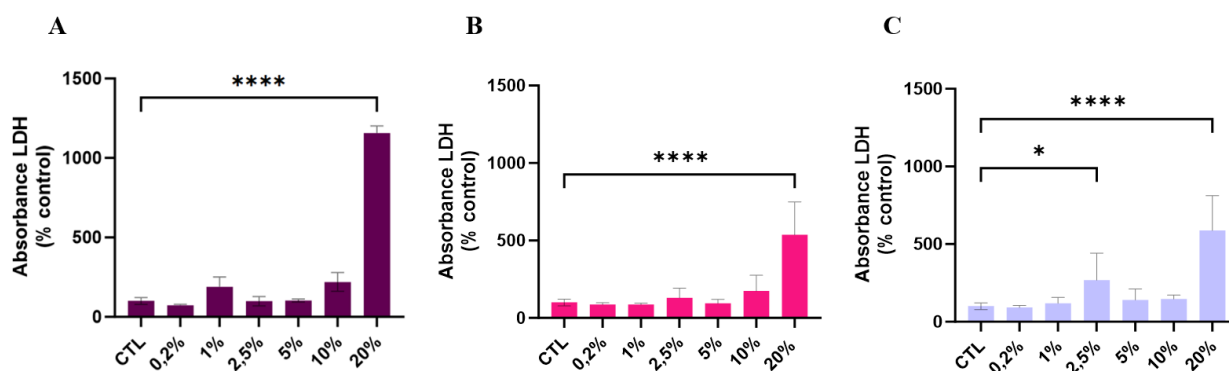


Figure 30 : Mesure de l'absorbance de l'activité LDH (450 nm) dans le milieu apical de la culture cellulaire en fonction de la concentration d'e-liquide déposé en région apicale de l'insert et après une exposition de 24h : (A) e-liquide mûre, (B) e-liquide framboise, (C) e-liquide myrtille. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD, $n = 2$ expérimentations en triplicate. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$ (* : $p < 0,05$; **** : $p < 0,0001$)

Ces expérimentations ont également été menées sur le modèle de BAC après traitement avec l'aérosol aromatisé à la mûre piégé dans du milieu de culture. Nous n'avons observé aucune augmentation significative de la mortalité cellulaire après des expositions à l'aérosol piégé allant de 10 à 120 puffs (Figure 31). Nos résultats sont en accord avec les résultats déjà obtenus avec des liquides dilués dans le milieu de culture. En effet, les équivalences établies précédemment entre les deux méthodes d'exposition montrent que l'exposition à 120 puffs représente environ 1 % d'exposition de l'e-liquide par dilution et apparaît ici comme la concentration la plus élevée testée par piégeage de l'aérosol.

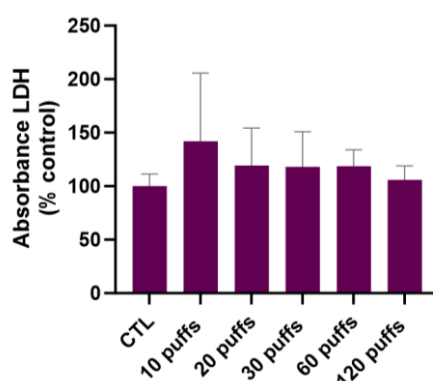


Figure 31 : Mesure de l'absorbance de l'activité LDH (à 450 nm) dans le milieu apical de la culture cellulaire en fonction du nombre de puffs de l'e-liquide mûre piégé dans le milieu de culture cellulaire déposé en région apicale de l'insert et après une exposition de 24h. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD, $n = 1-2$ expérimentations en triplicate. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$

IV.1.3. Viabilité et activité métabolique cellulaire après 24h d'exposition à un milieu de culture cellulaire contenant des e-liquides dilués ou des aérosols piégés de e-liquides

L'étude de l'activité métabolique cellulaire a été menée grâce à un test au MTS. Contrairement aux résultats obtenus par la mesure de l'activité LDH dans le milieu de culture, relatifs à la mortalité cellulaire par perméabilisation de la membrane plasmatique, nous avons mis en évidence des réponses pour des concentrations d'e-liquides plus faibles. En effet, l'activité enzymatique cellulaire investiguée par un test MTS montre une augmentation significative pour les e-liquides mûre et framboise, à 0,2 % et à 1 % (Figure 32.A et B). Cette augmentation significative à 0,2 % a également été démontrée pour l'e-liquide myrtille ($p < 0,01$) (Figure 32.C). Ce dernier a également induit une augmentation significative de l'activité enzymatique cellulaire à 5 % ($p < 0,01$). Au contraire, à forte concentration (20 %), l'activité enzymatique a été statistiquement altérée et diminuée pour les trois e-liquides par une méthode de dilution dans le milieu de culture ($p < 0,0001$).

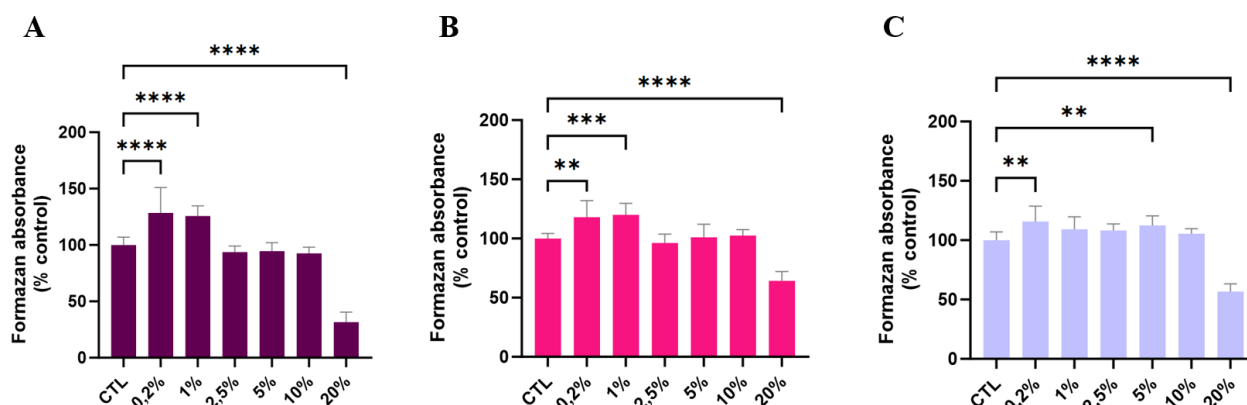


Figure 32 : Mesure de l'absorbance du formazan dans le test MTS (à 490 nm) en fonction de la concentration d'e-liquide dilué, déposé en région apicale de l'insert et après une exposition de 24h : (A) e-liquide mûre, (B) e-liquide framboise, (C) e-liquide myrtille. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD, $n = 2$ expérimentations en triplicate. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$ (** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$)

Nous avons ensuite souhaité mettre ces résultats en regard de ce qui a été observé pour l'aérosol issu de l'e-liquide mûre piégé dans le milieu de culture. Ces expérimentations, illustrées par la Figure 33, mettent en évidence une baisse significative de l'activité enzymatique cellulaire à une concentration

égale à 60 puffs ($p < 0,05$). Ces résultats restent difficiles à interpréter compte tenu de leur variabilité et du faible nombre d'expérimentations qui ont pu être menées.

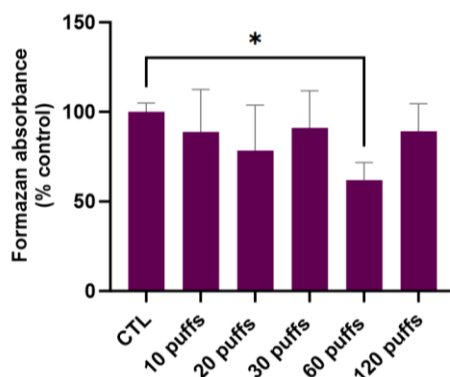


Figure 33 : Mesure de l'absorbance du formazan dans le test MTS (% CTL) en fonction du nombre de puffs d'e-liquide mûre piégé dans le milieu de culture, déposé en région apicale de l'insert et mesuré 24h après exposition. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD, $n = 1-2$ expérimentations en triplicata. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$ (* : $p < 0,05$)

IV.1.4. Résumé des investigations et résultats obtenus à partir du premier modèle de coculture

Le résumé des différents résultats obtenus à partir du premier modèle de BAC est présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

Tableau 4 : Résumé des investigations menées sur le premier modèle in vitro de BAC suivant le type d'e-liquide aromatisé et les méthodes d'exposition choisies

	Exposition à l'e-liquide dilué			Exposition à l'aérosol piégé
	Mûre	Myrtille	Framboise	Mûre
Osmolalité des milieux de culture	Hyperosmolalité des milieux après dilution des e-liquides aromatisés dès 1%			Hyperosmolalité des milieux après piégeage de l'aérosol dès 120 puffs
Etude de l'intégrité de la BAC in vitro	Augmentation de l'intégrité de la BAC à de faibles concentrations (2,5 %) Puis diminution à partir de 5 %	Augmentation de l'intégrité de la BAC à de faibles concentrations (2,5 %) Diminution de la résistance à partir de 10 %	Augmentation de l'intégrité de la BAC à de faibles concentrations (2,5 %) Puis diminution à partir de 10 %	Augmentation de l'intégrité de la BAC à partir de 60 puffs
Etude de l'activité enzymatique cellulaire	Augmentation significative à de faibles concentrations (0,2 %) Diminution de l'activité à partir de 20 %	Augmentation significative à de faibles concentrations (0,2 %) Diminution de l'activité à partir de 20 %	Augmentation significative à de faibles concentrations (0,2 %) Diminution de l'activité à partir de 20 %	Diminution de l'activité à partir à 60 puffs uniquement
Etude de la nécrose cellulaire	Augmentation de la nécrose cellulaire à 20 %	Augmentation de la nécrose cellulaire à 2,5 % puis à 20 %	Augmentation de la nécrose cellulaire à 20 %	Pas de différence significative par rapport au contrôle

IV.2. Validation d'un deuxième modèle de coculture et évaluation des effets des e-liquides/aérosols sur la barrière in vitro

IV.2.1. Article « *Berry e-liquid flavours toxicities are not equal on an alveolar-capillary barrier cell model according to two exposure methods* »

L'objectif de ces travaux a été de développer et de valider un modèle in vitro de la barrière alvéolo-capillaire afin de l'exposer à des e-liquides/aérosols par l'intermédiaire de deux méthodes d'exposition différentes. Différentes réponses cellulaires ont été investiguées post-exposition aux e-liquides/aérosols. Les liquides pour cigarette électronique étudiés dans cet article sont des e-liquides composés d'un ratio 76/24 de PG/VG, sans nicotine, aromatisés aux fruits rouges (fraise, framboise, mûre, myrtille). Nous avons utilisé deux méthodes d'exposition distinctes : exposition par dilution de l'e-liquide dans le milieu de culture et exposition aux aérosols piégés dans le milieu de culture. Les différentes investigations menées ont permis de valider phénotypiquement et fonctionnellement le modèle de coculture (lignées cellulaires NCI-H441 et EA.hy926). Les deux méthodes d'exposition testées montrent des différences significatives en termes de toxicité des e-liquides/aérosols sur la BAC (intégrité de la barrière et stress oxydant mitochondrial), probablement dues à des différences dans les compositions aromatiques et les produits de dégradation générés. Les arômes ne sont pas tous égaux en termes de toxicité au niveau cellulaire, il semble donc essentiel d'identifier chimiquement les composés responsables de ces différents degrés de toxicité.

Type of the Paper: Article

Berry e-liquid flavours toxicities are not equal on an alveolar-capillary barrier cell model according to two exposure methods

Emma Filaudeau^{1,2*}, Amelia-Naomi Sabo^{1,3}, Anita Lebert¹, Laurent Monassier¹ and Véronique Kemmel^{1,3*}

- ¹ 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; emma.filaudeau@etu.unistra.fr; amelia-naomi.sabo@chru-strasbourg.fr; alebert@unistra.fr; laurent.monassier@unistra.fr; kemmel@unistra.fr
- ² Gaïatrend, Rohrbach-lès-Bitche, France; emma.filaudeau@gaiatrend.fr
- ³ Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67200, Strasbourg, France; kemmel@unistra.fr; amelia-naomi.sabo@chru-strasbourg.fr
- * Correspondence: EF: emma.filaudeau@etu.unistra.fr ; VK: kemmel@unistra.fr

Abstract: E-cigarettes is presented as a smoking cessation tool, less harmful than tobacco and is now a regular feature of everyday life. However, the fruity and sweet flavours are attractive to teenagers, who may be trap young people into nicotine addiction. E- liquids contain a mixture of nicotine, humectants and flavourings, appear to have effects on the pulmonary system, and particularly on the alveolar-capillary barrier (ACB). The aim of this work is to study the toxicity of nicotine-free e-liquids/aerosols flavoured with berries (strawberry, raspberry, blackberry, blueberry) using two exposure methods. First, we validated an in vitro model of the ACB using epithelial NCI-H441 and endothelial EA.hy926 cells. Barrier integrity, production of oxidative species and cytotoxicity were assessed by TER measurement, mitoSOX® test and LDH test, after exposure to two different methods: dilution of the e-liquid and aerosol trapping in the culture medium. Our model mimicked phenotypically and functionally the ACB. The two exposure methods tested showed significant differences in terms of e-liquid/aerosol toxicity on the ACB, probably due to differences in aromatic and degradation products. Flavours are not all equal in terms of cell toxicities, so it seems essential to identify chemically the compounds responsible for these different degrees of toxicity.

Keywords: e-cigarettes; berry flavours; alveolar-capillary barrier; oxidative stress; trans-epithelial resistance; trapped aerosol

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date

Citation: To be added by editorial staff during production.

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Electronic cigarettes (e-cig) emerged on the market in the 2010s and have often been presented as a less harmful alternative to conventional cigarettes. Initially targeting smokers wishing to reduce or even stop their tobacco consumption, their use has gradually been directed towards a younger public, and sometimes non-smokers [1]. This dynamic can be explained by the diversity of flavours offered to consumers, some of which are described as recreational. E-cig typically comprise three main components: a battery, a resistor and an e-liquid tank. Several generations of e-cig have seen the light of day since

they were first launched on the market, but it's mainly the 3rd generation that offers users a personalized experience. In fact, it allows modulation of several key parameters of the e-cig, such as power, voltage and coil heating temperature. In addition to these various parameters, the e-liquid is also an important part of the consumer's experience. E-liquid is made up of a vehicle classically composed of propylene glycol (PG) and vegetable glycerine (VG), nicotine and flavourings. The choice of flavours is vast, making it all the more complex to study the toxicity of e-liquids [2]. A number of in vitro studies have demonstrated that the vehicles and flavours used in e-liquids are involved in toxicity processes [3, 4, 5]. Indeed, even without nicotine, flavoured nicotine-free e-liquids seem to represent a real risk for several major biological systems, with the pulmonary system in the front line. Certain aromatic compounds induce deregulation of the oxidative and inflammatory balance, as well as functional and structural alterations in airway tissues [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]. In addition to aromatic compounds, there are aerosolization products derived from the oxidation of PG and VG, some of which are known to be toxic or carcinogenic [10, 11]. These in vitro investigations have been backed up by several in vivo studies highlighting the harmful effects of flavoured and unflavoured nicotine-free e-liquids [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. Fruit is the flavour most frequently preferred by e-cigarette users, followed by menthol flavours, then tobacco and other flavours [21]. It seems essential to identify the different toxicities of fruity e-liquids, which are not well-investigated [8, 22, 23]. Here, our aim is to assess the in vitro toxicity of a highly popular group of flavours: red fruit flavours (Strawberry, Raspberry, Blackberry, Blueberry) on an in vitro model of the alveolar-capillary barrier (ACB). The latter has been validated phenotypically and functionally. Two methods of exposure to e-liquids (dilution and trapped aerosols) have also been developed and compared in order to investigate the cellular toxicities. To this end, cell death by necrosis, barrier integrity in vitro and mitochondrial oxidative stress were investigated and described in this work.

2. Materials and Methods

2.1. Chemical and reagents

- Culture cell and tests
RPMI 1640 (#11530586), DMEM (#11574486), SVF (#11573397), Pen-Strep antibiotic (#15140122), GlutaMAX™ (#35050-038), Trypsin (#25200-036), DPBS (#14190144) and Mito-SOX® (#M36008) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Hydrocortisone (#H0888) was obtained from Sigma (Saint-Louis, USA). Lactate Dehydrogenase (LDH) kit (#ab65393), MTS kit (#ab197010) and SP-D SingleStep ELISA® kit (#ab239431) were acquired at Abcam (Cambridge, UK). Inserts (#83.3932040) were purchased from Sarstedt (Nümbrecht, Germany).
- qRT-PCR
TRIzol™ solution (#15596018) was obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).
qRT-PCR reagents were purchased from Bio-Rad (Hercule, USA): iScript™ Reverse Transcription Supermix (#1708841), SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (#1725271) and primers (Table A.1 – Appendix A).
- Western blot
The Bovine Serum Albumine (BSA) (#A9647) and the solution of Triton™ X100 (#T8787) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Normal goat serum (#S2000-100) was obtained from Dutscher (Bernolsheim, France). Western blot membranes (#1704157), Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (#1610363) and Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate (#161-0380) were acquired at Bio-rad (Hercule, USA). Tris Glycine-SDS Buffer 10X (#EU0510) was obtained from Euromedex (Souffelweyersheim,

France). Luminata™ solution (#WBLUC0500), Immobilon Classico Western HRP substrate, was purchased from Merck Millipore (Molsheim, France). Antibodies were obtained from Abcam (Cambridge, UK) or Invitrogen – Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) and are detailed in Appendix A (Table A.1).

- Immunofluorescence

Formalin solution (#5700), PBS tablets (#18912-014) and some antibodies (Table A.1 – Appendix A) were purchased from Thermo Scientific Fisher (Waltham, USA). Aqueous Mounting Medium with DAPI (#ab104139) and some antibodies (Table A.1 – Appendix A) were obtained from Abcam (Cambridge, UK).

- e-Cigarette devices and e-liquids tested

Devices and e-cig liquids were obtained from GAIATREND company (Rohrbach-lès-Bitche, France).

2.2. Cell Culture

Two different cell lines were used in our study to mimic the ACB. The NCI-H441 cell line (ATCC® - HTB-174™), which is derived from a human papillary adenocarcinoma of the lung, was the epithelial cell line. The other cell line used in this study is EA.hy926 (ATCC® - CRL-2922™) established by fusing primary human umbilical vein cells with a thioguanine-resistant clone of A549 by exposure to polyethylene glycol (PEG). EA.hy926 cells were used as lung endothelial cells.

2.2.1. Maintenance of cell lines

NCI-H441 cells were maintained using RPMI 1640 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and Pen-Strep antibiotic (0.5%). The cells were subcultured twice a week and maintained at a maximum of 25 passages. These epithelial cells were used in the coculture model as type II alveolar cells.

EA.hy926 cells were maintained in DMEM medium supplemented with FBS (10%), Pen-Strep antibiotic (0.5%) and GlutaMAX™ (4 mM). Cells were subcultured up to twice a week and maintained at a maximum of 25 passages. These endothelial cells are used in the coculture model as endothelial cells of the pulmonary microvascularization.

2.2.2. Coculture model

A 24-well Transwell insert was used to build the coculture model (Figure 1). The insert consists of a microporous polyethylene terephthalate (PET) membrane with 0.4 µm pore size. The first day of the culture, 30 µL of the endothelial cells suspension (EA.hy926 at 1.67x10⁶ cells/mL) were seeded on inverted insert. It was left for 4h at 37°C and 5% CO₂ to adhere to the lower part of the insert membrane. The inserts were then inverted and placed in 24-well plates containing 800 µL of DMEM medium in the basolateral region and 200 µL of DMEM medium was added in the apical region.

Two days later, 200 µL of the alveolar epithelial cell suspension (NCI-H441 at 2.5x10⁵ cells/mL) were seeded in the apical region of the insert. A coculture medium, containing RPMI-1640 and DMEM medium in a 50/50 ratio and 1 mg/L of hydrocortisone, was deposited in both compartments of the model to facilitate cell growth. The coculture medium was changed every two or three days until treatments and tests began on day 9.

2.3. Validation of the coculture model

To confirm that our coculture model is indeed a cellular model of the alveolar-capillary barrier, we characterized it phenotypically and functionally.

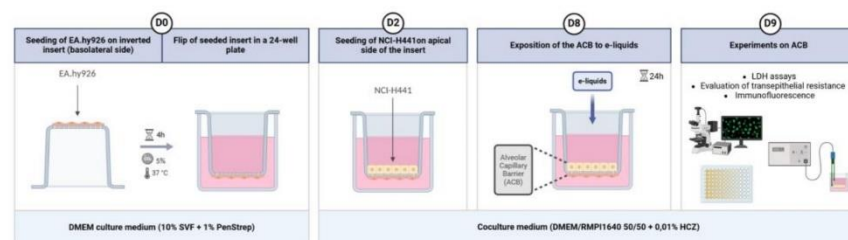


Figure 1. Setting up a coculture model mimicking the alveolar-capillary barrier in vitro. Figure shows, chronologically, the various stages involved in setting up the model. At **D0**, EA.hy926 are seeded on an inverted 24-well insert (0.4 μ m pore size, PET membrane). Four hours later, the inserts are inverted in a 24-well plate previously filled with culture medium. At **D2**, NCI-H441 cells are seeded in the apical region of the insert in culture medium common to both cell lines. At **D8**, the model can be exposed to e-liquids. Finally, at **D9**, various experiments can be carried out as described in methods. Created in <https://BioRender.com>.

2.3.1. Phenotypic characterization

Phenotypic characterization was based on the expression and localization of specific proteins directly related to cellular type and function. This is why, we looked for the expression of surfactant proteins (SP-A and SP-D) and junction proteins (Occludin and ZO-1) in epithelial cells and the expression of endothelial NO synthase (eNos), von Willbrand factor (vWF) and CD31 in the endothelial cells.

2.3.1.1. RT-qPCR

To extract total RNA from the different cell types (EA.hy926 and NCI-H441), a TRIzol solution was used according to the following protocol. After removal of the cell culture medium, the cells were solubilized in TRIzol, the total RNAs were then isolated with a chloroform solution, precipitated with isopropanol and washed with a 75% ethanol solution. The amount of RNA extracted was quantified using a NanoDropTM One (ThermoFisher Scientific). Both steps, reverse transcription (RT) followed by amplification (qPCR), were made possible by a Bio-rad thermal cycler (CFX96 - C1000 TouchTM). Retro-transcription of total mRNA into cDNA was performed using an iScriptTM mix: samples were heated for 5 min at 25°C, then at 46°C for 20 min and finally at 95°C for one minute. The final step, amplification of the target sequence using specific primers, was carried out using a SsoAdvancedTM mix containing dNTPs, DNA polymerase and a fluorescent indicator SYBR[®] Green. The amplification cycle comprises 2 main stages: cDNA denaturation (30 seconds at 95°C), followed by primer hybridization and elongation (30 seconds at 60°C). It is repeated 45 times. Three reference genes were used to calculate the relative expression of target genes: 18S, GAPDH and Actin. All primers used were obtained from Bio-Rad (detailed in Table A1). SP-A, SP-D, ZO-1, Occludin, vWF and eNos genes were targeted by qRT-PCR.

2.3.1.2. Western Blot experiments

Protein expression was studied using the Western blot technique as follows. Cells were lysed with a lysis solution composed of HEPES, EDTA, NaCl and Triton X-100, protease and phosphatase inhibitors. The lysate was centrifuged at 10 000 g for 10 min. The proteins contained in the supernatant were measured using the Bradford method. Proteins

were denatured with β -mercaptoethanol and samples, loaded with 20 μ g of proteins, migrated by electrophoresis onto an SDS-page matrix (10%). Proteins were then transferred onto Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes by a Trans-Blot Turbo System (Bio-rad). To block non-specific sites, the membranes were incubated with a solution of Phosphate-Buffered Saline (PBS) and skimmed milk (10%) for one hour and then incubated overnight at 4°C, with the primary antibody, diluted as recommended by the supplier (Table A1). The following day, after several washes, the membranes were incubated for 1 hour at room temperature with the HRP-coupled secondary antibody, diluted as recommended by the supplier (Table A1). The chemiDocXRS system (Bio-rad) was used to reveal the bands of interest by chemiluminescence after incubating the membranes with Luminata™ as HRP substrate. Using Image Lab software (Bio-rad), the intensity of the bands of interest was analyzed and quantified in relation to the total proteins present in the samples measured by stain-free method.

2.3.1.3. Immunofluorescence experiments

Cells were fixed with a 4% formaldehyde solution for 15 min. After several washes in PBS, permeabilization and blocking of non-specific sites were performed for 60 min using blocking buffer (PBS + 5% normal goat serum + 0.3% Triton). Fixed cells were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody specific to the protein of interest, diluted according to the supplier's recommendations (Table A1) in a PBS solution containing 1% BSA and 0.3% Triton. The following day, after several wash with PBS, cells were incubated with the secondary antibody reactive against the primary antibody species for 2 h and diluted as recommended by the supplier (Table A1) in a PBS containing 1% BSA and 0.3% Triton. After three final washings, the coverslips were mounted on slides/inserts using mounting medium containing DAPI, in order to label the DNA of cell nuclei. Slides/inserts were analyzed using a Zeiss LSM800 confocal microscope. The acquisition conditions (excitation intensity and amplification of the emitted signal) were the same for all samples labelled with the same primary antibody.

2.3.1.4. Determination of SP-D protein by ELISA technique

SP-D concentration in NCI-H441 cells was measured by an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kit. This experiment was performed on cell culture supernatant. The coculture was seeded on insert as previously explained. On day 9, the supernatant from the apical region of the insert was collected and stored at -20°C, to measure the amount of SP-D protein secreted by NCI-H441 epithelial cells. The SP-D protein is captured by a capture antibody attached to the 96-well plate support, and is recognized by a detection antibody linked to the HRP (Horseradish Peroxidase) enzyme. On addition of the HRP substrate, TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), an enzymatic reaction generates a signal proportional to the amount of SP-D protein, measurable at 450 nm by spectrophotometry. Concentrations are based on results obtained with the standard range. For each experiment, samples and range points were analyzed in duplicate.

2.3.2. Functional characterization

Functional characterization of the model was based on an assessment of the barrier's integrity. Trans-epithelial resistance (TER) was chosen as the reference method because it is a non-invasive method which allows validation of the coculture before further use. TER was also measured after each experiment to measure the impact of the experiment on the ACB model integrity. A decrease in TER values corresponds to a decrease in the barrier's integrity.

TER was measured with the Evom2® epithelial ohmmeter (World Precision Instruments, Hitchin, UK) which was connected to standard STX2 electrodes.

2.4. Exposure methods

To define several toxicities of e-liquids, we compared two exposure methods to our cell model of ACB. The first one was based on the dilution of the e-liquid directly in the cell culture media, whereas the second one consisted of exposing the cells to the aerosol of e-liquid trapped in cell culture media.

2.4.1. Exposure method by e-liquid dilution

This exposure method was based on the dilution of the e-liquid directly in cell culture media: RPMI-1640/DMEM 50/50 for coculture; DMEM for EA.hy926 monoculture and RPMI-1640 for NCI-H441 monoculture. We tested several concentrations ranging from 0.2 to 10% during 24H.

2.4.2. Exposure method by trapping the e-cigarette aerosol

This method consisted of trapping the e-cig aerosol in culture medium, set as cell medium at D8 and during 24h. To produce the aerosol, an iStick TC40W electronic cigarette of the Eleaf brand was chosen as well as a RIOK clearomizer containing a resistance of 0.7 Ohm Mesh. The aerosol produced was entrained through tubing into a gas washer bottle by a peristaltic pump Flexicon PF6-B with a flow rate of 480 mL/min. The gas washer bottle was composed of a porosity 2 sintered glass. The aerosolization protocol consists of producing a puff of 3 seconds every 30 seconds, varying the total number of puffs from 10 to 240 puffs.

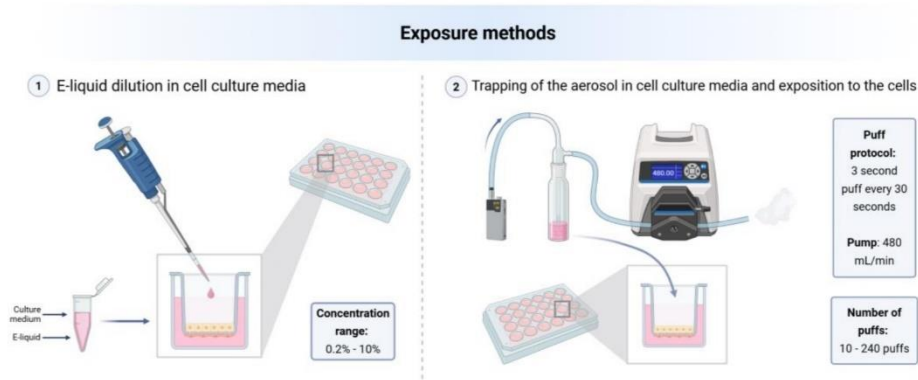


Figure 2. Schematic representation of the two exposure methods used. **(1)** The first involves diluting the e-liquid of interest directly in the culture medium which will be deposited in the apical region. Concentration values vary between 0.2 and 10%. **(2)** The second involves trapping an aerosol in the culture medium (3 second puff every 30 seconds), using a gas washing bottle connected to an e-cig device and a peristaltic pump, respectively. Then the medium is set as culture medium in apical region. The protocol varies the total number of puffs from 10 to 240 puffs. Created in <https://BioRender.com>

2.5. Tests to evaluate equivalence between the two methods of exposition	262
To compare these two methods, we established an equivalence between the percentage of e-liquid dilution and the number of trapped puffs in medium with different indicators. Thus, for each method, the mass of e-liquid consumed during the protocol was measured. The clearomizer was weighed before and after the aerosolized protocol to evaluate the mass of e-liquid consumed after each puff protocol. A second indicator was the measurement of culture medium osmolality as a function of dilution or number of puffs taken. This was carried out using the Fiske® Micro Osmometer model 210 (Advanced instruments, Norwood, Massachusetts, USA).	263–271
2.6. E-liquids of interests	272
This study used 4 different flavoured nicotine-free e-liquids, all composed of a 76/24 ratio of PG and VG. Four flavours make up these different e-liquids: Strawberries, Raspberries, Blackberries and Blueberries. The e-liquids were obtained from the Alfaliquid® brand (GAITREND, Rohrbach-les-Bitche; France).	273–277
2.7. Cell tests after exposure to diluted e-liquid or aerosol trapped in culture medium	278
2.7.1. LDH assay as cell necrosis indicator	279
Cell death by necrosis were investigated using a LDH assay. It is a colorimetric method based on the oxidation by LDH of the lactate in pyruvate with the generation of NADH which will itself react with the Water Soluble Tetrazolium salt (WST) by forming a yellow component. The intensity of the yellow dye is proportional to the number of lysed and therefore non-viable cells.	280–284
Ten microliters of medium were taken from each insert, in the apical and basolateral regions, and deposited on a 96-well plate. Next, 100 µl of WST substrate diluted in buffer were deposited per well and incubated with the cell supernatant for 30 minutes at room temperature. The absorbance was measured at 450 nm using the iMark™ microplate reader (Biorad®).	285–289
2.7.2. MitoSOX® assay as an indicator of mitochondrial oxidative stress	290
The production of mitochondrial superoxide anions in alveolar epithelial cells was used to investigate the impact of e-liquids in dilute or trapped form at the cellular level.	291–292
The NCI-H441 cells were seeded at 1×10 ⁶ cells/mL (100 µL per well) on a 96-well plate with a black background and then placed at 37° C, 5% CO ₂ for two days.	293–294
The cell medium was removed, and the cells were washed twice with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). Subsequently, the cells were incubated for 30 minutes with a 5 µM solution of Mitosox® diluted in HBSS. After two washes with HBSS, the fluorescence reading at 510/580 nm was then programmed on the Varioskan® LUX plate reader (ThermoFisher Scientific®); the fluorescence was read every minute to establish a kinetics of the mitochondrial production of superoxide anion. The Area Under the Curve (AUC) was calculated from the kinetic curve and represented as the percentage of total superoxide anion produced over 1 hour.	295–303
2.8. Statistical analysis	304
Statistical analyses were performed using GraphPadPrism Version 10 software (San Diego, USA). Statistical analyses of results relating to TER measurements, LDH tests, Mito-Sox® tests were performed by a one-factor ANOVA test followed by a Dunnett's multiple comparison post-test and a p-value of less than 0.05 was required to consider statistical significance.	305–310

3. Results

1.1. Phenotypical characterisation of the alveolo-capillary barrier cells model

The first step of our study was to validate the characteristics of our cell model as an alveolo-capillary barrier model. Specific markers of alveolar epithelium and endothelium cells were investigated on the two cell types by RT-qPCR, western blot and immunofluorescence.

As shown in figure 3, ZO-1 and Occludin, two tight junction proteins, were expressed and identified in NCI-H441 cells (Figure 3A to 3D). ZO-1 was specifically and only present on the membrane of the cells as expected (Figure 3C). The same pattern was observed for Occludin (Figure 3D). SP-A and SP-D, two surfactant proteins, were also expressed in NCI-H441 cells, on mRNA and protein level (Figure 3A and B). The concentration of SP-D protein was measured by ELISA in NCI-H441 monoculture. The average was around 53 pg/mL. It should be noted that the concentration of SP-D measured in the coculture averaged 172 pg/mL and was significantly higher than in monolayer NCI-H441 (Figure A.2).

In another hand, the expression and localization of the von Willebrand factor (vWF), a coagulation factor, were observed only in EA.hy926 cells. The vWF protein was localized in cytoplasm as expected and shown in figure 3G. As eNos, principally expressed in the vascular endothelium, is one of the three isoforms that synthesize nitric oxide (NO), its presence was successfully identified in endothelial cells as shown in figure 3E, 3F and 3H. Finally, CD31, the last endothelial marker tested, was identified in EA.hy926 cells as shown in figure 3F.

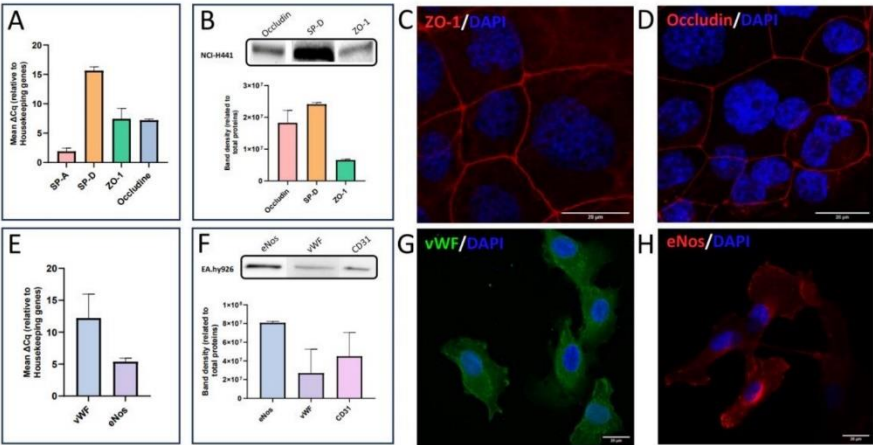


Figure 3. NCI-H441 (A, B, C and D) and EA.hy926 (E, F, G and H) cell lines characterizations using expression of specific proteins. (A) shows the ΔC_q of the various mRNA targets used to characterize NCI-H441 (Occludin, ZO-1, SP-A and SP-D) compared with housekeeping genes. (B) shows western blotting band density on NCI-H441 cells, of three proteins of interest: Occludin, SP-D and ZO-1. (C) and (D) show NCI-H441 cells in which respectively ZO-1 and Occludin are labelled with Alexa-647[®] (red). (E) shows the ΔC_q of the mRNA targets used to characterize EA.hy926 (vWF and eNos) compared with housekeeping genes. (F) shows western blotting band density of three proteins of interest: eNos, vWF and CD31. (G) and (H) show EA.hy926 cells in which vWF, an endothelial protein, is labelled with Alexa488[®] (green) and eNos, an enzyme expressed by the vascular endothelium, is labelled with Alexa647[®] (red), respectively. All images were captured with a confocal microscope, nuclei were labelled with DAPI (blue) and scale bar are 20 μ m. Histograms results are means from

3 separate experiments of triplicates $\pm$ SEM. Western blot histogram normalizes the signal with stain-free technology (total proteins)

1.2. Functionnal characterisation of the alveolo-capillary barrier cells model

The second step of our study was to validate the function of our cell model as an alveolar-capillary barrier model. This was tested by measuring transepithelial resistance (TER) values every day in mono and coculture conditions. As shown in Figure 4B, coculture was most effective as a barrier and over a longer time (6 days), followed by epithelial cells but the efficacy was shorter in time (only 3 days). The stable TER values were between 300 and 400 Ohm.cm² from D6 and D11 for the coculture. Epithelial cells play an essential role in barrier function of the coculture. Based on these results, all experiments were carried out at D8 and only if the TER coculture measured was greater than 300 Ohm.cm².

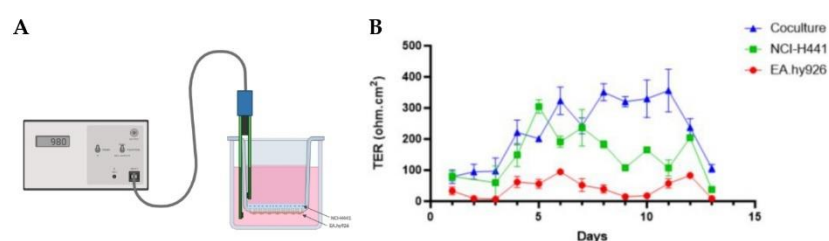


Figure 4. Functional assessment of the barrier in vitro by measuring transepithelial resistance values in (Ohm.cm²) over time (days) under three different conditions. (A) represents the method used to measure TER. (B) represents TER values obtained for EA.hy926 cells alone (red), NCI-H441 cells alone (green) and coculture (blue) over time. Values represent mean $\pm$ SEM from 3 separate experiments of triplicates. Created in <https://BioRender.com>

1.3. Exposition equivalence between the two methods of exposition

While for the method of diluting the e-liquid in the cell culture medium, the molecular concentrations were known for all the components present in the e-liquid, this is not the case for the method of trapped aerosol of the e-liquid. For this reason, we measured 2 markers in the cell culture medium used for each type of exposure. The results presented in Figure 5 show that 240 puffs trapped approximatively represent the equivalence of 1% of e-liquids vehicles mass, but correspond with more than 2.5% of vehicle osmolality. Overall, these results show that a large number of puffs were required to achieve equivalence for a low concentration of diluted products.

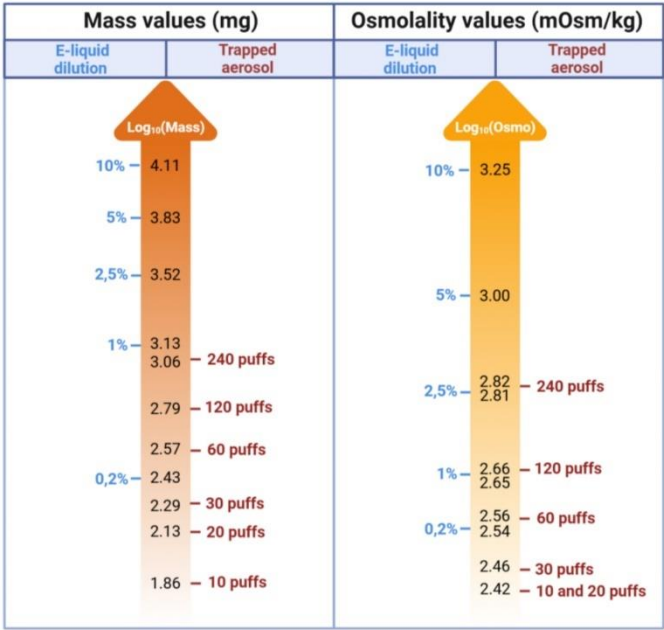


Figure 5. Schematic representation of the equivalences calculated between the dilution and aerosol entrapment exposure methods, based on two different parameters: mass (mg) and osmolality (mOsm/kg). The results are presented as a logarithmic scale (Log₁₀) and represent the mean of the results obtained for each flavoured e-liquid (Strawberry, Raspberry, Blackberry, Blueberry). Created in <https://BioRender.com>.

1.4. Impact of exposure on the cell viability

LDH is a cytoplasmic enzyme expressed constitutively in all cell types, it is released into the culture medium during cytolysis. Measurement of absorbance (450 nm) of the LDH products after exposure to increased e-liquid concentrations by dilution (from 0.2 to 10%) or trapping of aerosol (from 10 to 240 puffs) was not modified compared to untreated cells, except for Blueberry flavored e-liquids (Figure A.3). In fact, at a range of small concentrations of Blueberry flavored e-liquids diluted in culture medium (0.2 to 2.5%), we observed a significant decrease of LDH absorbance and therefore a significant decrease of cell death. We have also demonstrated a tendency towards increased LDH at high concentration (10%) of diluted flavoured e-liquids.

1.5. Impact of exposure on the barrier permeability

Increasing the osmolality of the culture medium is a factor in cell retraction, which can lead to permeabilizing or breaking of the cell barrier. The molecules influencing osmolality are mainly the PG and VG of the vehicle. The cell barrier significantly increased its permeability from a dilution of PG/VG to more than 5% of liquid or more than 1 000 mOsm/kg (Figure 5 and 6). It is interesting to note that the dilution of small quantities of e-liquid (0.2 to 2.5%) in the cell culture medium has no impact on the permeability of the barrier except for a 2.5% dilution of e-liquid containing strawberry or raspberry flavours. In the latter two cases, the TER values were increased meaning that the barrier was significantly strengthened.

In our experiments with trapped aerosols, the TER value does not decrease due to the low trapping of PG/VG in the culture medium after the generation of 10 to 240 puffs. More surprisingly, in cell medium containing trapped aerosol, the TER profile was different compared to PG/VG profile, insofar as an increase in TER was observed with all the berries but with different intensities and depending on the number of puffs. Thus, for the strawberry and raspberry aerosols emerged a significant increase of TER from 60 puffs, whereas the other berry flavours only induced a significantly increased of TER from 120 puffs. Moreover, Blackberry and Raspberry aromas presented a maximum of values up to 169% and 171% of the control, respectively.

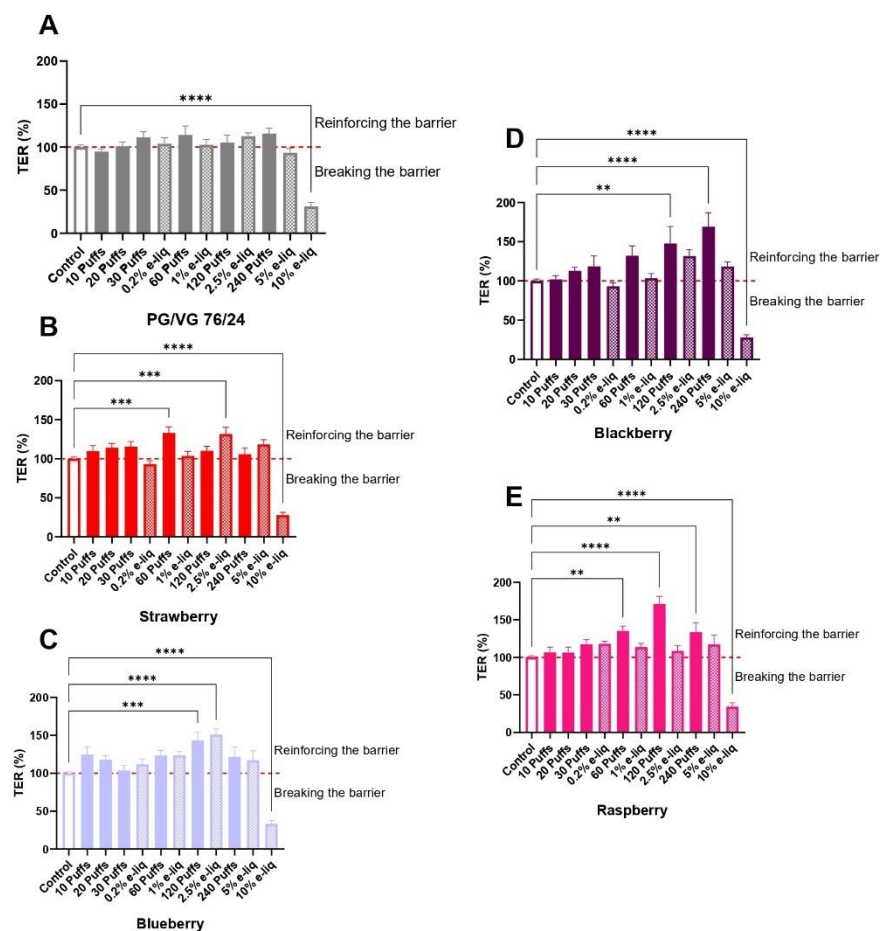


Figure 6. Measurement of TEER in percentage of control (CTL are white histograms and arbitrary set at 100%) after a 24h exposure to e-liquids by dilution (dashed histograms) or trapped (full colored histograms). The exposures are classified according to their osmolality values. Each graph represents a specific flavoured e-liquid. **(A)** represents TEER in percentage of control after a 24h exposure to PG/VG (76/24) exposure in culture medium. **(B)-(E)** represent TEER in percentage of control after a 24h exposure to PG/VG (76/24) + Strawberry, Blueberry, Blackberry and Rasperry flavours exposure, respectively. Data are shown as mean $\pm$ SEM, n = 3-4 experiments of triplicates. Statistics:

One-way ANOVA, followed by Dunnett’s multiple comparisons test; $\alpha = 0.05$ (** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$; **** : $p < 0.0001$)

1.6. Impact of exposure on mitochondrial oxidative stress

Berry aromas are often associated with antioxidant properties, which is why mitochondrial superoxide anion production was measured for each exposure to the different aromas (Figure 7).

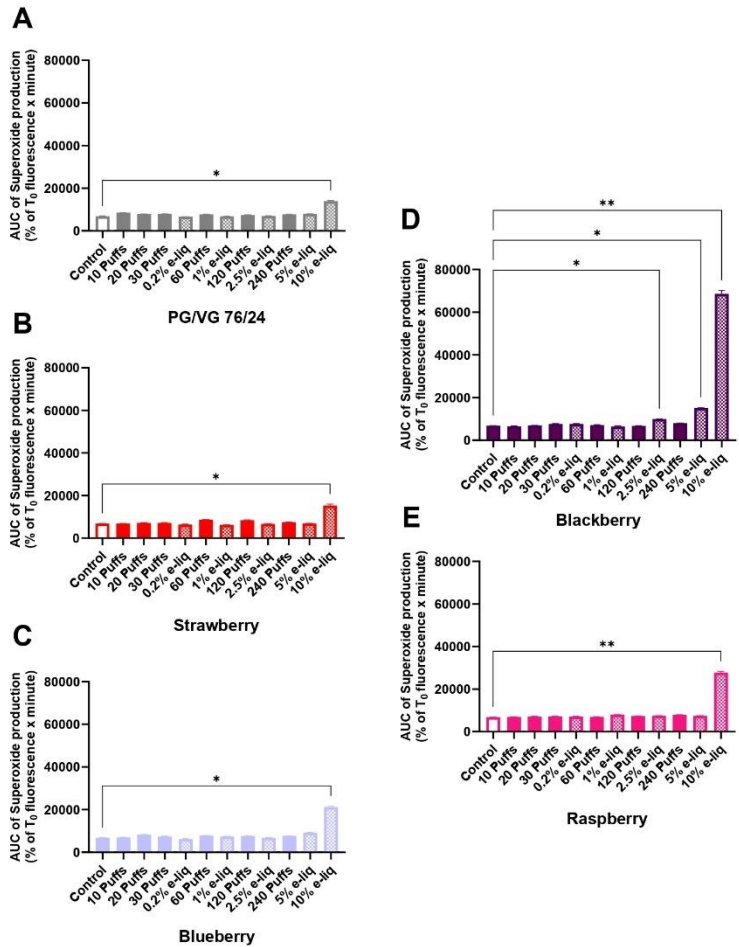


Figure 7. Area under the curve of superoxide production according to exposure of e-liquid by dilution (dashed histograms) or by trapped aerosol (full colored histograms) containing PG/VG alone without flavours. (A), PG/VG (76/24) + Strawberry flavours (B), PG/VG (76/24) + Blueberry flavours (C), PG/VG (76/24) + Blackberry flavours (D) and PG/VG (76/24) + Raspberry flavours (E). These AUC represent values of fluorescence curve kinetic, for 1 hour, obtained with a Mitochondrial Superoxide Indicator (MitoSoxRed®). Data are shown as mean $\pm$ SD, n = 3–4 experiments of triplicates. Statistics: Two-way ANOVA, followed by Dunnett’s multiple comparisons test; $\alpha = 0.05$ (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$)

The results shown in figure 7 indicated that PG/VG does not generate significantly more superoxide anion than the control except at high concentration in the diluted form. In fact, the production of anion superoxide was significantly higher than the control at 10% of e-liquid ($p = 0.0418$). Strawberry ($p = 0.0167$), Raspberry ($p = 0.0069$) and Blueberry ($p = 0.0106$) flavours showed the same oxidative stress profile than the vehicle. In fact, no increase in mitochondrial oxidative stress was found, apart from a significant increase at 10% in the diluted form compared with the untreated cells. However, we were able to observe an earlier oxidative response for the blackberry flavour. Indeed, a significant increase in mitochondrial oxidative stress was observed at a lower concentration of 2.5% ($p = 0.0459$) for the diluted form, and gradually at 5% ($p = 0.0171$) and 10% ($p = 0.0021$). However, whether for the vehicle alone or for flavoured e-liquids, no significant increase was found for the trapped form.

4. Discussion

The aim of this study was to highlight the potential toxicity and effects of four red fruit flavours on an in vitro model of the alveolar-capillary barrier. Two exposure methods were investigated: the first involved diluting the e-liquid in the cell medium, while the second involved exposing the model to an aerosol trapped in culture medium.

Firstly, the coculture model was validated both phenotypically and functionally, as this model had never been described in publication. To this end, several key markers of the cells making up the alveolar-capillary barrier were targeted, such as cell junction proteins, surfactant protein D for alveolar epithelial cells, and endothelial specific proteins such as CD31, vWF and eNos for endothelial barrier cells. We confirmed the expression of these markers by qRT-PCR, Western blot and immunofluorescence. We also determined the amount of SP-D produced by the cells in the cell supernatant in the apical region of the coculture insert. We found an approximate concentration of 171 pg/mL of SP-D protein in the supernatant by an ELISA assay. This concentration appears to be much lower than that found in the literature for serum or bronchoalveolar lavage assays on healthy patients. In serum, concentrations of between 66 and 107.7 ng/mL have been described [24, 25]. In bronchoalveolar fluids, SP-D concentrations are much higher, approaching 800 ng/mL [24]. However, the literature is fairly thin on cellular models and the concentrations of SP-D that can be released in the supernatant. One recent study showed that SP-D concentration in airway surface fluids was around 17 ng/mL in a primary model of alveolar epithelial cells after 14 days in Air Liquid Interface (ALI) [26]. We assume that the low SP-D concentration in our model can be explained by different ways. Firstly, it is possible that the use of a cell line in the coculture model rather than primary cultures from patients is a factor that may account for the low concentration of SP-D measured in the surfactant. Indeed, it is possible that NCI-H441 cells, although considered as type II pneumocytes, are not 100% identical to type II alveolar cells from a functional and secretory point of view [27]. Secondly, the absence of an immune component in the coculture model limits the influence of cytokine stimuli on NCI-H441 epithelial cells and may limit surfactant protein expression. Surfactant protein expression appear to be dependent on several types of signal in the pulmonary region [28, 29]. Indeed, one study demonstrated the impact and influence of certain Th1/Th2 cytokine signals on human type II alveolar epithelial cells. IL-13 significantly reduced the expression of mRNA encoding the SP-D protein, while IFN- γ significantly increased mRNA and protein expression [29]. It could therefore be interesting to evaluate the SP-D concentration after treatment with cytokines, or to add

PMA-treated THP-1 monocytic cells to the coculture model to confer macrophagic properties [30]. Finally, the low concentration measured in the supernatant of our cocultures may be linked to a phenomenon of dilution of a low protein concentration in the volume of medium placed in the apical region of the insert. Furthermore, this culture medium is changed every two days, whereas type II alveolar epithelial cells are known for their particularly slow secretory functions [31]. It is therefore possible that the cells did not have time to secrete and accumulate enough SP-D protein in medium before sampling.

Once the cellular model had been developed, the two methods for exposing the coculture model to e-liquids/aerosols were set up. In order to compare the two methods, two different markers were used: the mass of e-liquid aerosolized/diluted and the osmolality of the culture media in which the e-liquids were diluted or the aerosols were trapped. The osmolality of the media was used as a marker, as described in several studies. In fact, e-liquids have a hyperosmolar character, mainly due to the PG/VG vehicle [5, 32, 33, 34]. For this reason, we decided to use this marker to compare the two exposure methods. The links between the 2 methods of exposure were not straightforward, as aerosolization does not entrain all the molecules present in the e-liquid in the same way. In addition to the difficulty of comparing these methods in terms of concentration, it is also difficult at present to establish the proportion of elements present in the e-liquid that have been successfully transferred in the culture medium after trapping. Indeed, the various components of an e-liquid, including flavours, have different evaporation characteristics, so it is conceivable that a portion of the compounds may not be trapped in the culture medium. Several other factors can also influence the trapping of chemical compounds in the culture medium, including the polarity, composition of the vehicle used in the e-liquid, but also the solubility of compounds in the vehicle [35]. Overall, these results show that a large number of puffs are required to achieve an equivalence with a low concentration of diluted products. In fact, to reach a concentration of 2.5% by dilution in the e-liquid, via the equivalence established by osmolality, we estimate that around 240 puffs are trapped in the culture medium. Inhaling 240 puffs represents a day's vaping for a heavy user. It is known that 1 mL of liquid corresponds to approximatively 300 puffs [36]. It is recommended that daily consumption should never exceed 5 mL/day or 1500 puff/day. In addition to the number of puffs, other factors such as e-cig power, inhalation profiles and the vehicles used can significantly vary the use and doses inhaled by consumers.

We showed in the results that LDH concentration, linked to cell death, was not significantly changed after treatment with e-liquids or trapped aerosols except for blueberry flavoured e-liquid which caused a decrease in cell death at low concentrations of diluted e-liquid. We have, however, identified a tendency for diluted e-liquids to increase in high concentration in the culture medium (10%). This observation was also described in the work of Sabo et al. where a significant increase in cell death, by LDH assay, was demonstrated [5]. The hyperosmolality of the cellular environment, due to PG/VG vehicle in a flavour independent way, may be at the origin of an osmotic shock that cannot be compensated by cellular mechanisms.

We can compare these cell death observations with those obtained when assessing barrier integrity. For high concentrations of e-liquids diluted in cell culture medium (10%), we have significant cell responses. Indeed, we have demonstrated a significant reduction in trans-epithelial resistance, TER, and thus in barrier integrity in vitro. These results confirm the observations made concerning cell death, and have also been described by Sabo et al. [5]. Decreases in barrier integrity have already been described after exposure to diluted e-liquids, but also to aerosols exposed directly to the cells. This was described by Effah et al. after exposure to aerosols composed of PG/VG vehicles with or without fla-

vourings (hazelnut, cinnamon, etc.) [8]. However, according to the equivalence scale established in this work, 10% of e-liquids would be equivalent to 1000 puffs. These proportions would be well above the maximum recommended for users. Our results also show a significant increase in TER for each of the flavoured e-liquids at intermediate concentrations. Indeed, at 60 puffs, TER increased significantly for both strawberry and raspberry flavours. At 120 puffs, TER increased significantly for Blackberry, Raspberry and Blueberry flavours, versus Blackberry and Raspberry at 240 puffs. These differences on barrier integrity can be explained by the differences in chemical composition of the flavours, which may lead to different processes in the cellular model. Another hypothesis can also be the different volatility of the compounds and their ability to be transferred to the culture medium for aerosol trapping. In addition to exposure by aerosol trapping, exposure to e-liquids also revealed an increase in TER at 2.5% for strawberry- and blueberry-flavoured e-liquids. This observation was also highlighted in the paper by Sabo et al, where e-liquid diluted to 2.5% in the culture medium caused a significant increase in TER for another coculture model [5]. This increase appears to be dependent on the flavours added to the vehicles, as no significant increase in TER after exposure to the PG/VG vehicle alone (76/24) by aerosol dilution or trapping was observed. In order to explain this unexpected increase in TER, it seems worthwhile to study the expression of several junction proteins directly linked to the integrity of the ACB, such as occludin, ZO-1 or claudin-5.

Finally, we studied mitochondrial oxidative stress in NCI-H441 cells after exposure to diluted e-liquids and trapped aerosols. Once again, differences between flavour types are notable. In fact, we observed for the blackberry flavoured e-liquid an increase in mitochondrial oxidative response for lower concentration compared to the vehicle alone and other flavoured e-liquids. The chemical composition of the aromas may once again explain these differences. We have also shown that, compared with the diluted form, the trapped form does not significantly increase mitochondrial oxidative stress. We can assume that the aerosol trapping method does not necessarily contain all the elements present in the e-liquid, or it does so in lesser proportion, which supports what has been demonstrated in the comparison of the two exposure methods. In fact, these results are in line with the idea of using LC-MS-TOF to chemically study e-liquids in native form and aerosols in trapped form, in order to establish the differences in composition between the flavours and between the two exposure methods that are responsible for the differences in toxicity. In addition, direct exposure of cells to e-cigarette aerosol produced in a standardized way by a smoking machine would also be a further step towards limiting exposure bias and mimicking more closely what happens in vivo in vapers. We can't rule out that the drop in TER is linked to a significant increase in mitochondrial oxidative stress for a 10% dilution of liquid in the cell culture medium for all flavours and vehicle alone.

5. Conclusions

In conclusion, this work led to the design and validation a new in vitro model of the alveolar-capillary barrier, with the aim of studying the toxicity of e-liquids widely used by consumers: berry-flavoured e-liquids. To do this, we used two exposure methods of coculture models, one by dilution and the other by aerosol trapping, which allows us to get closer to the composition of the e-liquid actually inhaled. We were able to highlight the hyperosmolar nature of the vehicle contained in the vast majority of e-liquids. This hyperosmolar character seems to be at the origin of various cellular responses such as an increase in cell death by necrosis, an alteration in barrier integrity and an increase in mitochondrial oxidative stress at high concentration. We were able to demonstrate different

cellular responses depending on the exposure method used. In fact, for the trapped form of the aerosol, we demonstrated an increase in barrier integrity at low number of puffs. In addition to exposure methods, we found variable cellular responses depending on the type of flavoring present in the e-liquid. Blackberry flavour induced an earlier increase in mitochondrial oxidative stress than the others. To provide further answers to these inter-flavour and inter-exposure method variabilities, it seems essential to chemically characterize each of the e-liquids/trapped aerosols used in this study.

6. Patents

This section is not mandatory but may be added if there are patents resulting from the work reported in this manuscript.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

Author Contributions: **Conceptualization**, Emma Filaudeau, Véronique Kemmel, Amelia-Naomi Sabo; **Methodology**, Emma Filaudeau, Anita Lebert, Amelia-Naomi Sabo, Véronique Kemmel; **Validation**, Emma Filaudeau, Véronique Kemmel, Amelia-Naomi Sabo; **Formal analysis**, Emma Filaudeau, Véronique Kemmel, Amelia-Naomi Sabo, Anita Lebert; **Investigation**, Emma Filaudeau, Amelia-Naomi Sabo, Anita Lebert; **Ressources**, Véronique Kemmel, Laurent Monassier; **writing—original draft preparation**, Emma Filaudeau, Véronique Kemmel; **writing—review and editing**, Emma Filaudeau, Anita Lebert, Amelia-Naomi Sabo, Véronique Kemmel, Laurent Monassier; **visualization**, Emma Filaudeau; **supervision**, Véronique Kemmel, Amelia-Naomi Sabo; **project administration**, Véronique Kemmel, Emma Filaudeau; **funding acquisition**, Véronique Kemmel, Laurent Monassier. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by SATT Conectus (Strasbourg) in a CIFRE agreement (n° 2022/0276) with GAIATREND company.

Institutional Review Board Statement: Not applicable

Data Availability Statement: Data will be made available on request.

Acknowledgments: Authors thanks sincerely Elisa Meyer for her help on the trapped aerosol experiments, Pascal Kessler from the PIC-STRA imaging platform (CRBS, Strasbourg) for his help on microscopy acquisition and Anne-Laure Charles from UR3072 (CRBS, Strasbourg) for her help on the MitoSOX® assay.

Conflicts of Interest: This work was carried out under a CIFRE agreement n°2022/0276 (Industrial agreements for training through research) between University of Strasbourg (FRANCE) and GAIATREND company (FRANCE), which financed the author's thesis. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

e-cig	e-cigarette
IF	Immunofluorescence
PG	Propylene glycol
TER	Transepithelial Resistance
VG	Vegetal Glycerine
WB	Western Blot

Appendix A

Table A.1

619

Table A1. List of primers and antibodies used in this article

620

Primer	Reference	Brand
18S	#qHsaCED0037454	Biorad
Actin	#qHsaCED0005010	Biorad
GAPDH	#qHsaCED0038674	Biorad
ZO-1	#qHsaCID0018062	Biorad
Occludin	#qHsaCED0038290	Biorad
SP-D	#qHsaCID0012776	Biorad
SP-A	#qHsaCED0005710	Biorad
vWF	#qHsaCED0043330	Biorad
eNos	#qHsaCID0015042	Biorad

Primary antibody	Reference	Brand	Dilution
Mouse Anti ZO-1	#33-9100	Invitrogen	WB : 1000 IF : 1/100
Mouse Anti Occludin	#33-1500	Invitrogen	IF : 1/100
Rabbit Anti Occludin	#ab216327	Abcam	WB : 1/1000 IF : 1/100
Mouse Anti SP-D	#ab17781	Abcam	WB : 1/500 IF : 1/100
Rabbit Anti CD31	#ab28364	Abcam	WB : 1/500 IF : 1/100
Rabbit Anti vWF	#ab6994	Abcam	WB : 1/500 IF : 1/100
Mouse Anti eNos	#ab76198	Abcam	WB : 1/1000 IF : 1/100

Secondary antibody	Reference	Brand	Dilution
Anti Mouse IgG-HRP (produced in Rabbit)	#A9044	Sigma-Aldrich	1/10000
Anti Rabbit IgG-HRP (produced in Goat)	#A9169	Sigma-Aldrich	1/10000
Anti Rabbit IgG-Alexa Fluor™ Plus 488 (pro- duced in Goat)	#A32731	Invitrogen	1/500
Anti-Mouse IgG-Alexa Fluor® 647 (produced in Goat)	#ab150115	Abcam	1/500

621

Figure A.2

622

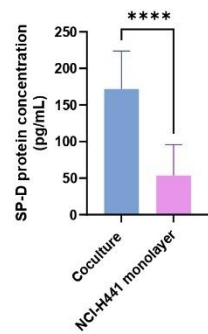


Figure A.2. Histograms representing the SP-D protein concentration in pg/mL determined by an ELISA test in the supernatant of the coculture or monolayer of NCI-H441 cells. Data are shown as mean $\pm$ SD, n = 2 experiments of triplicates. Statistics: t-test ; $\alpha = 0.05$ (****: $p < 0.0001$)

Figure A.3

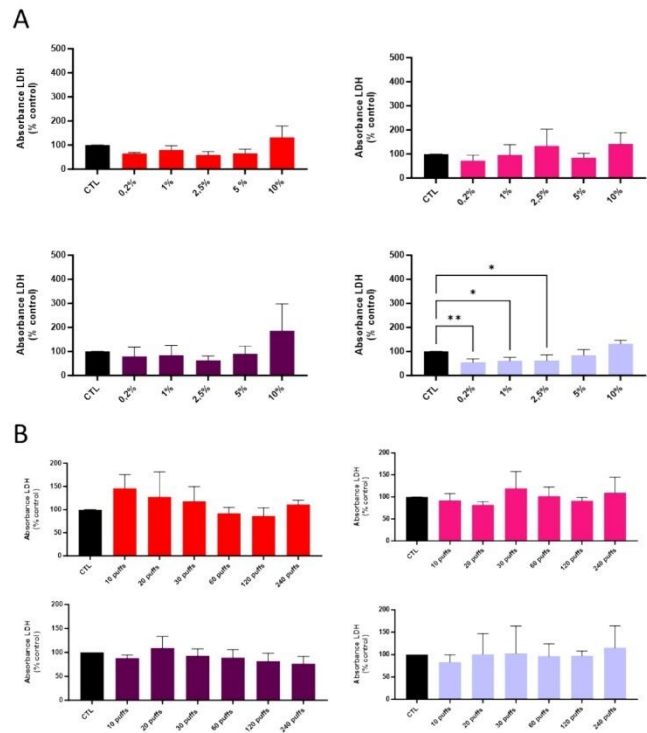


Figure A.3. Measurement of LDH absorbance (450 nm) according to e-liquid concentration (A) by dilution (from 0.2 to 10%) and (B) by trapped aerosol (from 10 to 240 puffs). Data were expressed in percentage of control (CTL) after a 24h exposure to e-liquids or trapped aerosol. Each graph stands for a specific flavored e-liquid. Data are shown as mean $\pm$ SD, n = 3-4. Statistics : One-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test; $\alpha = 0,05$ (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$)

References

- [1] A. Pasquereau, R. Andler, R. Guignard, N. Soullier, F. Beck, et V. Nguyen-Thanh, « Prévalence du tabagisme et du vapotage en France métropolitaine en 2022 parmi les 18-75 ans », mai 2023.
- [2] E. J. Z. Krüsemann, S. Boesveldt, K. de Graaf, et R. Talhout, « An E-Liquid Flavor Wheel: A Shared Vocabulary Based on Systematically Reviewing E-Liquid Flavor Classifications in Literature », *Nicotine Tob Res*, vol. 21, n° 10, p. 1310-1319, mai 2018, doi: 10.1093/ntr/nty101.
- [3] A. M. Morris, S. S. Leonard, J. R. Fowles, T. E. Boots, A. Mnatsakanova, et K. R. Attfield, « Effects of E-Cigarette Flavoring Chemicals on Human Macrophages and Bronchial Epithelial Cells », *IJERPH*, vol. 18, n° 21, p. 11107, oct. 2021, doi: 10.3390/ijerph182111107.
- [4] C. A. Lerner *et al.*, « 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 », *PLoS ONE*, vol. 10, n° 2, p. e0116732, févr. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0116732.
- [5] A.-N. Sabo, E. Filaudeau, S. Da Silva, G. Becker, L. Monassier, et V. Kemmel, « Flavoured and nicotine-containing e-liquids impair homeostatic properties of an alveolar-capillary cell model », *Food and Chemical Toxicology*, vol. 174, p. 113650, avr. 2023, doi: 10.1016/j.fct.2023.113650.
- [6] T. Muthumalage, M. Prinz, K. O. Ansah, J. Gerloff, I. K. Sundar, et I. Rahman, « Inflammatory and Oxidative Responses Induced by Exposure to Commonly Used e-Cigarette Flavoring Chemicals and Flavored e-Liquids without Nicotine », *Front Physiol*, vol. 8, p. 1130, janv. 2018, doi: 10.3389/fphys.2017.01130.
- [7] V. Nair *et al.*, « Menthol in electronic cigarettes: A contributor to respiratory disease? », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 407, p. 115238, nov. 2020, doi: 10.1016/j.taap.2020.115238.
- [8] F. Effah, J. Adragna, D. Luglio, A. Bailey, T. Marczylo, et T. Gordon, « Toxicological assessment of E-cigarette flavored E-liquids aerosols using Calu-3 cells: A 3D lung model approach », *Toxicology*, vol. 500, p. 153683, déc. 2023, doi: 10.1016/j.tox.2023.153683.
- [9] J. H. Hwang *et al.*, « Electronic cigarette inhalation alters innate immunity and airway cytokines while increasing the virulence of colonizing bacteria », *J Mol Med*, vol. 94, n° 6, p. 667-679, juin 2016, doi: 10.1007/s00109-016-1378-3.
- [10] A. Kulháněk et A. Baptistová, « Chemical Composition of Electronic Cigarette e-Liquids: Overview of Current Evidence of Toxicity », *ADIKTOLOGIE Journal*, n° 03-04/2020, 2020, doi: 10.35198/01-2020-002-0007.
- [11] L. Lai et H. Qiu, « Biological toxicity of the compositions in electronic-cigarette on cardiovascular system », *J Cardiovasc Transl Res*, p. 10.1007/s12265-020-10060-1, août 2020, doi: 10.1007/s12265-020-10060-1.
- [12] H. Chen *et al.*, « Maternal E-Cigarette Exposure in Mice Alters DNA Methylation and Lung Cytokine Expression in Offspring », *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 58, n° 3, p. 366-377, mars 2018, doi: 10.1165/rcmb.2017-0206RC.
- [13] A. N. Larcombe, M. A. Janka, B. J. Mullins, L. J. Berry, A. Bredin, et P. J. Franklin, « The effects of electronic cigarette aerosol exposure on inflammation and lung function in mice », *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 313, n° 1, p. L67-L79, juill. 2017, doi: 10.1152/ajplung.00203.2016.
- [14] C. Glynos *et al.*, « Comparison of the effects of e-cigarette vapor with cigarette smoke on lung function and inflammation in mice », *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 315, n° 5, p. L662-L672, nov. 2018, doi: 10.1152/ajplung.00389.2017.
- [15] S. Cirillo *et al.*, « The Customizable E-cigarette Resistance Influences Toxicological Outcomes: Lung Degeneration, Inflammation, and Oxidative Stress-Induced in a Rat Model », *Toxicological Sciences*, vol. 172, n° 1, p. 132-145, nov. 2019, doi: 10.1093/toxsci/kfz176.
- [16] M. C. Madison *et al.*, « Electronic cigarettes disrupt lung lipid homeostasis and innate immunity independent of nicotine », *J Clin Invest*, vol. 129, n° 10, p. 4290-4304, oct. 2019, doi: 10.1172/JCI128531.

- [17] F. Vivarelli, D. Canistro, S. Cirillo, V. Cardenia, M. T. Rodriguez-Estrada, et M. Paolini, « Impairment of testicular function in electronic cigarette (e-cig, e-cigs) exposed rats under low-voltage and nicotine-free conditions », *Life Sciences*, vol. 228, p. 53–65, juill. 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2019.04.059.
- [18] M. D. Kim *et al.*, « Vegetable glycerin e-cigarette aerosols cause airway inflammation and ion channel dysfunction », *Front Pharmacol*, vol. 13, p. 1012723, sept. 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.1012723.
- [19] M. D. Kim *et al.*, « E-cigarette aerosols of propylene glycol impair BK channel activity and parameters of mucociliary function », *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 324, n° 4, p. L468–L479, avr. 2023, doi: 10.1152/ajplung.00157.2022.
- [20] I. Yu. Yanina *et al.*, « Multimodal Diagnostics of Changes in Rat Lungs after Vaping », *Diagnostics (Basel)*, vol. 13, n° 21, p. 3340, oct. 2023, doi: 10.3390/diagnostics13213340.
- [21] J. D. Sargent *et al.*, « First E-Cigarette Flavor and Device Type Used: Associations With Vaping Persistence, Frequency, and Dependence in Young Adults », *Nicotine Tob Res*, vol. 24, n° 3, p. 380–387, août 2021, doi: 10.1093/ntr/ntab172.
- [22] P. W. Clapp, K. S. Lavrich, C. A. Van Heusden, E. R. Lazarowski, J. L. Carson, et I. Jaspers, « 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*, vol. 316, n° 3, p. L470–L486, mars 2019, doi: 10.1152/ajplung.00304.2018.
- [23] A. Raduka, N. Gao, R. L. Chatburn, et F. Rezaee, « Electronic cigarette exposure disrupts airway epithelial barrier function and exacerbates viral infection », *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 325, n° 5, p. L580–L593, nov. 2023, doi: 10.1152/ajplung.00135.2023.
- [24] Y. Honda *et al.*, « Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. », *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 152, n° 6, p. 1860–1866, déc. 1995, doi: 10.1164/ajrccm.152.6.8520747.
- [25] A. Grosicka, A. Manasar, E. J. Kucharz, et P. J. Kotyla, « Serum concentration of surfactant protein D in patients with systemic sclerosis: The potential marker of the interstitial lung disease severity », *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, vol. 32, n° 4, p. 541–549, août 2018, doi: 10.1016/j.berh.2019.01.005.
- [26] I. Tanabe et S. Ishikawa, « Comprehensive characterization of human alveolar epithelial cells cultured for 28 days at the air-liquid interface », *Sci Rep*, vol. 15, p. 22995, juill. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-07219-8.
- [27] O. Brookes, S. Boland, R. Lai Kuen, D. Miremont, J. Movassat, et A. Baeza-Squiban, « Co-culture of type I and type II pneumocytes as a model of alveolar epithelium », *PLoS One*, vol. 16, n° 9, p. e0248798, sept. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0248798.
- [28] K. Bein, M. Di Giuseppe, S. E. Mischler, L. A. Ortiz, et G. D. Leikauf, « LPS-Treated Macrophage Cytokines Repress Surfactant Protein-B in Lung Epithelial Cells », *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 49, n° 2, p. 306–315, août 2013, doi: 10.1165/rcmb.2012-0283OC.
- [29] Y. Ito et R. J. Mason, « The effect of interleukin-13 (IL-13) and interferon- γ (IFN- γ) on expression of surfactant proteins in adult human alveolar type II cells in vitro », *Respir Res*, vol. 11, n° 1, p. 157, 2010, doi: 10.1186/1465-9921-11-157.
- [30] G. Wang, X. Zhang, X. Liu, et J. Zheng, « Co-culture of human alveolar epithelial (A549) and macrophage (THP-1) cells to study the potential toxicity of ambient PM2.5: a comparison of growth under ALI and submerged conditions », *Toxicol Res (Camb)*, vol. 9, n° 5, p. 636–651, sept. 2020, doi: 10.1093/toxres/tfaa072.
- [31] T. Haller, J. Ortmayr, F. Friedrich, H. Völkl, et P. Dietl, « Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, n° 4, p. 1579–1584, févr. 1998, doi: 10.1073/pnas.95.4.1579.
- [32] I. Gonzalez-Suarez *et al.*, « In Vitro Systems Toxicology Assessment of Nonflavored e-Cigarette Liquids in Primary Lung Epithelial Cells », *Applied In Vitro Toxicology*, vol. 3, n° 1, p. 41–55, mars 2017, doi: 10.1089/aivt.2016.0040.
- [33] S. Munakata, K. Ishimori, N. Kitamura, S. Ishikawa, Y. Takanami, et S. Ito, « Oxidative stress responses in human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke and vapor from tobacco- and nicotine-containing products », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 99, p. 122–128, nov. 2018, doi: 10.1016/j.yrtph.2018.09.009.

- [34] L. Czekala, L. Simms, M. Stevenson, E. Trelles-Sticken, P. Walker, et T. Walele, « High Content Screening in NHBE cells shows significantly reduced biological activity of flavoured e-liquids, when compared to cigarette smoke condensate », *Toxicology in Vitro*, vol. 58, p. 86-96, août 2019, doi: 10.1016/j.tiv.2019.03.018.
- [35] J.-C. Noël, V. Ruzsanyi, M. Rainer, et G. Bonn, « Investigation of the evaporation behavior of aroma compounds in e-cigarettes », *Anal Bioanal Chem*, vol. 411, n° 14, p. 3029-3035, 2019, doi: 10.1007/s00216-019-01749-7.
- [36] G. J. Hildick-Smith *et al.*, « A Practitioner's Guide to Electronic Cigarettes in the Adolescent Population », *Journal of Adolescent Health*, vol. 57, n° 6, p. 574-579, déc. 2015, doi: 10.1016/j.jadohealth.2015.07.020.
- Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

IV.2.2. Etude de l'expression des protéines de jonction

L'augmentation de l'intégrité de la barrière in vitro à de faibles concentrations d'e-liquide laisse supposer que des processus cellulaires, tels que la modulation de l'expression de protéines de jonctions, interviennent. Nous avons étudié l'effet des e-liquides sur la lignée épithéliale NCI-H441 car nous avons montré que ces cellules sont les plus impliquées dans la fonction de barrière de la BAC. La Figure 34 illustre la modulation de l'expression de la protéine d'occludine ainsi que les changements liés à sa localisation cellulaire après 24h d'exposition à un e-liquide dilué à 2,5 %. En effet, dans des conditions sans traitement, les cellules épithéliales alvéolaires expriment l'occludine de manière très localisée essentiellement en région membranaire (Figure 34.A). Après une exposition à du milieu de culture, dans lequel nous avons dilué l'e-liquide fruits rouges à 2,5 %, l'expression de l'occludine apparaît très largement en région cytoplasmique même si la localisation membranaire reste visible (Figure 34.B).

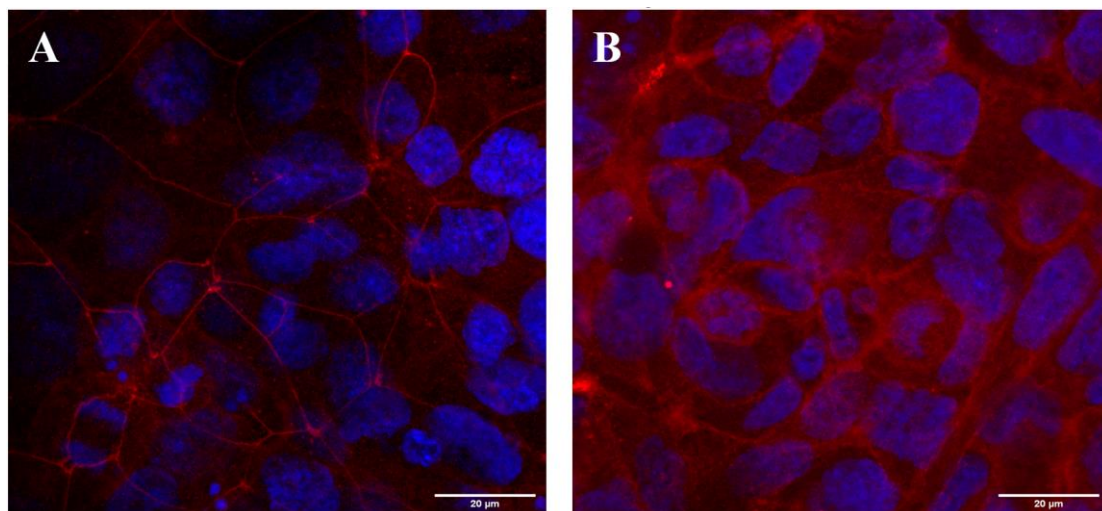


Figure 34 : Immunofluorescence mettant en évidence l'expression et la localisation de l'occludine, dans les cellules NCI-H441 dans (A) des conditions contrôle et (B) après 24h d'exposition à l'e-liquide fruits rouges dilué à 2,5 % dans le milieu de culture. L'anticorps secondaire utilisé est couplé à un fluorochrome Alexa647® (rouge). Toutes les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal, les noyaux sont marqués au DAPI (bleu) et la barre d'échelle est de 20 µm.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'expression des protéines de jonction 24h après une exposition des cellules NCI-H441 à un milieu contenant des aérosols d'e-liquides piégés. Nos recherches se sont focalisées sur l'expression de trois protéines de jonction : occludine, ZO-1 et

Claudin-5. Plusieurs e-liquides aérosolisés ont été étudiés : le véhicule PG/VG 76/24 sans arôme, puis des e-liquides aromatisés à la fraise, à la framboise, à la mûre et à la myrtille.

L'occludine est une protéine de jonction largement exprimée par les cellules épithéliales et elle participe au maintien de l'intégrité de la BAC comme dans d'autres barrières physiologiques. Nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression protéique de l'occludine 24 heures après une exposition à du milieu de culture dans lequel ont été piégés 240 puffs d'aérosol aromatisé à la fraise ($p < 0,05$) (Figure 35.C). En revanche, seule une tendance graduelle à l'augmentation a été observée pour le véhicule PG/VG et les autres e-liquides aromatisés à la mûre, framboise et myrtille (Figure 35.A, B, D et E).

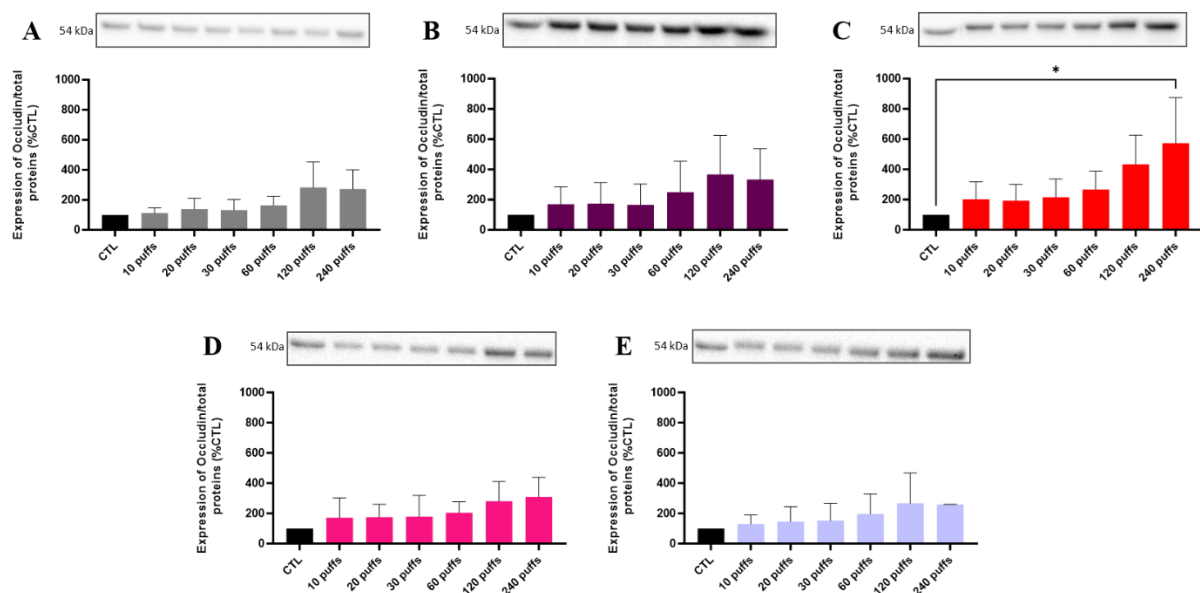


Figure 35: Histogrammes et western blots mettant en évidence une modification d'expression de l'occludine dans les cellules alvéolaires épithéliales NCI-H441 traitées pendant 24h avec du milieu de culture dans lequel un nombre croissant de puffs d'aérosols d'e-liquides a été piégé. (A) Véhicule PG/VG 76/24. (B) e-liquide mûre, (C) e-liquide fraise, (D) e-liquide framboise (E) e-liquide myrtille. Les valeurs de densité d'occludine par rapport aux protéines totales (stain free) sont présentées sous forme d'histogrammes indiquant la moyenne $\pm$ SD d'au moins trois expériences indépendantes en triplicata. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$ (* : $p < 0,05$)

L'expression de la claudin-5, autre protéine impliquée dans les jonctions serrées, a également été investiguée. Suite aux expérimentations menées, aucune conclusion n'a pu être tirée. En effet, la grande variabilité des résultats obtenus, pour l'ensemble des aérosols piégés, limite l'interprétation de ces données (Figure 36).

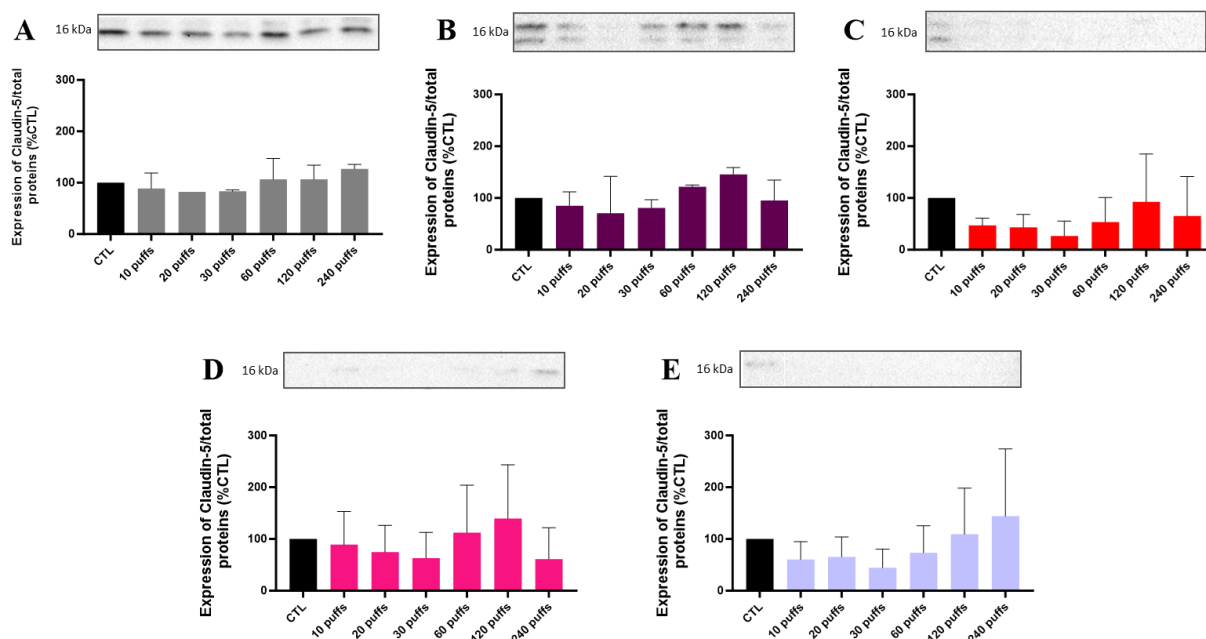


Figure 36 : Histogrammes et western blots mettant en évidence l'expression de la claudin-5 dans les cellules alvéolaires épithéliales NCI-H441 traitées pendant 24 h avec du milieu de culture dans lequel un nombre croissant de puffs d'aérosols d'e-liquides a été piégé. (A) Véhicule PG/VG 76/24. (B) e-liquides mûre, (C) e-liquides fraise, (D) e-liquides framboise (E) e-liquides myrtille. Les valeurs de densité de la claudin-5 par rapport aux protéines totales (méthode stain free) sont présentées sous forme d'histogrammes indiquant la moyenne $\pm$ SD d'au moins trois expériences indépendantes en triplicate. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$

Pour finir, nous avons investigué l'expression de la protéine ZO-1. Cette dernière est étroitement liée à l'occludine et elle stabilise l'occludine à la surface membranaire des cellules épithéliales. De la même manière que pour la claudin-5, les expérimentations menées ne nous permettent pas de conclure de manière précise quant à un effet des e-liquides aérosolisés et piégés dans le milieu de culture sur l'expression de ZO-1 (Figure 37).

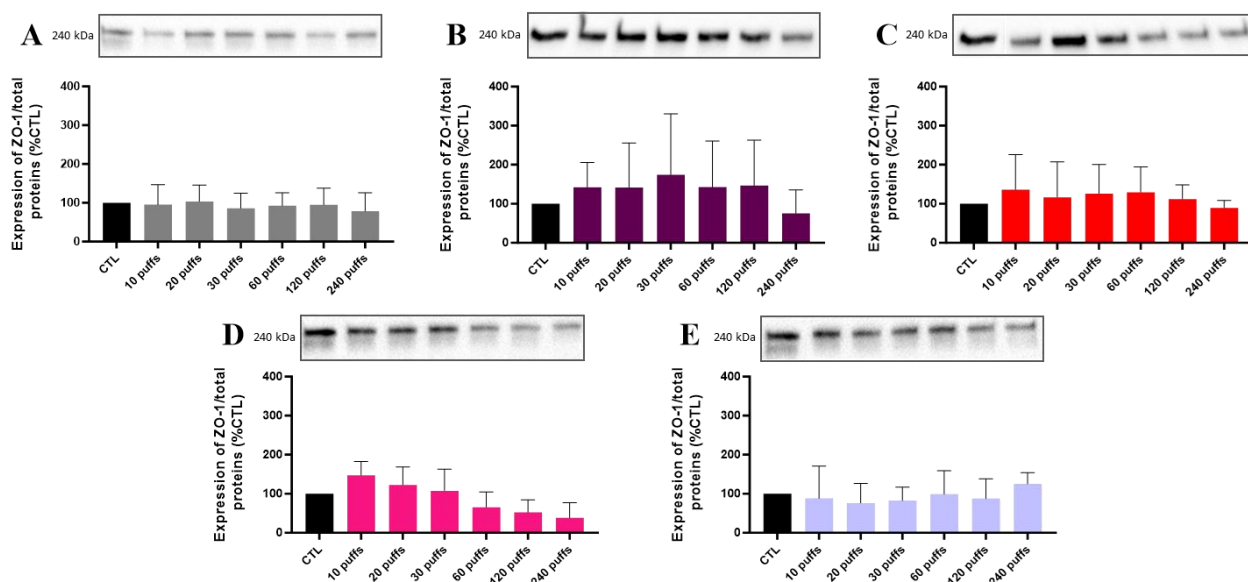


Figure 37 : Histogrammes et western blots mettant en évidence l'expression de ZO-1, dans les cellules alvéolaires épithéliales NCI-H441 traitées pendant 24 h avec du milieu de culture dans lequel un nombre croissant de puffs d'aérosols d'e-liquides a été piégé. (A) Véhicule PG/VG 76/24, (B) e-liquide mûre, (C) e-liquide fraise, (D) e-liquide framboise ou (E) e-liquide myrtille. Les valeurs de densité de ZO-1 par rapport aux protéines totales (méthode stain free) sont présentées sous forme d'histogrammes indiquant la moyenne $\pm$ SD d'au moins trois expériences indépendantes en tripliquata. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$

Ces résultats obtenus pour des aérosols d'e-liquides piégés dans du milieu de culture seront comparés à ceux obtenus par la méthode par dilution des e-liquides dans le milieu de culture, qui sont actuellement en cours d'investigation.

IV.2.3. Investigations liées à une exposition directe de la coculture à l'aérosol via l'appareil Vitrocell®

Après l'installation de l'appareil Vitrocell® au laboratoire, nous avons investigué les réponses cellulaires induites après exposition de notre modèle in vitro de BAC à des aérosols d'e-liquides exposés de manière directe au modèle de coculture en ALI.

IV.2.3.a. Investigation de l'intégrité de la barrière par mesure de la TER

Le premier paramètre évalué après l'exposition directe aux aérosols est l'intégrité de la BAC par mesure de la résistance transépithéliale 24h après l'exposition de la coculture aux aérosols de e-liquides. Les expérimentations ont été menées avec les 4 e-liquides aromatisés aux fruits rouges : mûre, fraise, framboise et myrtille. On observe dans un premier temps une augmentation significative

de la TER pour les différents arômes, mais avec une intensité et un nombre de puffs variables. Ainsi, les aérosols aromatisés à la framboise ($p < 0,001$) et à la myrtille ($p < 0,0001$) ont induit une augmentation significative de l'intégrité de la BAC à 20 puffs (Figure 38.C et D). Pour l'e-liquide mûre, la TER semble augmenter de manière graduelle en fonction du nombre de puffs, même si l'augmentation de l'intégrité n'est significative qu'à 60 puffs ($p < 0,01$) et 120 puffs ($p < 0,001$) (Figure 38.A). Pour l'aérosol aromatisé à la fraise, l'effet sur l'intégrité de la BAC semble biphasique. En effet, l'intégrité de la barrière semble augmenter à partir de 10 puffs et atteindre une valeur maximum à 30 puffs ($p < 0,0001$) puis semble diminuer jusqu'à 240 puffs (Figure 38.B).

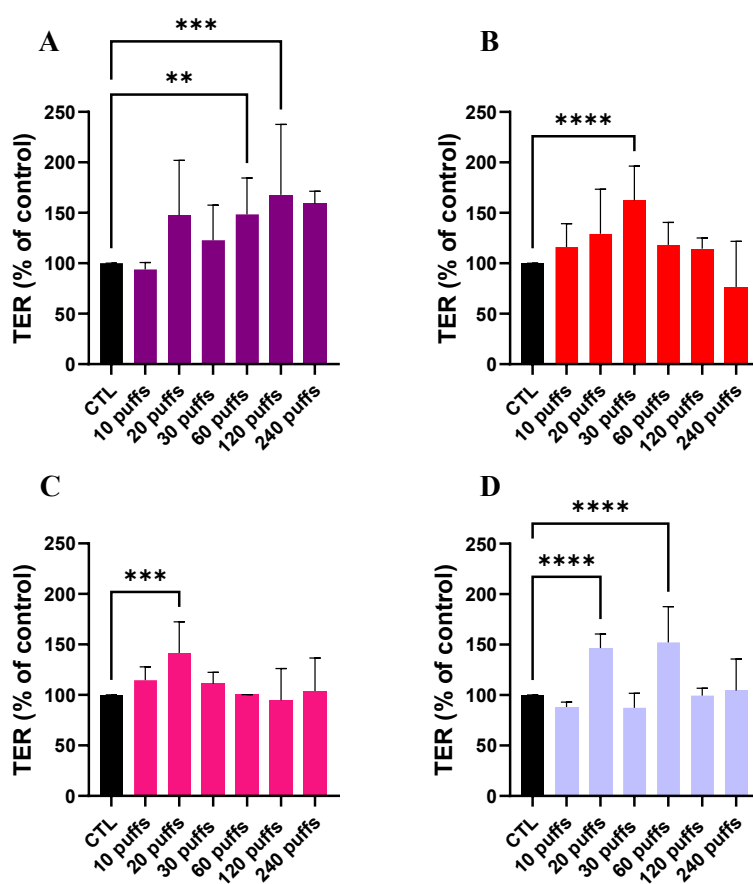


Figure 38 : Mesure de la TER (% CTL) en fonction du nombre de puffs de e-liquide et 24h après une exposition directe de la coculture aux aérosols par le dispositif Vitrocell®. Chaque graphique représente les résultats obtenus pour un e-liquide aromatisé. (A) Exposition aux aérosols d'un e-liquide mûre. (B) Exposition aux aérosols d'un e-liquide fraise. (C) Exposition aux aérosols d'un e-liquide framboise. (D) Exposition aux aérosols d'un e-liquide myrtille. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD, $n = 3$ expérimentations en triplicata. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$ (** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$)

IV.2.3.b. Evolution de la mortalité et activité enzymatique cellulaire après exposition directe aux aérosols

Nous avons mené, parallèlement aux investigations liées à l'intégrité, des expérimentations évaluant la mortalité et l'activité enzymatique cellulaire afin de comparer les réponses induites par les différents e-liquides aromatisés. De la même manière que pour les deux autres méthodes d'exposition, les cocultures exposées aux aérosols ont été soumises à des tests LDH et MTS ciblant le milieu apical de l'insert.

Nous avons obtenu des résultats variables selon l'e-liquide considéré et le nombre de puffs appliqués à la coculture. Contrairement à ce qui était attendu, la libération de LDH dans le milieu extracellulaire a tendance à diminuer pour de faibles expositions à l'aérosol d'e-liquides myrtille et framboise par rapport au contrôle exposé à l'air (Figure 39.C et D). Cette diminution est devenue significative pour l'e-liquide framboise à 20 puffs ($p < 0,05$) (Figure 39.C). Les aérosols aromatisés à la fraise, eux, ne semblent pas induire d'effets sur la mortalité cellulaire en région apicale de l'insert (Figure 39.B). Au contraire, pour les aérosols aromatisés à la framboise et à la myrtille, nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de la mortalité cellulaire à 60 puffs ($p < 0,01$) et 120 puffs ($p < 0,05$) (Figure 39.C et D). Cette réponse est également observée pour les aérosols aromatisés à la mûre, mais pour un nombre de puffs plus important. En effet, nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'activité de la LDH dans le milieu extracellulaire à une concentration égale à 240 puffs ($p < 0,0001$) (Figure 39.A).

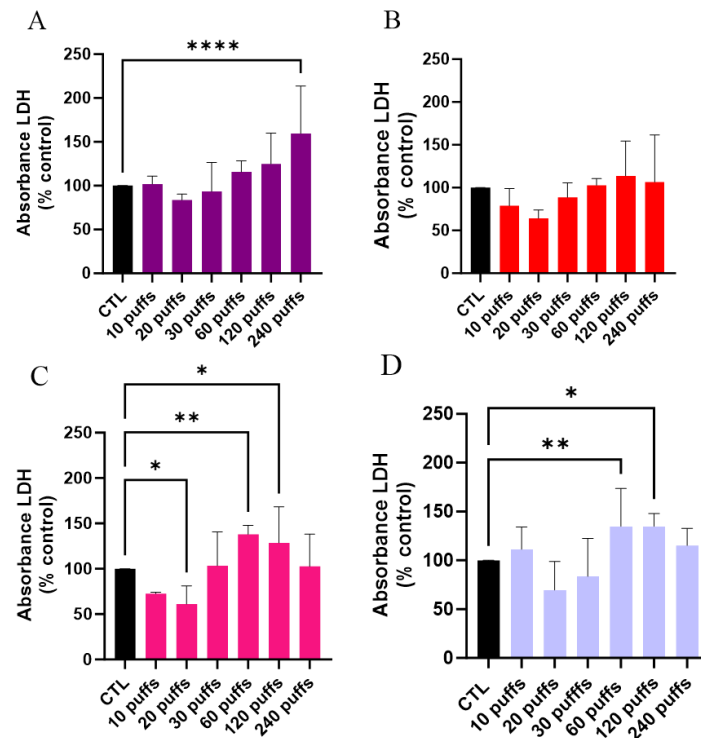


Figure 39 : Mesure de l'absorbance de l'activité LDH (% CTL) en fonction du nombre de puffs 24h après une exposition directe de la coculture aux aérosols par le dispositif Vitrocell® en région apicale de l'insert (méthode ALI). Chaque graphique représente un e-liquide aromatisé. (A) Exposition aux aérosols d'un e-liquide mûre. (B) Exposition aux aérosols d'un e-liquide fraise. (C) Exposition aux aérosols d'un e-liquide framboise. (D) Exposition aux aérosols d'un e-liquide myrtille. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD, $n = 3$ expérimentations en triplicata. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$ (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; **** : $p < 0,0001$)

Enfin, nous avons évalué l'activité enzymatique cellulaire grâce à un test MTS après une exposition directe aux aérosols. Pour ceux aromatisés à la fraise et à la myrtille, aucune modification de l'activité enzymatique cellulaire n'a pu être mise en évidence (Figure 40.B et D). Au contraire, pour les e-liquides aromatisés à la mûre et à la framboise, une augmentation significative de l'activité enzymatique a pu être observée, à respectivement 20 puffs ($p < 0,0001$) et 120 puffs ($p < 0,01$) (Figure 40.A et C). Ces résultats démontrent une nouvelle fois des différences relatives aux types d'arômes utilisés dans les e-liquides.

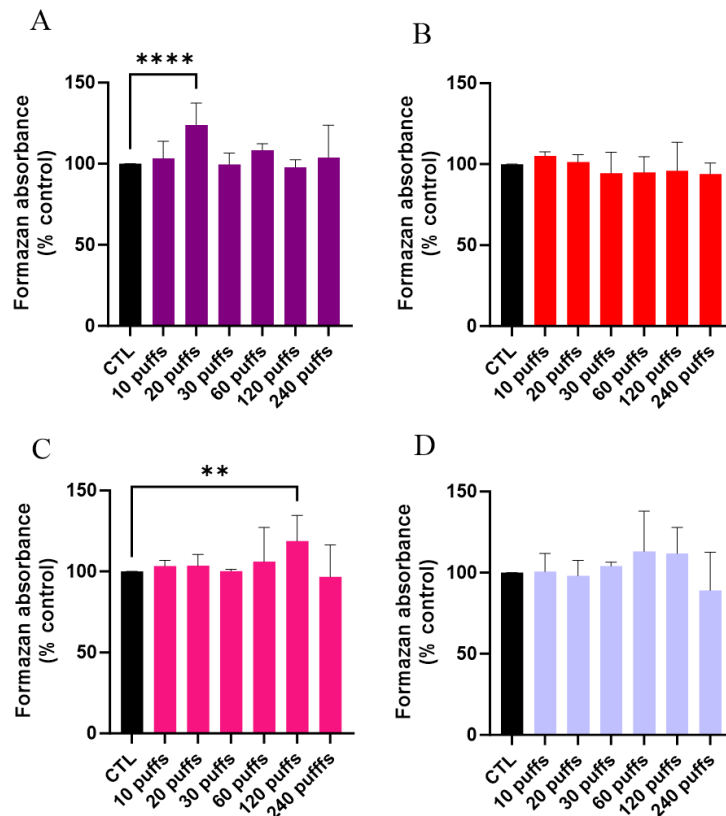


Figure 40 : Mesure de l'absorbance du formazan (% CTL) en fonction du nombre de puffs, 24h après une exposition directe de la coculture aux aérosols par le dispositif Vitrocell® en région apicale de l'insert (méthode ALI). Chaque graphique représente un e-liquide aromatisé. (A) Exposition aux aérosols d'un e-liquide mûre. (B) Exposition directe aux aérosols d'un e-liquide fraise. (C) Exposition directe aux aérosols d'un e-liquide framboise. (D) Exposition directe aux aérosols d'un e-liquide myrtille. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD, $n = 3$ expérimentations en triplicata. Statistiques : ANOVA à un facteur, suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett ; $\alpha = 0,05$ (** : $p < 0,01$; **** : $p < 0,0001$)

IV.2.4. Optimisation du modèle cellulaire par ajout d'une composante immunitaire à la coculture

Bien qu'ayant les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de la BAC, notre modèle de coculture cellulaire ne constitue pas un modèle idéal. Il lui manque *a minima* la réponse immunitaire mise en œuvre lorsque la BAC est soumise aux agressions par des molécules exogènes, particules ou microorganismes présentes dans l'air et dans les aérosols inhalés. C'est donc dans l'optique d'améliorer notre modèle que nous avons mis au point une composante de cellules immunitaires activées ou non qui pourront être ajoutées en coculture au modèle bicellulaire de BAC.

IV.2.4.a. Obtention des macrophages M₀ à partir des cellules monocytaires THP-1 par un traitement au PMA

La mise au point de la différenciation des cellules monocytaires THP-1 en macrophages de type M₀ a été menée en utilisant différentes concentrations de PMA (de 2,5 à 100 nM) pendant différentes durées de traitement (24h et 48h). Les conditions optimales, évaluées selon différents critères de jugement, seront celles utilisées pour la suite des expérimentations.

○ Concentration de PMA

Plusieurs concentrations de PMA allant de 2,5 à 100 nM ont été testées. Nous avons évalué l'impact de la concentration en PMA sur d'éventuels phénomènes de dédifférenciation cellulaire de macrophages M₀ vers le phénotype monocyttaire initial. Cet évènement a été mis en évidence après 24h de traitement avec du PMA à 2,5 nM et 5 nM. En effet, à faibles concentrations, les cellules traitées semblent rapidement perdre leur adhérence en se dédifférenciant en un phénotypique monocyttaire. Ces observations morphologiques ont été faites grâce à un microscope optique inversé. A des concentrations plus importantes (20, 50 et 100 nM), les cellules THP-1 traitées conservent leur adhérence au support de culture et conservent leur différenciation morphologique (augmentation de l'aire et du périmètre, prolongements cytoplasmiques). Pour éviter des phénomènes de toxicité liés à de trop fortes concentrations en PMA, la concentration choisie pour la différenciation des THP-1 en macrophages M₀ est 20 nM.

○ Durée de traitement

L'évaluation morphologique des cellules et de leur adhérence au support par microscopie inversée constitue notre premier critère de jugement. En effet, après traitement, les cellules monocytaires THP-1 subissent plusieurs changements morphologiques. Initialement sphériques et en suspension, les cellules THP-1 traitées par 20 nM de PMA deviennent adhérentes et de forme amiboïde. Le traitement au PMA provoque également le développement de prolongements et une augmentation de la taille des cellules. Les cellules différenciées en macrophages ont un périmètre cellulaire et une aire cellulaire 2 fois et 2,7 fois supérieurs ($p < 0,0001$), respectivement, à ceux observés dans une culture

de cellules THP-1 natives. En effet, les périmètres et aires cellulaires des cellules THP-1 non traitées sont, respectivement, de $40,9 \pm 2,1 \mu\text{m}$ et de $122,7 \pm 13,4 \mu\text{m}^2$ tandis que ceux des THP-1 traitées au PMA sont de $81,3 \pm 4,9 \mu\text{m}$ et $332,3 \pm 31,3 \mu\text{m}^2$ (Figure 40). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différentes durées de traitement évaluées d'un point de vue morphologique et d'adhérence, donc la durée de traitement la plus courte a donc été choisie : 24h.

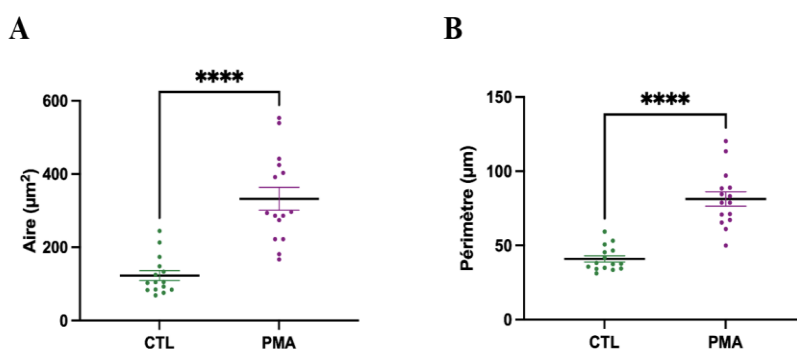


Figure 41 : Représentation graphique (A) de l'aire cellulaire et (B) du périmètre cellulaire mesurés chez les THP-1 non traitées (en vert) et chez les cellules traitées au PMA à 20 nM pendant 24h (en violet). Les mesures ont été effectuées à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. Analyse statistique : Test de Student permettant la comparaison de deux moyennes pour des échantillons non-appariés avec $\alpha = 0,05$ (**** : $p < 0,0001$). $n = 5$ champs différents à raison de 3 cellules analysées par champs.

IV.2.4.b. Mise au point du protocole de polarisation des M_0 en M_1 et M_2

Une fois les macrophages M_0 obtenus à partir des cellules THP-1 traitées pendant 24h avec 20 nM de PMA, l'objectif est de les polariser en macrophages de phénotype M_1 et M_2 . Pour ce faire, les cellules M_0 sont maintenues en milieu standard sans traitement pendant 2h. Cette période a été choisie en raison des observations faites pour deux autres temps de repos testés en amont : 24h et 48h. Ces deux derniers temps de repos induisent une perte d'adhérence et une mortalité cellulaire trop importante pour pouvoir mener des expérimentations futures.

L'objectif final de cette mise au point de protocole est de polariser les macrophages M_0 obtenus en macrophages M_1 ou macrophages M_2 liés, respectivement, à un phénotype pro-inflammatoire ou de réparation tissulaire.

- Différentiation des macrophages M_0 en macrophages M_1

Afin d'activer les macrophages M_0 en M_1 , plusieurs conditions de traitement existent dans la littérature (Jablonski et al., 2015a) et ces dernières ont été testées pour les paramètres suivants : durée du traitement (24h ou 48h) et des concentrations d'IFN- γ (100 ng/mL) et de LPS (10 pg/mL, 100 ng/mL ou 250 ng/mL). Nos critères de jugements se basent également sur l'adhérence des cellules au support ainsi que sur la densité cellulaire de ces dernières. Après 48h de traitement à une concentration égale à 10 pg/mL de LPS, les cellules perdent leur adhérence au support limitant ainsi de manière significative leur densité cellulaire, contrairement aux cellules traitées pendant 24h avec 100 ou 250 ng/mL de LPS. Nous avons estimé que 100 ng/mL est une concentration nécessaire et suffisante pour polariser les macrophages M_0 en macrophages M_1 . Ainsi, le protocole de polarisation des macrophages M_0 en M_1 consiste donc à traiter les cellules M_0 avec une concentration de LPS à 100 ng/mL et d'IFN- γ à 20 ng/mL pendant 24 h.

- Différentiation des macrophages M_0 en macrophages M_2

Afin d'activer les macrophages M_0 en M_2 , les cellules sont traitées avec deux types de cytokines : l'IL-4 et l'IL-13 à une concentration égale à 20 ng/mL. Deux durées de traitement ont été investiguées, 24h et 48h, mais aucune différence morphologique ou d'adhérence n'ont été observées pour ces deux durées de traitement. De ce fait, la polarisation des M_0 en M_2 a été effectuée par la suite en traitant les macrophages M_0 avec 20 ng/mL d'IL-4 et d'IL-13 pendant 24 h.

Le protocole final de différenciation et de polarisation est schématisé dans la Figure 42.

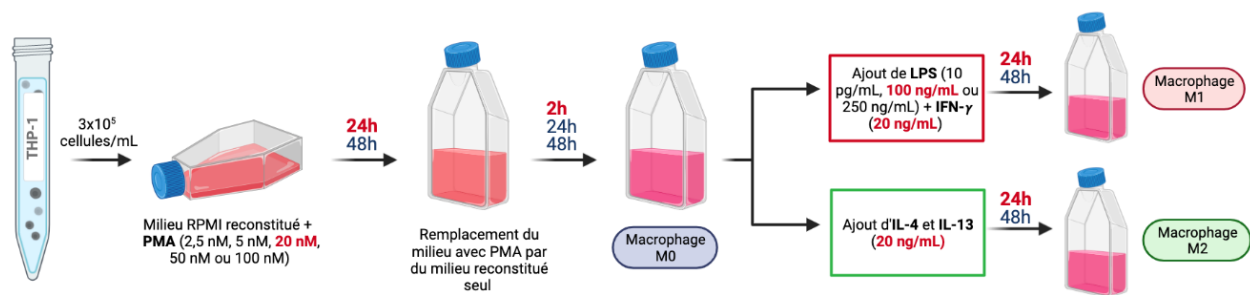


Figure 42: Représentation schématique du protocole permettant l'obtention des sous-types macrophagiques : M_0 , M_1 et M_2 . Les conditions en rouge sont celles retenues pour la caractérisation des cellules obtenues (figure créée sur Biorender.com)

IV.2.4.c. Caractérisation morphologique des sous-types macrophagiques M_0 , M_1 et M_2

Afin de caractériser les sous-populations macrophagiques, nous avons choisi plusieurs indicateurs morphologiques spécifiques aux différentes sous-populations macrophagiques. En effet, après de nombreuses observations microscopiques, nous avons pu mettre en évidence des singularités morphologiques pour chacune des sous-populations cellulaires. C'est pourquoi, nous avons mesuré et comparé les paramètres morphologiques décrits ci-dessous pour les sous-types macrophagiques M_0 , M_1 et M_2 .

- Comparaison des aires et périmètres cellulaires pour chaque sous-type macrophagique

Au même titre que lors de la mise au point du protocole de différenciation des cellules THP-1 en macrophages M_0 , nous avons étudié les aires et périmètres cellulaires des différentes sous-populations afin de les caractériser d'un point de vue morphologique (Figure 43.A et B).

L'aire cellulaire des macrophages M_1 ($406,3 \pm 20,5 \mu\text{m}^2$) est significativement plus élevée que les macrophages M_2 ($318,2 \pm 12,0 \mu\text{m}^2$; $p < 0,0001$) et M_0 ($237,9 \pm 8,3 \mu\text{m}^2$; $p < 0,0001$). Les macrophages M_0 eux, correspondent à la sous-population ayant l'aire cellulaire la moins élevée.

Les résultats liés aux périmètres cellulaires sont cohérents avec ceux obtenus pour l'aire cellulaire. En effet, nous avons mesuré un périmètre cellulaire significativement plus élevé pour les macrophages M_1 ($96,4 \pm 4,4 \mu\text{m}$) par rapport aux deux autres sous-populations macrophagiques : M_0 ($64 \pm 7,8 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$) et M_2 ($76 \pm 2,8 \mu\text{m}$; $p < 0,05$).

- Nombre et longueur des prolongements cytoplasmiques

Les sous-populations macrophagiques semblent se différencier selon d'autres paramètres que l'aire et le périmètre cellulaires. En effet, une des caractéristiques morphologiques des macrophages est leur capacité à former des prolongements, plus ou moins longs et plus ou moins nombreux. Ces derniers ont été mesurés et comparés pour chaque sous-population macrophagique (Figure 43.C et D).

Le nombre de prolongements par champ d'observation microscopique pour les cellules M_0 est de $22,9 \pm 2,2$) et de $(19,4 \pm 1,6)$ pour les cellules M_1 . Le nombre de prolongements est significativement plus élevé pour ces deux sous-types par rapport au sous-type M_2 ($9,9 \pm 1,2$; M_0 vs. M_2 : $p < 0,0001$; M_1 vs. M_2 : $p < 0,001$) (Figure 43.C). Pour ce qui concerne la longueur des prolongements cytoplasmiques, il existe une tendance inverse à leur nombre. En effet, les macrophages M_2 possèdent statistiquement moins de prolongements que les autres phénotypes M_0 et M_1 , mais ils possèdent des prolongements significativement plus longs. Ainsi, la longueur des prolongements des macrophages M_2 atteint $25,1 \pm 2,1 \mu\text{m}$ tandis que celles des macrophages M_0 et M_1 atteignent respectivement $8,1 \pm 0,7 \mu\text{m}$ ($p < 0,0001$) et $15,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$ ($p < 0,0001$) (Figure 43.D).

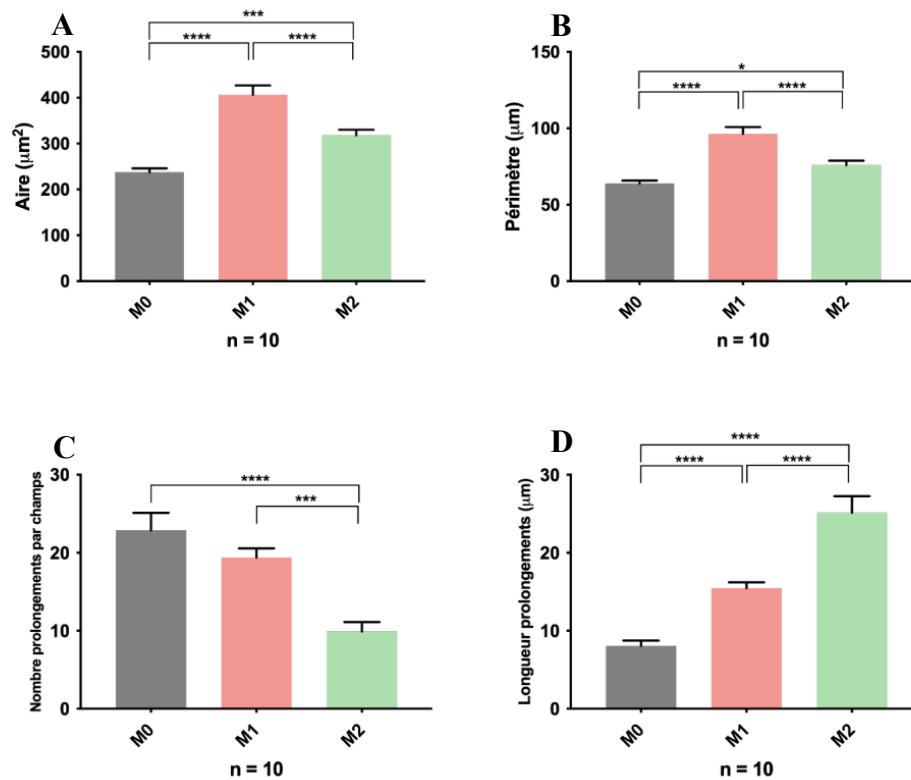


Figure 43 : Analyse morphologique des sous-types macrophagiques. (A) Représentation graphique des aires cellulaires en μm^2 , (B) des périmètres cellulaires en μm , (C) du nombre de prolongements cellulaires observés par champ microscopique et (D) de la longueur de ces prolongements (μm) selon les sous-types macrophagiques obtenus (M₀, M₁ et M₂). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. Analyse statistique : analyse des variances ANOVA à un facteur suivie d'un post-test de comparaison multiple de Tukey, $\alpha = 0,05$. (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,0002$; *** : $p < 0,0001$). $n = 10$ champs et 10 cellules analysées par champ

Les indicateurs morphologiques n'étant pas suffisants pour caractériser les sous-populations macrophagiques, une caractérisation moléculaire des sous-types a été menée pour valider rigoureusement leurs phénotypes respectifs.

IV.2.4.d. Caractérisation moléculaire des sous-types macrophagiques M₀, M₁ et M₂

Afin de caractériser et valider les phénotypes moléculaires des différentes sous-populations macrophagiques, plusieurs marqueurs moléculaires ont été ciblés par qRT-PCR et immunofluorescence.

- Caractérisation moléculaire de la sous-population macrophagique M₁

En se basant sur la littérature, nous avons choisi plusieurs marqueurs spécifiques des macrophages M₁ dont les gènes codant pour IL-12 β , IL-1 β , Arg2, Fpr2 que nous avons analysés par qRT-PCR (Arora et al., 2018a; Jablonski et al., 2015a; Yang and Ming, 2014).

Les résultats ont été normalisés par rapport à l'expression de 3 gènes de référence, puis normalisés par rapport à la sous-population M₀ dont la valeur a été établie arbitrairement à 100 % pour la représentation graphique.

Pour les ARNm relatifs aux gènes Fpr2 et Arg2, nos résultats montrent que leur expression semble ne pas être spécifique à la sous-population M₁ contrairement à ce qui était attendu (Arora et al., 2018a; Jablonski et al., 2015a; Yang and Ming, 2014). En effet, les données relatives à l'Arg2 suggèrent que ce marqueur est plus largement exprimé par les cellules M₂. De plus, une tendance à l'augmentation du marqueur de Fpr2 dans la population M₂ est également mise en évidence par rapport à la sous-population M₁. Ces résultats, non significatifs en raison d'une grande variabilité, ne nous permettent donc pas de conclure à une expression spécifique, des marqueurs Arg2 et Fpr2, par les macrophages M₁ (Figure 44.A et B).

Cependant, pour l'IL-1 β ($p < 0,05$) et l'IL-12 β ($p < 0,001$), l'expression des ARNm correspondants est statistiquement plus élevée dans les sous-types M₁ par rapport aux sous-types M₀ et M₂ confirmant le profil plutôt pro-inflammatoire de cette population (Figure 44.C et D).

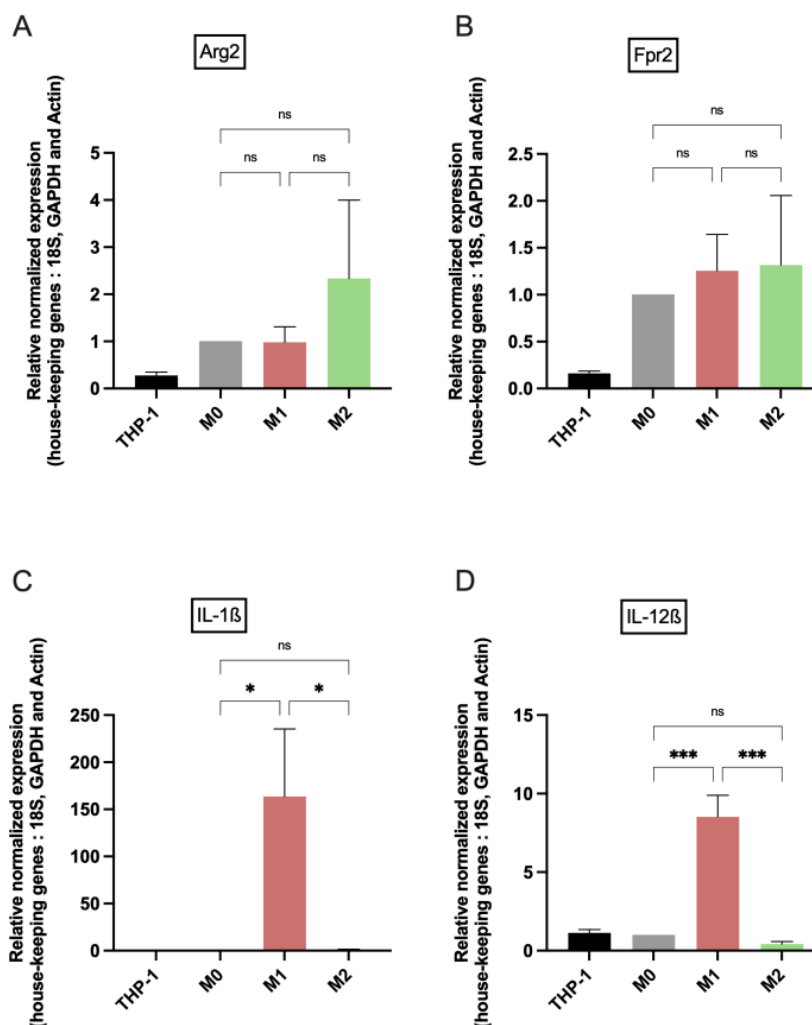


Figure 44 : Caractérisation moléculaire par qRT-PCR du sous-type macrophagique M_1 dont les marqueurs moléculaires reconnus sont (A) Arg2, (B) Fpr2, (C) IL-1 β et (D) IL-12 β . L'expression d'ARNm est normalisée par rapport aux gènes de ménage 18S, GAPDH et Actine dans les THP-1, M_0 , M_1 et M_2 . Le ratio relatif est effectué par rapport à l'expression génique de chacun des marqueurs dans les macrophages M_0 . Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $n = 3$ à 5 expérimentations en triplicata. Analyse statistique : analyse des variances ANOVA à un facteur suivie d'un post-test de comparaison multiple de Tukey, $\alpha = 0,05$. (ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,0002$).

○ Caractérisation moléculaire de la sous-population macrophagique M_2

Pour confirmer le phénotype M_2 de notre sous-type cellulaire traité à l'IL-4 et l'IL-13, nous avons, au même titre que pour les macrophages M_1 , investigué l'expression de plusieurs marqueurs spécifiques de ce phénotype (Arora et al., 2018a; Jablonski et al., 2015a; Yang and Ming, 2014). Pour ce faire, nous avons ciblé les gènes Arg1, Egr2 et c-Myc par qRT-PCR ainsi que la protéine CD206 par immunofluorescence.

Les résultats liés à l'expression des ARNm relatifs aux gènes Egr2 et c-Myc ont montré une tendance à l'augmentation dans les cellules M_2 par rapport aux cellules M_0 et M_1 , mais cette différence n'était

pas statistiquement significative (Figure 45.B et C). Un résultat inattendu a été que l'ARNm relatif au gène c-Myc était majoritairement exprimé par les cellules monocytaires THP-1 natives, mais par rapport au phénotype M₀, il avait tendance à augmenter dans la population M₂. Enfin, pour le marqueur Arg1, l'expression de l'ARNm correspondant semble constante entre les 3 sous-types macrophagiques M₀, M₁ et M₂ (Figure 45.A). Ces résultats exigent de mettre en évidence de manière plus tranchée les différences phénotypiques de la sous-population M₂ par rapport aux M₀ et M₁.

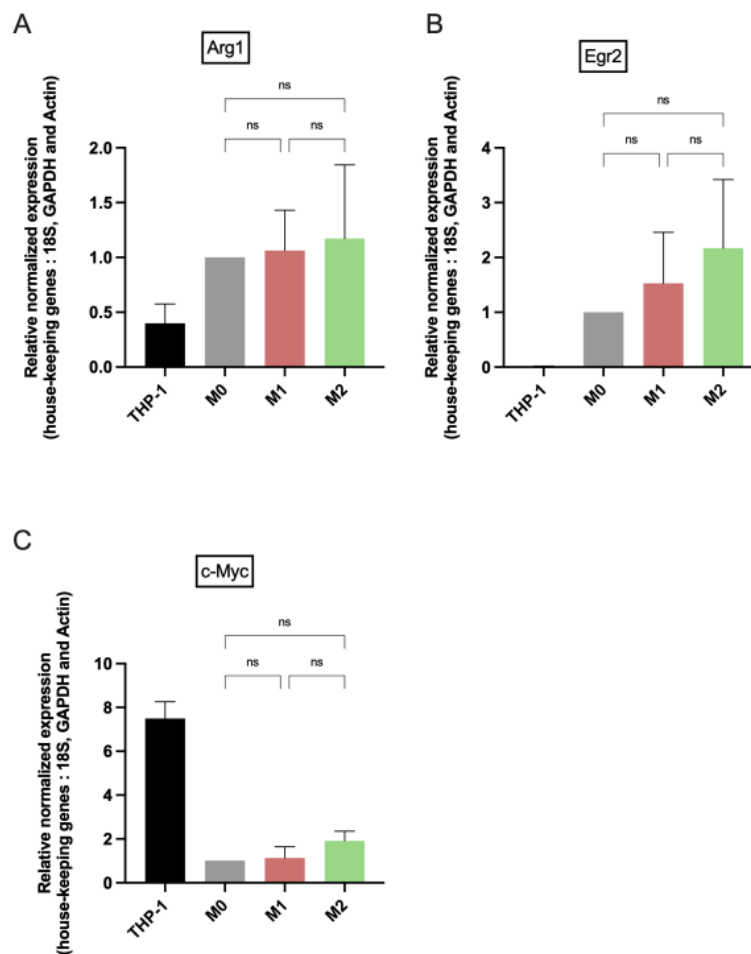


Figure 45 : Caractérisation moléculaire par qRT-PCR du sous-type macrophagique M₂ dont les marqueurs moléculaires sont (A) Arg1, (B) Egr2 et (C) c-Myc. Expression normalisée par rapport aux gènes de ménage 18S, GAPDH et Actine chez les THP-1, M₀, M₁ et M₂. Le ratio relatif est effectué par rapport à l'expression génique de ces marqueurs dans les macrophages M₀. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $n = 3$ à 5 expérimentations de triplicata. Analyse statistique : analyse des variances ANOVA à un facteur suivie d'un post-test de comparaison multiple de Tukey, $\alpha = 0,05$. (ns : non significatif).

Pour compléter nos investigations, nous avons recherché une différence d'expression de la protéine CD206 par immunofluorescence dans les différents sous-types macrophagiques considérés. La

technique d'immunofluorescence a révélé une expression principalement membranaire du marqueur CD206 mais également cytoplasmique pour les cellules M₀ et M₂ (Figure 46A. et C). Au contraire, l'expression du CD206 dans les macrophages M₁ semble très faible et atténuée par rapport aux deux autres sous-types macrophagiques (Figure 46.B). Une comparaison des intensités de fluorescence du marquage CD206 pour les différentes populations macrophagiques a permis de mettre en évidence une expression significativement plus importante de la protéine CD206 dans les cellules M₂ par rapport aux cellules M₁ ($p < 0,0001$) et M₀ ($p < 0,0001$) (Figure 46.D). Comme attendu, le marqueur CD206 semble donc être majoritairement exprimé par notre population macrophagique M₂.

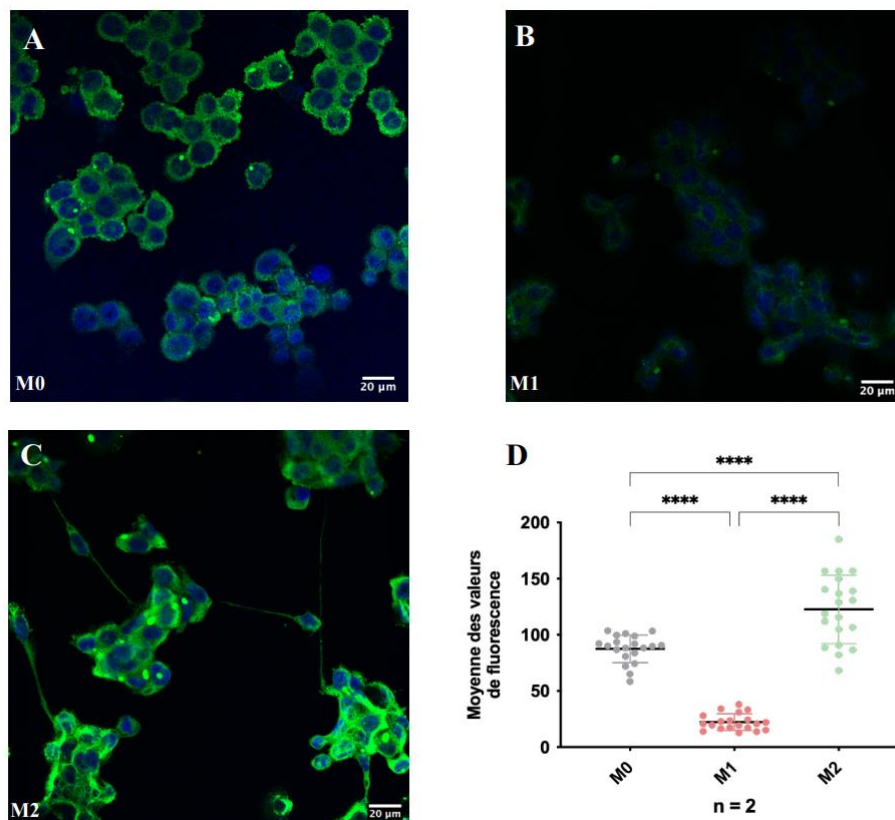


Figure 46 : Localisation de la protéine CD206 dans les différents sous-types macrophagiques (A) M₀, (B) M₁ et (C) M₂. Le marquage par un anticorps anti-CD206 couplé à l'Alexa fluor™ 488 (dilution 1/2000, en vert) et marquage au Hoechst (noyau, bleu). (D) Représentation graphique de la moyenne des valeurs d'intensité de fluorescence obtenues grâce à l'immunomarquage du CD206 sur les différents sous-types macrophagiques. Les images sont acquises au microscope confocal. Les valeurs d'intensité de fluorescence ont été obtenues grâce au logiciel ImageJ. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD. Analyse statistique : analyse des variances ANOVA à un facteur suivie d'un post-test de comparaison multiple de Tukey, $\alpha = 0,05$. (**** : $p < 0,0001$). $n = 2$ champs et 10 cellules analysées par champs. (Barre d'échelle : 20 µm)

IV.3. Mise au point des méthodes analytiques et identification de composés aromatiques dans les e-liquides et aérosols aromatisés aux fruits rouges

IV.3.1. Identification des composés chimiques dans les aérosols et e-liquides aromatisés aux fruits rouges par TD-GC-MS

IV.3.1.a. Identification des composés présents dans l'air ambiant utilisé comme contrôle

Un puff d'air ambiant a été piégé dans une cartouche Tenax[®] afin d'établir un contrôle pour cette expérimentation. Les composés identifiés dans le contrôle « air » font référence, notamment, à des composés contaminants retrouvés dans l'environnement ou pouvant être issus de la dégradation de certaines matrices contenues dans la cartouche Tenax[®] sous l'action de la thermodésorption. En effet, des composés comme le pentaéthylène glycol ou les silanes peuvent apparaître comme des contaminants fréquents en TD-GC-MS, en étant notamment issus de la phase stationnaire (colonne). Ces différents composés chimiques, présents dans l'échantillon contrôle, sont ainsi considérés comme des contaminants de fond liés aux différents systèmes et sont donc soustraits des identifications obtenues pour les prochains échantillons (e-liquide/aérosol). Un contrôle air est fait systématiquement lors d'une série de prélèvements. Les 200 pics les plus importants en termes d'aire sont identifiés sur le chromatogramme et les molécules présentes dans ces pics sont identifiées grâce à une recherche dans la bibliothèque NIST. Ces molécules sont citées dans le Tableau 5 dès lors qu'elles ont un score d'identité supérieur à 700. Ainsi, pour certains pics chromatographiques, plusieurs molécules peuvent être proposées par la bibliothèque avec un score d'identité supérieur à 700.



Figure 47: Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour le contrôle air. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).

Tableau 5 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans un puff d'air (contrôle). Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé

Puff contrôle (Air)					
RT	Nom	N° CAS	R. Match	Intensité relative P. (%)	Formule
1,445	Protoxyde d'azote	10024-97-2	978	71,4	N ₂ O
	Dioxyde de carbone	124-38-9	950	20,6	CO ₂
	Acide carbamique, sel monoammonium	1111-78-0	909	5,1	CH ₆ N ₂ O ₂
2,39	Hexamethylcyclotrisiloxane	541-05-9	863	76,2	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃
3,22	Propanamide, 2-hydroxy-	2043-43-8	838	66,5	C ₃ H ₇ NO ₂
5,64	Propanamide, N-méthyl-2-amino	32012-12-7	799	15,8	C ₄ H ₁₀ NO ₂
5,6	Méthylsilane	992-94-9	833	7,67	CH ₆ Si
	Topotécan	123948-87-8	796	14,6	C ₂₃ H ₂₃ N ₃ O ₅
	2-formylhistamine	ND	742	10,6	C ₆ H ₉ NO ₃
10,88	Acide oxalurique	585-05-7	795	26	C ₃ H ₄ N ₂ O ₄
	Acide malonique	141-82-2	776	20,5	C ₃ H ₄ O ₄
11,83	Benzaldéhyde	100-52-7	800	29,8	C ₇ H ₆ O
12,67	Formamide	75-12-7	915	26,9	CH ₃ NO
25,96	15-crown-5	33100-27-5	749	27,3	C ₁₀ H ₂₀ O ₅
	12-crown-4	294-93-9	744	23	C ₈ H ₁₆ O ₄
	Pentaéthylène glycol	4792-15-8	706	5,038	C ₁₀ H ₂₂ O ₆

Tableau 6 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'e-liquide aromatisé à la mûre. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé

E-liquide mûre					
RT	Nom	N° CAS	R. Match	Intensité relative P. (%)	Formule
1,69	Acétaldéhyde	75-07-0	946	70,6	C ₂ H ₄ O
	Acide formique	64-18-6	859	5,29	C ₃ H ₄ O ₂
3,36	Ethanol	64-17-5	903	85,9	C ₂ H ₆ O
4,79	Ethyl buryrate	105-54-4	835	72,9	C ₆ H ₁₂ O ₂
5,81	Propanoate d'allyle	2408-20-0	838	44,2	C ₆ H ₁₀ O ₂
6,13	Isoamyl acétate	123-92-2	873	52,8	C ₇ H ₁₄ O ₂
7,44	Chlorure de méthanesulfonyle	124-63-0	795	29,5	CH ₃ ClO ₂ S
	3,3,4,4-Tetrafluorohexane	ND	832	21,4	C ₆ H ₁₀ F ₄
8,25	1-pentanol	71-41-0	946	61,2	C ₅ H ₁₂ O
	Formiate d'amyle	638-49-3	890	11,4	C ₆ H ₁₂ O ₂
	Alcool Isoamylique	123-51-3	864	12,3	C ₅ H ₁₂ O
8,4	1-O-Methylglycérol	623-39-2	717	32,3	C ₄ H ₁₀ O ₃
8,5	1-(Methoxymethoxy)hexane	66675-06-7	772	48,2	C ₈ H ₁₈ O ₂
8,89	Anhydride acétique	108-24-7	924	77,3	C ₃ H ₆ O ₂
9,15	4-hexen-1-ol, acétate	42125-17-7	943	37,8	C ₈ H ₁₄ O ₂
9,69	Alcool hexylique	111-27-3	904	46,9	C ₆ H ₁₄ O
10,1	Cis-3-Hexenol	928-96-1	924	29,4	C ₆ H ₁₂ O
10,39	2-hexen-1-ol	928-95-0	885	31,3	C ₆ H ₁₂ O
10,9	Acide acétique	64-19-7	962	86,8	C ₂ H ₄ O ₂
12,05	2-Nitroéthyl propionate	2531-80-8	806	26,7	C ₅ H ₉ NO ₄
13	Propylène glycol	4254-15-3	813	58,2	C ₃ H ₈ O ₂
15,32	Propylène glycol	4254-15-3	878	18,6	C ₃ H ₈ O ₂
16,76	Maltol	118-71-8	771	69	C ₆ H ₆ O ₃
20,15	Glycérine	56-81-5	931	90,9	C ₃ H ₈ O ₃

○ Identification des composés présents dans l'aérosol mûre

Nous avons ensuite identifié les composés présents dans les puffs de l'aérosol aromatisé à la mûre. De la même manière, nous avons identifié plusieurs composés utilisés en aromatique dont l'éthylbutyrate (fruits, ananas), l'hexanoate d'éthyle (fruits), l'acétate de méthyle (agent de saveur, odeur de solvant), alcool hexylique (herbe fraîche), le maltol (arôme sucré, caramélisé), le cis-3-hexenol (herbe fraîche). La glycérine, le propylène glycol et l'éthanol ont également été identifiés après aérosolisation. Cette identification était attendue puisque ce sont des constituants majeurs du e-

liquide et une saturation de la colonne peut être observée pour les pics correspondant au PG et à la VG (Figure 49 et Tableau 7).

Nous avons cependant pu identifier des différences majeures entre les deux formes d'échantillons analysés. En effet, plusieurs produits de dégradation ont été identifiés de manière spécifique pour les échantillons issus de l'aérosolisation. Par exemple, des produits issus de la dégradation des véhicules et arômes ont pu être identifiés. C'est le cas notamment des composés 3-hydroxybutanal, 1,2-propanediol diformate, succindialdéhyde. Ces composés, absents de la forme liquide native du e-liquide, pourraient être à l'origine de certains types de toxicités dès lors que leur concentration est suffisante. Le Tableau 8 regroupe les composés chimiques partagés par les deux types de formes, liquide ou aérosolisée, du e-liquide ainsi que les composés spécifiques à chacune d'entre elles.

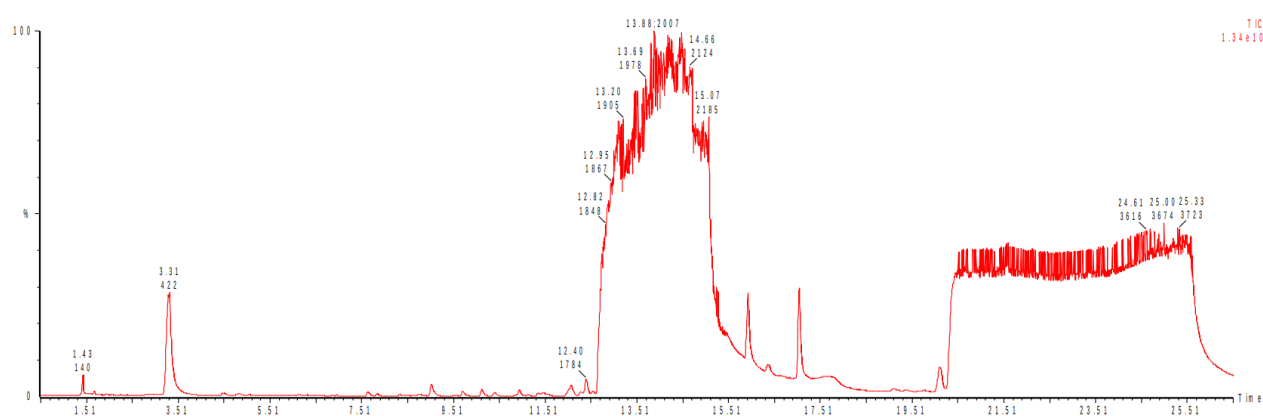


Figure 49: Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'aérosol aromatisé à la mûre. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).

Tableau 7: Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'aérosol aromatisé à la mûre. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé

Puffs mûre (3 puffs)					
RT	Nom	N° CAS	R. Match	Intensité relative P. (%)	Formule
1,43	Dioxyde de carbone	124-38-9	984	58	CO ₂
1,68	Acétaldéhyde	75-07-0	946	68	C ₂ H ₄ O
1,94	Succindialdéhyde	638-37-9	847	10	C ₄ H ₆ O ₂
	Propanamide	79-05-0	717	14,2	C ₄ H ₉ NO
3,29	Ethanol	64-17-5	921	87,2	C ₂ H ₆ O
3,31	Méthylhydrazine	60-34-4	927	73	CH ₆ N ₂
4,47	Trisloxane, 1,1,1,5,5,5-hexaméthyl-3-[(triméthylsilyl)oxy]-	ND	921	57,9	C ₉ H ₂₈ O ₃ Si ₄
	Octaméthylcyclotétrasiloxane	556-67-2	917	37,4	C ₈ H ₂₄ O ₄ Si ₄

4,51	2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolane	4359-46-0	874	63,5	C ₆ H ₁₂ O ₂
4,78	Ethyl butyrate	105-54-4	789	37,7	C ₆ H ₁₂ O ₂
6,13	3-Hydroxybutanal	107-89-1	796	42,3	C ₄ H ₈ O ₂
6,96	3-hydroxymandelic acid, ethyl ester, di-TMS	ND	802	24	C ₁₆ H ₂₈ O ₄ Si ₂
7,63	3,3,4,4-Tétrafluorohexane	ND	792	13,2	C ₆ H ₁₀ F ₄
	Chlorure de méthanesulfonyle	124-63-0	766	23	CH ₃ ClO ₂ S
7,84	Hexanoate d'éthyle	123-66-0	863	74,5	C ₈ H ₁₆ O ₂
8,33	Alcool isoamylique	123-51-3	865	51,7	C ₅ H ₁₂ O
9,02	Anhydride acétique	108-24-7	941	78,3	C ₃ H ₆ O ₂
	Acétate de méthyle	79-20-9	905	15,6	C ₃ H ₆ O ₂
9,71	Alcool hexylique	111-27-3	903	42,9	C ₆ H ₁₄ O
10,13	Cis-3-Hexenol	928-96-1	944	41,1	C ₆ H ₁₂ O
10,4	2-hexen-1-ol, (Z)	928-95-0	20,1	813	C ₆ H ₁₂ O
10,94	Acide acétique	64-19-7	922	82	C ₂ H ₄ O ₂
11,13	Oxiraneméthanol, (R)-	57044-25-4	893	21,6	C ₃ H ₆ O ₂
	Glycidol	556-52-5	862	33,4	C ₃ H ₆ O ₂
	Oxiraneméthanol, (S)-	60456-23-7	852	13	C ₃ H ₆ O ₂
11,47	2-propanol, 1-(2-methoxy-1-methylethoxy)-	20324-32-7	841	57,9	C ₇ H ₁₆ O ₃
12,08	1,3-Dioxolane-2-méthanol, 2,4-diméthyl-	53951-43-2	815	72,1	C ₆ H ₁₂ O ₃
12,4	1,2-Propanediol diformate	53818-14-7	844	60,2	C ₅ H ₈ O ₄
	Propylène glycol	4254-15-3	805	11,7	C ₃ H ₈ O ₂
12,55	Diéthyl malonate	105-53-3	892	86,4	C ₇ H ₁₂ O ₄
12,82 à 15,24	Alcool isopropylique	67-63-0	852	20,2	C ₃ H ₈ O
	Ethyl glycolate	623-50-7	852	20,2	C ₄ H ₈ O ₃
	Propylène glycol	4254-15-3	834	55,4	C ₃ H ₈ O ₂
15,45	Propylène glycol	4254-15-3	949	56	C ₃ H ₈ O ₂
15,92	2-Propanol, 1,1'-oxybis-	110-98-5	899	93,7	C ₆ H ₁₄ O ₃
16,36	2-butanol	78-92-2	875	13,6	C ₄ H ₁₀ O
	Alcool isopropylique	67-63-0	852	16,8	C ₃ H ₈ O
	Propylène glycol	4254-15-3	839	22,6	C ₃ H ₈ O ₂
17,04	Maltol	118-71-8	909	93	C ₆ H ₆ O ₃
17,62	Propylène glycol	4254-15-3	918	40,1	C ₃ H ₈ O ₂
19,1	(2-méthoxyéthyl)hydrazine	3044-15-3	845	27,7	C ₃ H ₁₀ N ₂ O
	Propylène glycol	4254-15-3	835	27,7	C ₃ H ₈ O ₂
19,77	Propylène glycol	4254-15-3	878	18,5	C ₃ H ₈ O ₂
	Propylène glycol	4254-15-3	863	17,1	C ₃ H ₈ O ₂
20,11	Glycérine	56-81-5	896	80,9	C ₃ H ₈ O ₃
	1,4-Dioxane-2,6-diméthanol	54120-69-3	737	38,2	C ₆ H ₁₂ O ₄

- Comparaison de la composition chimique de la forme liquide et de la forme aérosolisée du e-liquide mûre

Parmi tous les composés retrouvés dans l'analyse chromatographique de l'e-liquide mûre, on peut constater qu'un certain nombre de ces molécules ne sont que peu volatiles ou en quantité insuffisante

pour être identifiées. Par ailleurs, dans l'aérosol un nombre considérable de composés apparaît du fait du chauffage de l'e-liquide et de la plus grande volatilité de ces molécules néoformées. Toutes ou quelques-unes de ces molécules pourraient être à l'origine des réponses cellulaires différentes entre l'exposition à l'e-liquide et à l'aérosol du même e-liquide. En effet, la méthyldiazine, le glycidol ainsi que la (2-méthoxyéthyl)hydrazine identifiés dans la forme aérosolisée sont classés comme composés toxiques, carcinogènes ou potentiels carcinogènes et pourraient expliquer les différences de réponses cellulaires observées (National Center for Biotechnology Information, 2025d, 2025e, 2025f).

Tableau 8 : Analyse comparative des profils chimiques - identification des composés communs et spécifiques entre la forme liquide et aérosolisée de l'e-liquide aromatisé à la mûre

Composés communs aux deux types d'échantillon (e-liquide/puffs)	Composés spécifiques à l'e-liquide mûre	Composés spécifiques aux puffs mûre	
Ethylbutyrate Cis-3-Hexenol Acide acétique Acétaldéhyde Alcool hexylique Anhydride acétique Chlorure de méthanesulfonyle Ethanol Glycérine Maltol Propylène glycol 2-hexen-1-ol Alcool Isoamylique	1-(Methoxymethoxy)hexane 1-O-Methylglycérol 1-pentanol 2-Nitroéthyl propionate 3,3,4,4-Tetrafluorohexane 4-hexen-1-ol, acétate Acide formique Formiate d'amyle Isoamyl acétate Propanoate d'allyle	(2-méthoxyéthyl)hydrazine 1,2-Propanediol diformate 1,3-Dioxolane-2-méthanol, 2,4-diméthyl- 1,4-Dioxane-2,6-diméthanol 2-Ethyl-4-méthyl-1,3-dioxolane 2-Propanol, 1,1'-oxybis- 2-butanol 2-propanol, 1-(2-méthoxy-1-méthylethoxy)- 3,3,4,4-Tétrafluorohexane 3-Hydroxybutanal 3-hydroxymandelic acid, ethyl ester, di-TMS Acétate de méthyle	Alcool isopropylique Diglycérol Dioxyde de carbone Diéthyl malonate Ethyl glycolate Glycidol Hexanoate d'éthyle Méthylhydrazine Octaméthylcyclotétrasiloxane Oxiraneméthanol, (R)- Oxiraneméthanol, (S)- Propanamide Succindialdéhyde Trisloxane, 1,1,1,5,5,5-hexaméthyl-3-[[triméthylsilyl]oxy]-

IV.3.1.c. Identification des composés présents dans un e-liquide et aérosol aromatisé à la framboise

- Identification des composés présents dans un e-liquide framboise

L'analyse chromatographique d'un e-liquide framboise, nous a permis d'identifier plusieurs composés chimiques utilisés comme arôme. En effet, nous avons mis en évidence la présence d'acétate d'hexyle (fruits, pommes/poires), d'acétate d'éthyle (fruité), de 4-hexen-1-ol acétate (arôme végétal), d'alcool hexylique (herbe fraîche), d'isoamylacétate (fruits, poire, ananas), de cis-3-hexenol

Tableau 9 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'e-liquide aromatisé à la framboise. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé

159

○ Identification des composés présents dans l'aérosol d'un e-liquide framboise

Afin de comparer les deux formes d'e-liquide (liquide/aérosolisée), nous avons reproduit la même expérimentation avec des puffs piégés dans un tube Tenax[®]. Contrairement à ce qui était attendu, une partie des arômes identifiés dans la forme liquide n'a pas été retrouvée sous forme aérosolisée. En effet, seulement quelques composés utilisés comme arômes ont été identifiés : l'acétate d'éthyle (fruité) et le maltol (arôme sucré, caramélisé). Le reste des composés identifiés correspondent essentiellement à des produits de dégradation comme le 1-O-Methylglycérol, le succinaldéhyde ou des solvants comme l'alcool isopropylique ou le 2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolane (Figure 51 et Tableau 10). Ces composés, hormis l'alcool isopropylique, sont présents uniquement dans la forme aérosolisée (Tableau 11).

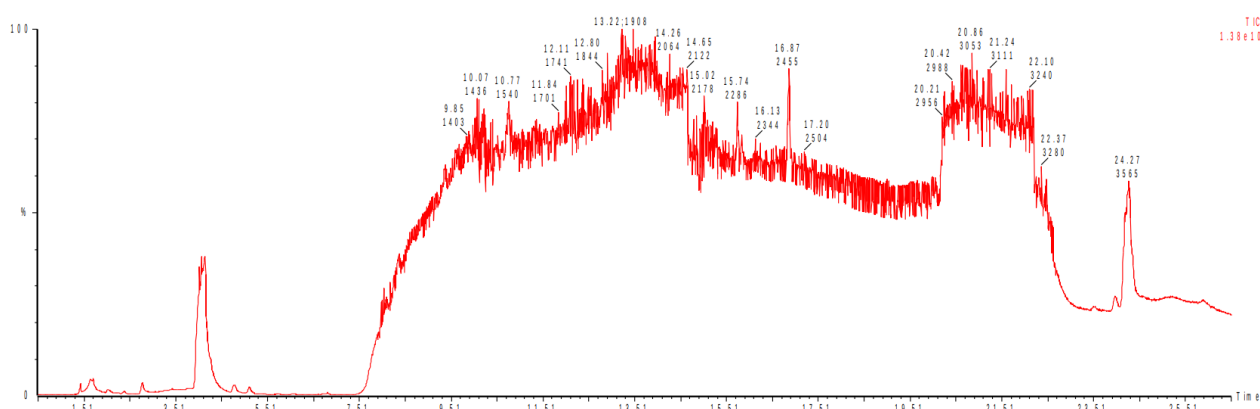


Figure 51: Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'aérosol aromatisé à la framboise. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).

Tableau 10 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'aérosol aromatisé à la framboise. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé

Puffs framboise (3 puffs)					
RT	Nom	N° CAS	R. Match	Intensité relative P. (%)	Formule
1,7	Acétaldéhyde	75-07-0	903	31,9	C ₂ H ₄ O
2,02	Succinaldéhyde	638-37-9	886	31,9	C ₄ H ₆ O ₂
2,77	Ethylacétate	141-78-6	904	73,3	C ₄ H ₈ O ₂
4,02	Ethanol	64-17-5	950	93,1	C ₂ H ₆ O
5,11	2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolane	4359-46-0	907	88	C ₆ H ₁₂ O ₂
6,05	Acide pivalique	75-98-9	755	8,17	C ₅ H ₁₀ O ₂
10,07	Alcool isopropylique	67-63-0	762	11,5	C ₃ H ₈ O
	Propylène glycol	4254-15-3	761	35,5	C ₃ H ₈ O ₂
	Ethylglycolate	623-50-7	751	18,3	C ₄ H ₈ O ₃

13,28	1,2-dideoxy-l-erythro-pentitol	ND	803	53	C ₅ H ₁₂ O ₃
14,28	(3,3-Diméthyloxiranyl)méthanol	ND	780	18,4	C ₅ H ₁₀ O ₂
	Alcool isopropylique	67-63-0	772	14,3	C ₃ H ₈ O
	Propylène glycol	4254-15-3	730	20	C ₃ H ₈ O ₂
15,02	Propylène glycol	4254-15-3	841	56,8	C ₃ H ₈ O ₂
	Alcool isopropylique	67-63-0	830	12,5	C ₃ H ₈ O
	Ethylglycolate	623-50-7	797	9,09	C ₄ H ₈ O ₃
	Propylène glycol	4254-15-3	781	6,78	C ₃ H ₈ O ₂
	1,2-dideoxy-l-erythro-pentitol	ND	774	22,4	C ₅ H ₁₂ O ₃
16,87	Maltol	118-71-8	771	75,5	C ₆ H ₆ O ₃
9,85 à 15,02	Alcool isopropylique	67-63-0	779	8,9	C ₃ H ₈ O
	Ethyl glycolate	623-50-7	776	37,1	C ₄ H ₈ O ₃
	Propylène glycol	4254-15-3	762	29,2	C ₃ H ₈ O ₂
15,02 à 20	1-O-Methylglycérol	623-39-2	764	33,4	C ₄ H ₁₀ O ₃
	Propylène glycol	4254-15-3	761	26,9	C ₃ H ₈ O ₂
20 à 22,6	Glycérine	56-81-5	874	73,3	C ₃ H ₈ O ₃
23,9	Glycérine	56-81-5	926	87,8	C ₃ H ₈ O ₃
24,2	Lidocaïne	137-58-6	850	73,9	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O

- Comparaison de la composition chimique de la forme liquide et de la forme aérosolisée du e-liquide framboise

Parmi tous les composés retrouvés dans l'analyse chromatographique du e-liquide framboise, on peut au même titre que pour la mûre, constater qu'un certain nombre de ces molécules ne sont que peu volatiles ou en quantité insuffisante pour être identifiées. Par ailleurs, dans l'aérosol beaucoup moins de composés apparaissent du fait du chauffage de l'e-liquide et de la plus grande volatilité de ces molécules néoformées. Ceci pourrait expliquer les réponses cellulaires moins délétères du e-liquide framboise comparé au e-liquide mûre.

Tableau 11 : Analyse comparative des profils chimiques - identification des composés communs et spécifiques entre la forme liquide et aérosolisée de l'e-liquide aromatisé à la framboise

Composés communs aux deux types d'échantillon (e-liquide/puffs)	Composés spécifiques à l'e-liquide framboise	Composés spécifiques aux puffs framboise
Acétaldéhyde Alcool isopropylique Ethanol Ethyl acétate Glycérine Propylène glycol	2-propanol, 1-(2-methoxy-1-methylethoxy)- 2-propanol, 1-(2-prepenyloxy)- 3,3,4,4-Tétrafluorohexane Cis-3-Hexenol 4-hexen-1-ol, acétate Acétate d'hexyle Alcool hexylique Alcool isopropylique Anhydride acétique Isoamyl acétate Linalol Propanal	(3,3-Diméthylloxiranyl)méthanol 1,2-dideoxy-l-erythro-pentitol 1-O-Methylglycérol 2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolane Acide pivalique Ethyl glycolate Lidocaïne Maltol Succinaldéhyde

IV.3.1.d. Identification des composés présents dans un e-liquide et aérosol aromatisé à la fraise

- Identification des composés présents dans un e-liquide fraise

Pour l'e-liquide fraise, nous avons mis en évidence la présence dans le mélange de différents agents aromatisants comme l'alcool hexylique (herbe fraîche), l'isoamylacétate (fruits, poire, ananas), le cis-3-hexenol (herbe fraîche), le pentanal (fruité), le linalol (note florale), d'éthylbutyrate (fruits, ananas), d'acétate d'hexyle (fruits, pommes/poires). La présence de véhicule composé de propylène glycol et glycérine végétale a également été confirmée. Des solvants ou réactifs de synthèse ont également été identifiés comme l'anhydride acétique, l'alcool isopropylique ou encore le succindialdéhyde (Figure 52 et Tableau 12).

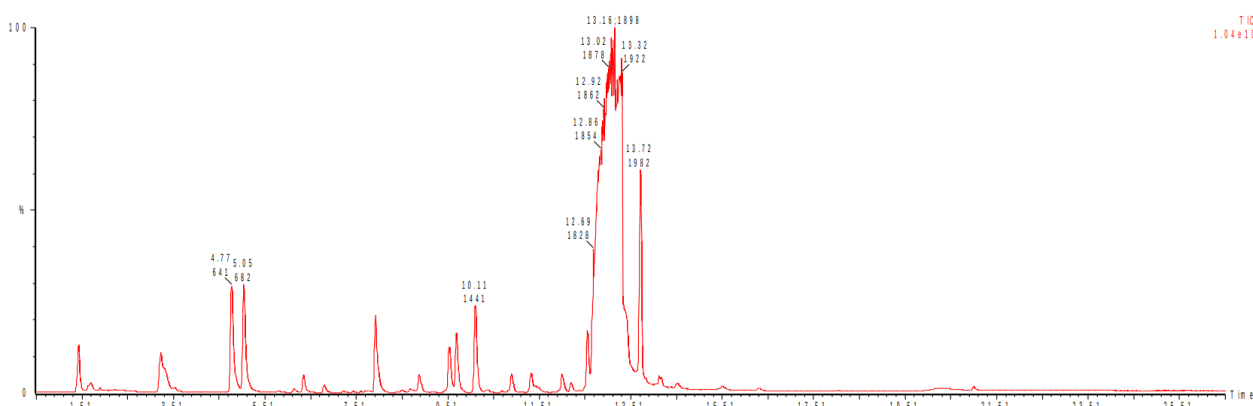


Tableau 12 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'e-liquide aromatisé à la fraise. Les composés sont classés par temps de rétention croissant

E-liquide fraise					
RT	Nom	N° CAS	R. Match	Intensité relative P. (%)	Formule
1,69	Acétaldéhyde	75-07-0	939	64,8	C ₂ H ₄ O
1,9	Succindialdéhyde	638-37-9	816	11,5	C ₄ H ₆ O
	Pentanal	110-62-3	795	42	C ₅ H ₁₀ O
3,23	Ethanol	64-17-5	930	78,4	C ₂ H ₆ O
4,77	Ethyl butyrate	105-54-4	939	93,7	C ₆ H ₁₂ O ₂
5,05	Isoamylacétate	123-92-2	955	97,4	C ₇ H ₁₄ O ₂
6,35	Isoamylacétate	123-92-2	990	90	C ₇ H ₁₄ O ₂
7,22	Limonène	138-86-3	923	29,6	C ₁₀ H ₁₆
7,93	Hexanoate d'éthyle	123-66-0	928	80,2	C ₈ H ₁₆ O ₂
8,51	Acétate d'hexyle	142-92-7	928	62,8	C ₈ H ₁₆ O ₂
8,88	Isoamyl isovalérate	659-70-1	799	16,7	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
12	Acide propanoïque	79-09-4	904	80,5	C ₃ H ₆ O ₂
9,54	Lactate d'éthyle	97-64-3	919	34,7	C ₅ H ₁₀ O ₃
9,69	Alcool hexylique	111-27-3	946	62,2	C ₆ H ₁₄ O
10,11	Cis-3-Hexenol	928-96-1	949	35,6	C ₆ H ₁₂ O
10,89	Acide acétique	64-19-7	966	91,9	C ₂ H ₄ O ₂
12	Acide propanoïque	79-09-4	904	88,1	C ₃ H ₆ O ₂
12,2	Linalol	78-70-6	865	55,8	C ₁₀ H ₁₈ O
12,93	Propylène glycol	4254-15-3	789	55,6	C ₃ H ₈ O ₂
13,22	Alcool isopropylique	67-63-0	782	14,9	C ₃ H ₈ O
13,72	Acide 2-méthylbutyrique	116-53-0	916	92,5	C ₅ H ₁₀ O ₂
20,3	Glycérine	56-81-5	861	62,8	C ₃ H ₈ O ₃
21	Acide benzoïque	65-85-0	707	14,1	C ₇ H ₆ O ₂

- Identification des composés présents dans l'aérosol d'un e-liquide fraise

Concernant l'e-liquide fraise sous sa forme aérosolisée, nous avons identifié les agents aromatisants suivants : l'éthylbutyrate (fruits, ananas), l'isoamyle acétate (fruits, poire, ananas), le propanoate d'allyle (fruits), l'hexanoate d'allyle (ananas, pêche, abricot), le limonène (agrumes), l'alcool hexylique (herbe fraîche), le cis-3-hexenol (herbe fraîche), le linalol (note florale) et la γ -décàlactone (pêche).

La glycérine végétale et le propylène glycol ont également été identifiés. Des solvants comme l'éthanol et l'alcool isopropylique ont été retrouvés dans l'aérosol. La présence de certains produits contaminants, potentiellement inhérents à la technique de chromatographie, a été mise en évidence

dont l'octaméthylcyclotérasiloxane, le 1,2-dideoxy-1-erythro-pentitol, le tétrafluorure de silicium (Figure 53 et Tableau 13).

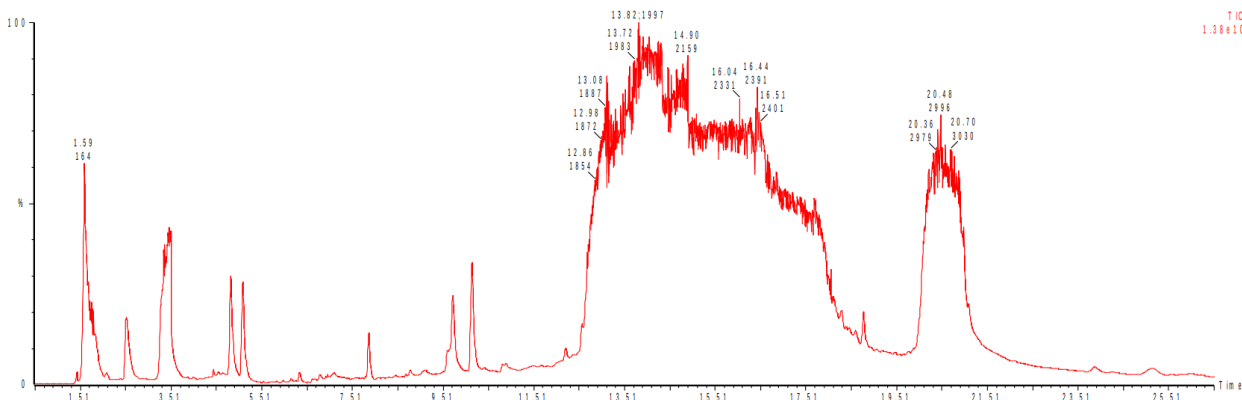


Figure 53 : Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'aérosol aromatisé à la fraise. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).

Tableau 13 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'aérosol aromatisé à la fraise. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé

Puffs fraise (3 puffs)					
RT	Nom	N° CAS	R. Match	Intensité relative P. (%)	Formule
1,6	Sodium heptafluorobutyrate	2218-54-4	887	94,3	C ₄ F ₇ NaO ₂
2,51	Dioxyde de soufre	7446-09-5	928	89,2	SO ₂
3,45	Ethanol	64-17-5	944	94,8	C ₂ H ₆ O
4,44	Octaméthylcyclotétrasiloxane	556-67-2	897	75,7	C ₈ H ₂₄ O ₄ Si ₄
4,82	Ethyl butyrate	105-54-4	912	84,2	C ₆ H ₁₂ O ₂
5,09	Isoamyl acétate	123-92-2	963	96	C ₇ H ₁₄ O ₂
6,34	Isoamyl acétate	123-92-2	869	76,8	C ₇ H ₁₄ O ₂
6,79	Propanoate d'allyle	2408-20-0	837	36,2	C ₆ H ₁₀ O ₂
7,1	Tétrafluorure de silicium	7783-61-1	936	30,2	F ₄ Si
7,87	Hexanoate d'éthyle	123-66-0	903	79,3	C ₈ H ₁₆ O ₂
9,72	Alcool hexylique	111-27-3	821	24,2	C ₆ H ₁₄ O
10,14	Cis-3-Hexenol	928-96-1	937	42,8	C ₆ H ₁₂ O
12,2	Linalol	78-70-6	704	9,53	C ₁₀ H ₁₈ O
13,05	Propylène glycol	4254-15-3	805	54,8	C ₃ H ₈ O ₂
	Alcool isopropylique	67-63-0	789	9,49	C ₃ H ₈ O
13,87	1,2-dideoxy-l-erythro-pentitol	ND	797	22,6	C ₅ H ₁₂ O ₃
	Ethylglycolate	623-50-7	751	20,8	C ₄ H ₈ O ₃
14,92	Alcool isopropylique	67-63-0	767	8,47	C ₃ H ₈ O
	Propylène glycol	4254-15-3	755	26,9	C ₃ H ₈ O ₂
	Ethyl glycolate	623-50-7	741	15,5	C ₄ H ₈ O ₃
16,49	1,2-dideoxy-l-erythro-pentitol	ND	757	11,6	C ₅ H ₁₂ O ₃
	Propylène glycol	4254-15-3	716	16	C ₃ H ₈ O ₂
	Ethylglycolate	623-50-7	705	9,35	C ₄ H ₈ O ₃

17,79	Propylène glycol	4254-15-3	879	71,3	C ₃ H ₈ O ₂
12,86 à 17,8	Alcool isopropylique	67-63-0	773	7,06	C ₃ H ₈ O
	Propylène glycol	4254-15-3	772	34,2	C ₃ H ₈ O ₂
	Ethylglycolate	623-50-7	750	14,6	C ₄ H ₈ O ₃
12,86 à 14,9	1,2-dideoxy-l-erythro-pentitol	ND	771	8,13	C ₅ H ₁₂ O ₃
	Alcool isopropylique	67-63-0	765	7,81	C ₃ H ₈ O
	Propylène glycol	4254-15-3	752	26,7	C ₃ H ₈ O ₂
18,28	Propylène glycol	4254-15-3	851	22,3	C ₃ H ₈ O ₂
	Propylène glycol	4254-15-3	829	18,9	C ₃ H ₈ O ₂
18,78	Glycérine	56-81-5	828	60,3	C ₃ H ₈ O ₃
	γ-décalactone	706-14-9	790	48,8	C ₁₀ H ₁₈ O ₂
26,6	2-propanol, 1-(1-methylethoxy)-	3944-36-3	736	12,2	C ₆ H ₁₄ O ₂

- Comparaison de la composition chimique de la forme liquide et de la forme aérosolisée du e-liquide fraise

En comparant la caractérisation chimique du e-liquide et de l'aérosol, nous pouvons identifier des composants chimiques communs aux deux formes de l'e-liquide comme le linalol, l'éthylbutyrate ou l'alcool hexylique. Au contraire, nous avons pu associer des composants de manière spécifique à la forme liquide ou aérosolisée : différents acides et agents aromatisants pour la forme liquide et des composés de dégradation et contaminants pour la forme aérosolisée (Tableau 14).

Parmi tous les composés retrouvés dans l'analyse chromatographique du e-liquide fraise, on peut constater qu'un certain nombre de ces molécules ne sont que peu volatiles ou en quantité insuffisante pour être identifiées. Le nombre de molécules néoformées est très proche de ce qui a été retrouvé pour le e-liquide framboise. Ceci pourrait expliquer les réponses cellulaires moins délétères du e-liquide fraise en comparaison à l'e-liquide mûre.

Tableau 14 : Analyse comparative des profils chimiques - identification des composés communs et spécifiques entre la forme liquide et aérosolisée de l'e-liquide aromatisé à la fraise

Composés communs aux deux types d'échantillon (e-liquide/puffs)	Composés spécifiques à l'e-liquide fraise	Composés spécifiques aux puffs fraise
Cis-3-Hexenol Alcool hexylique Alcool isopropylique Ethanol Ethylbutyrate Glycérine Hexanoate d'éthyle Isoamylacétate Linalol Propylène glycol	Acide 2-méthylbutyrique Acide acétique Acide benzoïque Acide propanoïque Acétaldéhyde Acétate d'hexyle Isoamylisovalérate Lactate d'éthyle Limonène Pentanal Succindialdéhyde	1,2-dideoxy-l-erythro-pentitol 2-propanol, 1-(1-methylethoxy)- Dioxyde de soufre Ethylglycolate Octaméthylcyclotétrasiloxane Propanoate d'allyle Sodium heptafluorobutyrate Tétrafluorure de silicium γ-décalactone

IV.3.1.e. Identification des composés présents dans un e-liquide et aérosol aromatisé à la myrtille

○ Identification des composés présents dans un e-liquide myrtille

Pour finir, nous avons étudié la composition chimique de l'e-liquide myrtille sous ses deux formes. Pour la forme liquide, nous avons identifié un certain nombre d'agents aromatisants. En effet, nous avons mis en évidence la présence d'une quinzaine de composés chimiques aromatisants : l'acétate d'éthyle (fruité), le méthylbutyrate (pomme), l'éthylbutyrate (fruits, ananas), l'isoamylacétate (fruits, poires, ananas), le pentylformate (fruits), le cis-3-hexenol (herbe fraîche), l'hexanoate d'éthyle (fruits), l'isoamylisobutyrate (abricot, ananas), l'hydroxyacétone (sucré, caramélisé), l' α -ionone (note florale, violette), le trans- β -damascone (note florale et fruitée). Le propylène glycol et la glycérine végétale ont, comme attendu, bien été identifiés. Quelques produits issus de la synthèse des arômes et des solvants ont été, également, mis en évidence comme : l'anhydride acétique et l'alcool isopropylique (Figure 54 et Tableau 15).

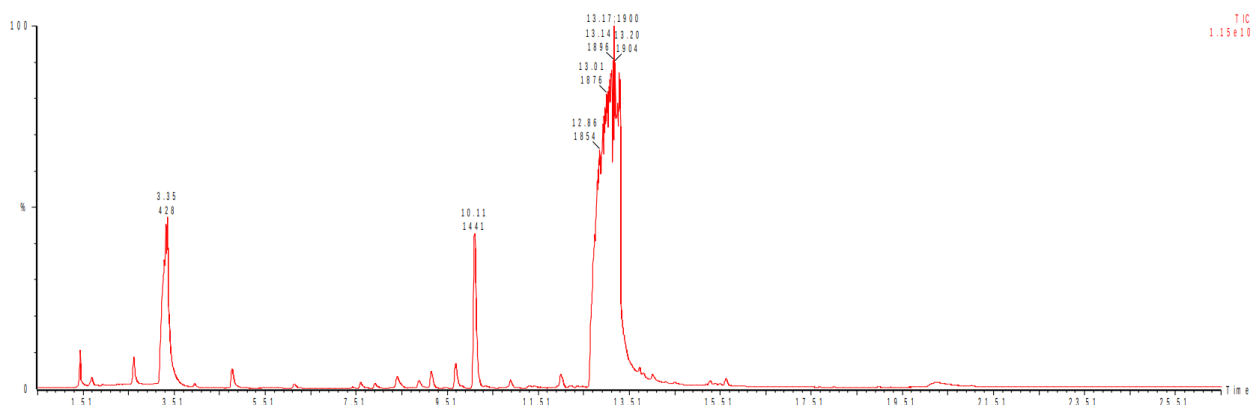


Figure 54 : Chromatogramme en mode total ionique (TIC) par TD-GC-MS pour l'e-liquide aromatisé à la myrtille. L'analyse est réalisée dans un mode de screening non-ciblé (full scan).

Tableau 15 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'e-liquide aromatisé à la myrtille. Les composés sont classés par temps de rétention croissant

E-liquide myrtille					
RT	Nom	N° CAS	R. Match	Intensité relative P. (%)	Formule
1,69	Acétaldéhyde	75-07-0	898	37,3	C ₂ H ₄ O
2,62	Ethylacétate	141-78-6	910	93,3	C ₄ H ₈ O ₂
3,33	Ethanol	64-17-5	943	93,1	C ₂ H ₆ O
3,95	Méthylbutyrate	623-42-7	868	79,3	C ₅ H ₁₀ O ₂
4,78	Ethylbutyrate	105-54-4	939	90,6	C ₆ H ₁₂ O ₂
5,81	Acide α-céto-butyrique	600-18-0	776	9,33	C ₄ H ₆ O ₃
6,15	Isoamylacétate	123-92-2	927	76,9	C ₇ H ₁₄ O ₂
7,6	Alcool isoamylique	123-51-3	922	68,3	C ₅ H ₁₂ O
	1-pentanol	71-41-0	894	19,4	C ₅ H ₁₂ O
	Pentylformate	638-49-3	875	4,08	C ₆ H ₁₂ O ₂
7,92	Hexanoate d'éthyle	123-66-0	908	79,8	C ₈ H ₁₆ O ₂
8,41	Isoamylisobutyrate	2050-01-3	945	61	C ₉ H ₁₈ O ₂
8,41	Anhydride acétique	108-24-7	917	14,5	C ₄ H ₆ O ₃
	Méthylglyoxal	78-98-8	894	11,4	C ₃ H ₄ O ₂
	Hydroxyacétone	116-09-6	845	51,2	C ₃ H ₆ O ₂
9,15	Acétate de (Z)-3-hexényle	3681-71-8	938	32	C ₈ H ₁₄ O ₂
9,69	Alcool hexylique	111-27-3	946	57,9	C ₆ H ₁₄ O
10,11	Cis-3-Hexenol	928-96-1	954	40,9	C ₆ H ₁₂ O
10,89	Acide acétique	64-19-7	957	90	C ₂ H ₄ O ₂
11,31	2-propanol, 1-(2-methoxy-1-methylethoxy)- :	20324-32-7	811	46,8	C ₇ H ₁₆ O ₃
12	Acide propanoïque	79-09-4	906	87,2	C ₃ H ₆ O ₂
12,37	Propylène glycol	4254-15-3	809	10,9	C ₃ H ₈ O ₂
12,48	2-propanol, 1-(1-methylethoxy)-	3944-36-3	763	28,9	C ₆ H ₁₄ O ₂
13,23	Alcool isopropylique	67-63-0	778	6,8	C ₃ H ₈ O
	Propylène glycol	4254-15-3	777	45,7	C ₃ H ₈ O ₂
	Ethylglycolate	623-50-7	767	25	C ₄ H ₈ O ₃
14,02	Propylène glycol	4254-15-3	903	4,48	C ₃ H ₈ O ₂
15,28	Propylène glycol	4254-15-3	841	9,02	C ₃ H ₈ O ₂
	trans-β-Damascone	23726-93-4	809	41,6	C ₁₃ H ₂₀ O
15,63	α-ionone	127-41-3	851	69	C ₁₃ H ₂₀ O

15,96	Propylène glycol	4254-15-3	852	26,9	C ₃ H ₈ O ₂
20,26	Glycérine	56-81-5	885	83,4	C ₃ H ₈ O ₃

- Identification des composés présents dans l'aérosol d'un e-liquide Myrtille

Enfin, nous avons analysé le profil chimique de l'aérosol aromatisé à la myrtille. Un certain nombre d'agents aromatisants identifiés dans la forme liquide l'ont également été dans la forme aérosolisée. En effet, les composés aromatisants suivants ont été retrouvés dans les deux formes : le méthylbutyrate (pomme), l'éthylbutyrate (fruits, ananas), l'isoamylacétate (fruits, poires, ananas), le cis-3-hexenol (herbe fraîche), l'hexanoate d'éthyle (fruits), l'isoamylisobutyrate (abricot, ananas) (Tableau 17). Les véhicules PG et VG ont bien été identifiés dans l'aérosol. Des dérivés du PG ont été identifiés dans la forme aérosolisée comme le 2-propanol, 1-(1-méthylethoxy) et l'éthylglycolate. Un certain nombre de composants contaminants et issus de la dégradation d'autres produits et solvants ont été identifiés comme le 1-O-méthylglycérol, le glycéraldéhyde, l'octaméthylcyclotétrasiloxane, le succinaldéhyde, le 3,3,4,4-Tétrafluorohexane ou encore l'hexaéthylène glycol (Figure 55 et Tableau 16).

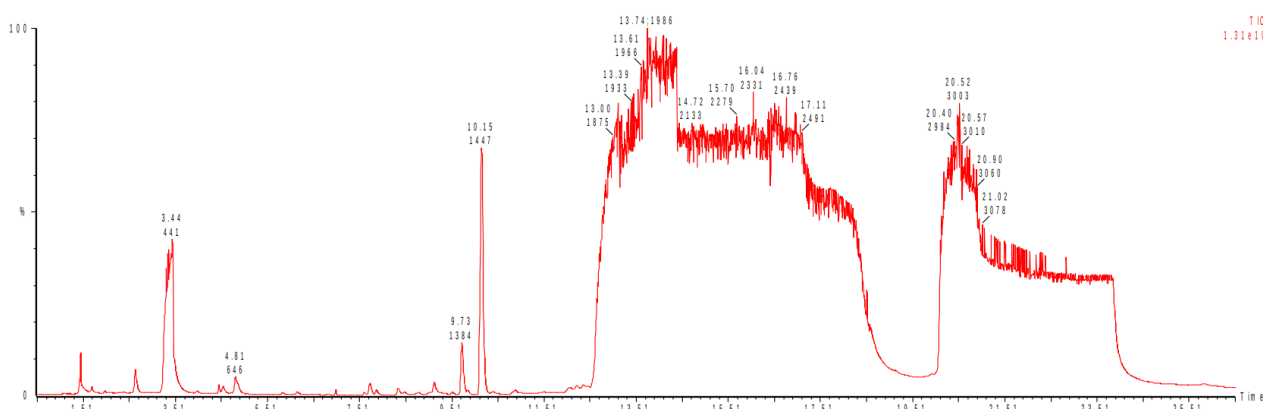


Tableau 16 : Liste des composés chimiques identifiés par TD-GC-MS contenus dans l'aérosol aromatisé à la myrtille. Les composés sont classés par temps de rétention croissant. ND = non déterminé

Puffs myrtille (3 puffs)					
RT	Nom	N° CAS	R. Match	Intensité relative P. (%)	Formule
1,69	Acétaldéhyde	75-07-0	947	54,9	C ₂ H ₄ O
1,97	Succinaldéhyde	638-37-9	925	34,2	C ₄ H ₆ O ₂
2,63	Acétate d'éthyle	141-78-6	906	88,3	C ₄ H ₈ O ₂
3,31 à 3,44	Éthanol	64-17-5	937	89,1	C ₂ H ₆ O
3,99	Méthylbutyrate	623-42-7	845	69,3	C ₅ H ₁₀ O ₂
4,45	Octaméthylcyclotérasiloxane	556-67-2	957	59,2	C ₈ H ₂₄ O ₄ Si ₄
4,54	2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolane	4359-46-0	855	86,5	C ₆ H ₁₂ O ₂
4,81	Ethylbutyrate	105-54-4	930	88,7	C ₆ H ₁₂ O ₂
5,82	Propanoate d'allyle	2408-20-0	818	18,2	C ₆ H ₁₀ O ₂
6,15	Isoamylacétate	123-92-2	850	47,4	C ₇ H ₁₄ O ₂
	Acetic acid, pentyl ester	628-63-7	836	33,4	C ₇ H ₁₄ O ₂
6,98	3-[(trimethylsilyl)oxy]-2-{4-[(trimethylsilyl)oxy]phenyl}ethanamine	ND	752	17,7	C ₁₄ H ₂₇ NO ₂ Si ₂
7,6	3,3,4,4-Tetrafluorohexane	ND	832	16,9	C ₆ H ₁₀ F ₄
	Chlorure de méthanesulfonyle	124-63-0	769	16,2	CH ₃ ClO ₂ S
7,73	Alcool isoamylique	123-51-3	920	53,3	C ₅ H ₁₂ O
	1-pentanol	71-41-0	905	25,9	C ₅ H ₁₂ O
7,87	Hexanoate d'éthyle	123-66-0	895	75	C ₈ H ₁₆ O ₂
8,34	Butanoate de 3-méthylbutyle	106-27-4	928	37,9	C ₉ H ₁₈ O ₂
	Isoamylisobutyrate	2050-01-3	919	26,8	C ₉ H ₁₈ O ₂
8,48	1-(Methoxymethoxy)hexane	66675-06-7	719	14	C ₈ H ₁₈ O ₂
8,77	Valérate de pentyle	2173-56-0	747	18,3	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
9,12	4-hexen-1-ol, acétate	72237-36-6	931	33,6	C ₈ H ₁₄ O ₂
9,73	Alcool hexylique	111-27-3	933	60,8	C ₆ H ₁₄ O
9,84	Cis-3-Hexenol	928-96-1	869	23,6	C ₆ H ₁₂ O
10,15	Cis-3-Hexenol	928-96-1	951	38,2	C ₆ H ₁₂ O
10,88	Acide acétique	64-19-7	914	77,4	C ₂ H ₄ O ₂
11,51	Alcool isopropylique	67-63-0	802	10,8	C ₃ H ₈ O
12,04	Acide propanoïque	79-09-4	816	35,6	C ₃ H ₆ O ₂
12,21	Linalol	78-70-6	660	7,13	C ₆ H ₁₃ NO ₄
12,36	1-Propoxy-2-propanol	1569-01-3	741	21,8	C ₆ H ₁₄ O ₂
13,74	Propylène glycol	4254-15-3	773	40,6	C ₃ H ₈ O ₂
14,08	1,2 -Dideoxy-l-erythro-pentitol	ND	812	45	C ₅ H ₁₂ O ₃
16,04	Alcool isopropylique	67-63-0	789	10,9	C ₃ H ₈ O
	Propylène glycol	4254-15-3	779	49,2	C ₃ H ₈ O ₂
	Ethylglycolate	623-50-7	763	15	C ₄ H ₈ O ₃
17,2	Propylène glycol	4254-15-3	779	43,5	C ₃ H ₈ O ₂
	1-O-Methylglycérol	623-39-2	736	9,17	C ₄ H ₁₀ O ₃
	Propylène glycol	4254-15-3	724	6	C ₃ H ₈ O ₂
18,48	Propylène glycol	4254-15-3	936	62,5	C ₃ H ₈ O ₂
	Propylène glycol	4254-15-3	913	22,8	C ₃ H ₈ O ₂

18,51	Propylène glycol	4254-15-3	933	36,1	C ₃ H ₈ O ₂
	Propylène glycol	4254-15-3	932	33,3	C ₃ H ₈ O ₂
19,93	Propylène glycol	4254-15-3	858	36,4	C ₃ H ₈ O ₂
20,4	Glycérine	56-81-5	869	75,8	C ₃ H ₈ O ₃
	Glycéraldéhyde	367-47-5	799	7,12	C ₃ H ₆ O ₃
21,05	Glycérine	56-81-5	899	81	C ₃ H ₈ O ₃
	Glycéraldéhyde	367-47-5	811	6,63	C ₃ H ₆ O ₃
	Erythritol	149-32-6	806	6,37	C ₄ H ₁₀ O ₄
20,1 à 23,95	Glycérine	56-81-5	912	87,9	C ₃ H ₈ O ₃
	Erythritol	149-32-6	821	7,27	C ₄ H ₁₀ O ₄
25,86	Diglycérol	627-82-7	731	16	C ₆ H ₁₄ O ₅
	Hexaéthylène glycol	2615-15-8	709	10,3	C ₁₂ H ₂₆ O ₇

- Comparaison de la composition chimique de la forme liquide et de la forme aérosolisée du e-liquide myrtille

Parmi tous les composés retrouvés dans l'analyse chromatographique du e-liquide myrtille, on peut constater qu'un certain nombre de ces molécules ne sont que peu volatiles ou en quantité insuffisante pour être identifiées. Le nombre de molécules néoformées par l'aérosolisation est très important comparé à ce qui a été retrouvé pour les e-liquides framboise ou fraise, mais comparable à l'aérosol mûre. Ceci pourrait expliquer les réponses cellulaires plus délétères pour les cellules des e-liquides myrtille et mûre en comparaison aux e-liquides fraise et framboise.

Par exemple, en comparant la caractérisation chimique de l'e-liquide et de l'aérosol, nous pouvons identifier des composants chimiques communs aux deux formes de l'e-liquide comme l'acétaldéhyde est connue pour être toxique et cancérigène (Tableau 17).

Tableau 17: Analyse comparative des profils chimiques - identification des composés communs et spécifiques entre la forme liquide et aérosolisée de l'e-liquide aromatisé à la myrtille

Composés communs aux deux types d'échantillon (e-liquide/puffs)	Composés spécifiques à l'e-liquide myrtille	Composés spécifiques aux puffs myrtille	
1-pentanol Cis-3-Hexenol Acide acétique Acide propanoïque Acétaldéhyde Alcool hexylique Alcool isoamylique Alcool isopropylique Ethanol Ethylbutyrate Ethylglycolate Glycérine Hexanoate d'éthyle Isoamylacétate Isoamylisobutyrate Méthylbutyrate Propylène glycol	2-propanol, 1-(1-methylethoxy)- 2-propanol, 1-(2-methoxy-1-methylethoxy)- Acide α -céto-butyrique Acétate de (Z)-3-hexényle Anhydride acétique Ethyl acétate Hydroxyacétone Méthylglyoxal Pentyl formate trans- β -Damascone α -ionone	1,2 -Dideoxy-l-erythro-pentitol 1-(Methoxymethoxy)hexane 1-O-Methylglycérol 1-Propoxy-2-propanol 2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolane 2-propanol, 1,3-dichloro- 3,3,4,4-Tetrafluorohexane 3-[(trimethylsilyl)oxy]-2-{4-[(trimethylsilyl)oxy]phenyl}ethanamine 4-hexen-1-ol, acétate Acetic acid, pentyl ester Acétate d'éthyle	Butanoate de 3-méthylbutyle Chlorure de méthanesulfonyle Diglycérol Erythritol Glycéraldéhyde Hexaéthylène glycol Linalol Octaméthylcyclotétrasiloxane Propanoate d'allyle Succinaldéhyde Valérate de pentyle

IV.3.2. Mise en place d'une méthodologie d'identification des composés chimiques contenus dans les e-liquides et piégés par barbotage grâce à une technique de LC-MS-TOF

Afin d'augmenter la sensibilité de la caractérisation chimique des e-liquides qui sont des mélanges particulièrement complexes, une deuxième méthode d'identification des composés chimiques est en cours de développement. Il s'agit d'une méthode de chromatographie en phase liquide associée à la spectrométrie de masse à temps de vol. Pour mettre au point cette méthode de "screening" par LC-MS-TOF, nous nous sommes intéressés à 4 composés chimiques composant l'arôme complet fruit rouges : la frambinone ($C_{10}H_{12}O_2$; N° CAS : 5471-51-2), l'acétate d'éthyle ($C_4H_8O_2$; N° CAS : 141-78-6), le cis-3-hexenol ($C_6H_{12}O$; N° CAS 928-96-1) et la vanilline ($C_8H_8O_3$; N° CAS : 121-33-5). L'essentiel des résultats présentés dans cette partie feront référence à la mise au point du protocole et à quelques résultats préliminaires.

Plusieurs paramètres ont été mis en place à partir de la littérature puis adaptés selon les profils chromatographiques obtenus (Ali et al., 2021; Gumus, 2023; Mikołajczak et al., 2018; Wojdyło et al., 2016). Nous avons principalement fait varier des paramètres relatifs au spectromètre de masse mais également à la partie chromatographique (Tableaux 18 et 19).

En effet, concernant la partie chromatographique, deux types de phase mobile ont été expérimentées : une première composée d'un mélange d'acétonitrile et d'eau ultra pure dans un ratio 50/50 auquel est ajouté 0,1 % d'acide formique et une seconde composée d'acétonitrile à 100 % à laquelle est ajouté 0,1 % d'acide formique. Le volume d'injection choisi pour l'ensemble des expérimentations est fixé à 10 μ L et le débit choisi pour toutes les expérimentations est de 0,3 mL/min. Pour finir, nous avons injecté des échantillons de référence (molécules pures) volontairement sans colonne puis avec deux types de colonnes différentes en vue d'optimiser le protocole.

Tableau 18 : Récapitulatif des différents paramètres ajustés relatifs à la partie chromatographique de la LC-MS-TOF

	Paramètres liés à la chromatographie			
	Phase mobile	Volume d'injection	Débit	Type de colonne
Paramètres testés	Acétonitrile + 0,1 % Acide formique ou Acétonitrile + Eau ultrapure 50/50 + 0,1 % Acide formique	10 µL	0,3 mL/min	Zorbax Eclipse Plus C18 (Rapid Resolution HD 2,1 x 50 mm 1,8 micron) Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm 5 microns)
Paramètres choisis	Acétonitrile + Eau ultrapure 50/50 + 0,1 % Acide formique	10 µL	0,3 mL/min	Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm 5 microns)

Pour la partie spectrométrie de masse, nous avons fait varier un certain nombre de paramètres liés au « temps de vol » listés ci-dessous :

- Température et débit du « drying gaz » qui permet d'évaporer la phase mobile lors de la nébulisation
- Pression du nébuliseur qui permet d'aérosoliser l'échantillon
- Voltage du capillaire appliqué à l'entrée du spectromètre pour ioniser les composés (en mode positif)
- Voltage du nozzle qui permet d'affiner le faisceau d'ion entrant dans la MS
- Tension appliquée au fragmentor qui permet de faciliter l'entrée des ions dans la MS
- Température et débit du sheath gaz qui entoure les échantillons nébulisés afin de le stabiliser

Tableau 19 : Récapitulatif des différents paramètres ajustés relatifs à la partie spectrométrie de masse de la LC-MS-TOF

	Paramètres liés à la spectrométrie de masse							
	Température du drying gaz	Débit du drying gaz	Pression du nébuliseur	Voltage du capillaire	Voltage du nozzle	Voltage du fragmentor	Température du sheath gaz	Débit du sheath gaz
Paramètres testés	100°C 150°C 200°C 250°C 300°C 350°C	2 L/min 4 L/min 6 L/min 8 L/min 10 L/min	20 psi 30 psi 35 psi	3500 V	1000 V	150 V 300 V	200°C 225°C 250°C 300°C 350°C 400°C	10 L/min
Paramètres choisis	300°C	10 L/min	20 psi	3500 V	1000 V	150 V	225	10 L/min

L'optimisation des conditions expérimentales décrites ci-dessus, nous ont permis d'obtenir des chromatogrammes nets et interprétables comme illustré ci-dessous avec le chromatogramme de la vanilline (Figure 56).

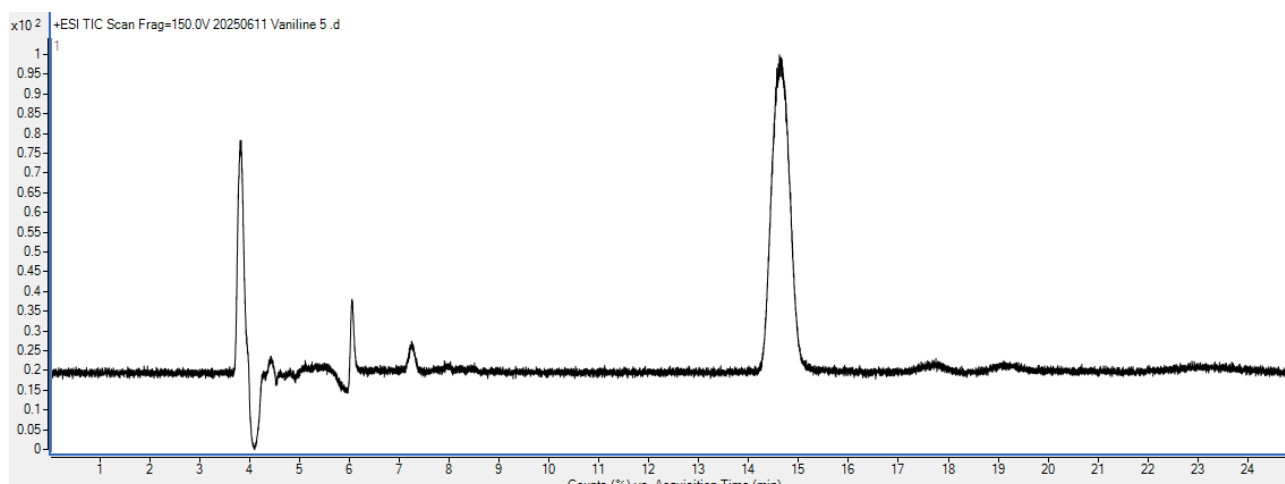


Figure 56 : Chromatogramme issu de l'analyse d'une solution de vanilline par LC-MS-TOF

La suite des expérimentations se basera sur la mise en place d'une bibliothèque interne de différents composés aromatiques connus et utilisés par la société Gaïatrend afin de pouvoir procéder de manière rigoureuse aux différentes identifications dans les mélanges complexes d'arômes dans les e-liquides.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

V. Discussion et perspectives

Lors de ces travaux de thèse, les effets d'e-liquides contenant des arômes de fruits rouges dilués dans le milieu de culture cellulaire d'un modèle de BAC déjà disponible au laboratoire ont pu être étudiés. En raison de problèmes techniques liés à la croissance d'une des deux lignées, nous avons dû mettre au point un nouveau modèle cellulaire de BAC nécessitant une validation phénotypique et fonctionnelle de ce dernier. C'est alors que nous avons pu mettre au point et comparer trois méthodes d'exposition des cellules de la BAC à des e-liquides mûre, framboise, fraise et myrtille, afin d'identifier d'éventuelles modifications dans la réponse cellulaire induite. Puis, des investigations analytiques ont pu être menées afin d'identifier des molécules contenues dans les e-liquides et/ou aérosols d'e-liquide pouvant expliquer certaines de ces réponses. Enfin souhaitant améliorer notre modèle cellulaire en y apportant une composante immunitaire, nous avons mis en place et caractérisé un modèle de cellules macrophagiques de type M₀, M₁ et M₂.

Ces travaux s'inscrivent dans un contexte où les conséquences de l'utilisation de la cigarette électronique restent méconnues que ce soit celles à court ou à long terme. En l'absence de preuves scientifiquement établies et par principe de précaution, les autorités de santé comme l'OMS ont classé ces produits comme « dangers potentiels » pour l'utilisateur. Parmi les composés des e-liquides qui soulèvent le plus de questions, nous nous sommes intéressés aux arômes car ils sont très nombreux et étudiés principalement dans le cadre d'une utilisation agroalimentaire, *per os* et non inhalée.

- Mise en place de modèles cellulaires de la barrière alvéolo-capillaire

Afin d'aider à comprendre l'impact des arômes inhalés sur le poumon, nous avons dans un premier temps utilisé un modèle de BAC déjà mis en place et validé au laboratoire (Sabo et al., 2023). Ce modèle cellulaire, composé de la lignée épithéliale NCI-H441 et de la lignée endothéliale HULEC-5a, avait montré une certaine similitude phénotypique et fonctionnelle à la BAC. Ces lignées ont été

placées de part et d'autre d'un insert cellulaire en coculture afin d'être soumises à différentes expositions à des e-liquides : par dilution et par exposition à l'aérosol piégé dans le milieu de culture. Plusieurs réponses cellulaires ont pu être investiguées avant que la lignée HULEC-5a ne cesse de se multiplier et ne dérive. Nous n'avons pas été en mesure, pour des raisons réglementaires, de remplacer ce lot de cellules. Afin de continuer les expérimentations sur un modèle cellulaire équivalent à notre premier modèle, nous avons développé un nouveau modèle de coculture utilisant une nouvelle lignée endothéliale en remplacement des cellules HULEC-5a. Le choix de la lignée s'est porté sur la lignée EA.hy926 puisque cette dernière a été utilisée dans plusieurs modèles de coculture décrits dans la littérature (Elje et al., 2023; Gosselink et al., 2024; Wang et al., 2020). Dans ces différents travaux, les cellules EA.hy926 ont été associées soit à des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B, soit à des cellules épithéliales alvéolaires A549 ou encore à des cellules THP-1, afin d'utiliser ces modèles de coculture dans le cadre d'exposition de type ALI. Cette lignée endothéliale est également utilisée dans l'étude des mécanismes physiopathologiques inflammatoires en région pulmonaire (Huang et al., 2013). Nous avons vérifié la similitude phénotypique et fonctionnelle de ce deuxième modèle de coculture par rapport à celui validé précédemment. Pour ce faire, nous avons caractérisé chacune des lignées phénotypiquement en vérifiant l'expression d'ARNm et de protéines spécifiques aux fonctions des cellules épithéliales et endothéliales. Ainsi, nous avons confirmé les phénotypes épithéliaux et endothéliaux, respectivement, des lignées NCI-H441 et HULEC-5a par qRT-PCR, western blot et immunofluorescence. L'aspect fonctionnel de la barrière mise en place par la coculture est également essentiel à évaluer. Nous avons basé cette évaluation sur la mesure de la TER pour différentes conditions de culture : milieu de culture commun utilisé ainsi que la temporalité d'ensemencement des deux types cellulaires. En condition classique d'ensemencement et de densité cellulaire, les valeurs de TER de la coculture ont atteint au bout de 8 jours des valeurs égales à environ $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$. D'après l'analyse comparative des TER de chacune des monocultures et de la coculture, nous avons pu mettre en évidence le caractère essentiel des cellules NCI-H441 dans l'intégrité de la barrière. En coculture, l'ajout des cellules endothéliales semble stabiliser l'intégrité de la BAC au-

délà de 8 jours de culture (Filaudeau et al. – page 112). Ces données sont cohérentes avec les valeurs décrites dans notre premier modèle et dans la littérature. En effet, Salomon et al. ont mis en évidence des valeurs de TER de NCI-H441 en monocouche avoisinant $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ après 8 jours de culture (Salomon et al., 2014). Et des valeurs équivalentes de TER pour les monocouches de NCI-H441 ont également été décrites par les travaux de Ren et al. Ces derniers ont par ailleurs comparé les valeurs de monocouches de cellules NCI-H441 à des monocouches de cellules A549 régulièrement utilisées comme modèle cellulaire pulmonaire. Cette analyse comparative démontre une bien meilleure capacité de barrière des NCI-H441 par rapport aux A549 dont les valeurs de TER ne dépassent pas $30 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Ren et al., 2016). Ces différentes investigations confirment le caractère physiologique et la robustesse du modèle de coculture développé lors de mes travaux de thèse.

Cependant, une composante essentielle semble manquer au modèle de coculture établi. En effet, en région alvéolaire, les macrophages alvéolaires résidents occupent un rôle clé dans l'homéostasie cellulaire. Ces derniers constituent la première ligne de défense face aux agressions exogènes comme l'exposition à des particules fines, aux agents pathogènes ou aux composés chimiques (DeFranco et al., 2009). Selon les signaux micro-environnementaux perçus, ces derniers ont la capacité de se polariser en macrophages M_1 ou M_2 , respectivement caractérisés par un phénotype pro-inflammatoire ou de réparation tissulaire (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Différents travaux ont mis en évidence une augmentation de la réponse inflammatoire après exposition de modèles *in vitro* à des e-liquides ou aérosols (Kim et al., 2022; Lerner et al., 2015; Morris et al., 2021; Muthumalage et al., 2018; Nair et al., 2020; Rouabhia et al., 2020; Sabo et al., 2023; Wu et al., 2014). D'autre part, les effets pro-inflammatoires et délétères des e-liquides et aérosols aromatisés sur les macrophages ont été investigués en région pulmonaire (Matsumoto et al., 2022; Morris et al., 2021; Ween et al., 2017). Les macrophages peuvent moduler l'activité des cellules épithéliales et endothéliales grâce à des interactions croisées, principalement par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines (Osorio-Valencia and Zhou, 2024). Il paraît donc pertinent d'ajouter au modèle de BAC cette composante immunitaire qui joue, d'après la littérature, un rôle majeur dans les réponses cellulaires après

exposition aux e-liquides et aérosols. C'est pourquoi, nous avons mené, parallèlement aux travaux focalisés sur le modèle « simplifié » de coculture, une mise au point d'un protocole visant à intégrer des macrophages alvéolaires en région apicale de l'insert cellulaire, dans le compartiment alvéolaire reproduit *in vitro*. Ces derniers seront soit résidentiels (M_0), soit pro-inflammatoires (M_1), soit impliqués dans la phase de réparation tissulaire (M_2). Sur cette base, nous avons établi un protocole de différenciation de cellules monocytaires THP-1 en macrophages M_0 puis de polarisation vers un phénotype M_1 ou M_2 . Ces différents phénotypes ont été caractérisés afin d'évaluer l'efficacité du protocole mis au point. Une première évaluation morphologique a été effectuée et nous avons pu mettre en évidence des différences significatives entre les sous-types. En effet, la différenciation des THP-1 en macrophages par traitement avec du PMA a changé considérablement leur morphologie et a également induit une adhérence des cellules obtenues contrairement aux THP-1 natives qui se multiplient en suspension dans le milieu de culture. Des observations similaires ont été décrites dans différents travaux (Takashiba et al., 1999; Yin et al., 2023; Zhang et al., 2014). En effet, les prolongements, aussi appelés pseudopodes, ont été utilisés comme caractéristiques morphologiques des différents sous-types. Cependant, contrairement à ce que nous avons décrit, les travaux de Zhang et al. décrivent les prolongements des M_1 plus « évidents » que ceux des macrophages M_0 et M_2 (Zhang et al., 2023). Les marqueurs morphologiques n'étant pas suffisants pour caractériser de manière fiable les sous-populations macrophagiques, nous les avons caractérisées par une approche moléculaire. Nous avons ciblé divers marqueurs moléculaires pour chacune des sous-populations comme l'IL-1 β , l'IL-12 β , l'Arg2, le Fpr2 pour la sous-population M_1 et l'Arg1, l'Egr2, c-Myc et CD206 pour la sous-population M_2 (Abrial, 2014; de las Casas-Engel and Corbí, 2014; Orekhov et al., 2019; Zajac et al., 2013). Pour le phénotype M_1 , les marqueurs moléculaires positivement exprimés par la sous-population M_1 sont l'IL-1 β et l'IL-12 β dans nos expérimentations. Cette différence significative d'expression de l'IL-1 β (150 fois plus exprimé) par les M_1 par rapport aux M_0 et M_2 a également été démontrée dans les travaux de Jablonski et al. (Jablonski et al., 2015b). Cependant, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence une expression spécifique des

marqueurs Arg2 et Fpr2 par les M₁, contrairement à ce qui était attendu (Abrial, 2014; Arora et al., 2018a; de las Casas-Engel and Corbí, 2014). La caractérisation des macrophages M₂ s'est également révélée difficile en raison de la grande variabilité de nos résultats qRT-PCR peut-être en raison d'un manque de spécificité de certains couples d'amorces. Le marqueur c-Myc est décrit comme majoritairement exprimé par les cellules M₂, or nous avons mis en évidence l'expression (ARNm) de ce gène également dans les M₀ et M₁. Par ailleurs, comme décrit dans la littérature c-Myc est aussi exprimé dans les cellules THP-1 (Lee et al., 1987). Devant ces résultats mitigés, nous avons élargi le panel de marqueurs pour la sous-population M₂. Nous avons ciblé le cluster de différenciation CD206, ou récepteur au mannose, par immunofluorescence. Comme attendu, nous avons pu mettre en évidence une expression du CD206 significativement plus importante dans les M₂ que dans les M₀ et M₁. Ces derniers résultats concordent avec les données de la littérature (Abrial, 2014; Arora et al., 2018b). Cependant les dernières données de la littérature laissent entendre que la polarisation des sous-populations macrophagiques s'inscrit dans un continuum phénotypique plutôt que dans des signatures moléculaires tranchées et strictement définies (Chaintreuil et al., 2023). Cette dernière donnée conforte nos résultats, mais indique aussi que les protocoles que nous avons utilisés pour la caractérisation des sous-populations macrophagiques demeurent trop aléatoires pour en déduire des conclusions solides et obtenir une sous-population « pure ». De plus, certains marqueurs peuvent être exprimés de manière croisée, ce qui rend la mise au point d'une culture contenant majoritairement un sous-type difficile (Forrester et al., 2018). Pour résoudre ce problème, il serait donc bénéfique d'évaluer l'hétérogénéité des sous-populations macrophagiques par une méthode plus fine telle que la cytométrie de flux, qui est une méthode de référence pour l'identification des cellules immunitaires. En effet, l'analyse à l'échelle cellulaire individuelle, nous permettrait de mesurer de manière fiable les marqueurs protéiques des sous-populations macrophagiques afin d'ajouter, par un tri cellulaire, ces derniers au modèle de BAC qui pourra ensuite être exposé aux aérosols d'e-liquides.

- Méthodes d'exposition des modèles aux e-liquides fraise, framboise, mûre et myrtille

Pour étudier la toxicité des e-liquides aromatisés sur la BAC, nous avons mis en place des méthodes d'exposition différentes. La première consiste à diluer les e-liquides dans le milieu de culture apical du modèle de BAC, la seconde consiste à exposer les cellules à un aérosol préalablement piégé dans du milieu de culture et la troisième consiste à exposer les cellules de la BAC de manière directe à l'aérosol en ALI grâce à un appareil Vitrocell[®].

Dans un premier temps et avant l'installation du dispositif Vitrocell[®], nous avons pu exposer les cellules aux e-liquides/aérosols via les deux premières méthodes d'exposition. La limite liée à la première méthode d'exposition, par dilution, est l'utilisation de la forme liquide et non aérosolisée du e-liquide. Cela complexifie la comparaison entre nos investigations et la réelle exposition par inhalation du consommateur. En effet, un certain nombre de produits d'aérosolisation formés par des processus de chauffage ou d'oxydation des véhicules et des arômes sont généralement présents dans l'aérosol d'e-cigarettes avant d'être inhalés par le consommateur. Plusieurs composés nocifs de ce type ont été retrouvés dans la littérature, mais également lors de nos expérimentations. On peut citer par exemple le formaldéhyde, l'acétaldéhyde ou l'acroléine (Kulháněk and Baptistová, 2020; Lai and Qiu, 2020). Dans le cas de l'exposition à l'e-liquide dilué dans le milieu de culture cellulaire, ce type de composé n'est pas supposé être présent et donc peut fausser la réponse cellulaire induite comparativement à l'exposition aux aérosols.

Afin de pouvoir comparer les concentrations issues de chacune des deux premières méthodes, pourcentage d'e-liquide dans le milieu et nombre de puffs piégés dans le milieu, nous avons défini une échelle d'équivalence entre ces deux unités d'exposition. Cette dernière fait correspondre un nombre de puffs à un pourcentage d'e-liquide dans le milieu de culture. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les propriétés hyperosmolaires des véhicules PG/VG. Ces propriétés ont déjà été décrites et mises en avant dans différents travaux (Czekala et al., 2019; Gonzalez-Suarez et al., 2017; Munakata et al., 2018; Sabo et al., 2023). Par cette équivalence, nous avons pu déduire que 240 puffs piégés dans le milieu de culture correspondent environ à une dilution de 2,5 % d'e-liquide dans le

milieu de culture. Cependant, il est difficile d'affirmer que la totalité des composés contenus dans l'e-liquide a bien été piégée dans le milieu de culture cellulaire. En effet, les propriétés de volatilité des composés aromatisants composant l'e-liquide ne sont pas toutes équivalentes et l'on peut supposer qu'une partie des composés n'est pas vaporisée ou n'est pas piégée dans le milieu de culture. En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer l'aérosolisation des composés comme la solubilité et la polarité des composés chimiques ainsi que la composition du véhicule (proportion PG/VG) (Noël et al., 2019). De plus, il a été démontré que le type d'e-cigarette utilisé, les atomiseurs ainsi que les paramètres appliqués à la résistance en termes de puissance, de voltage ou de température, peuvent agir de manière significative sur la composition finale de l'aérosol et par conséquent les réponses cellulaires engendrées (Cirillo et al., 2019a; Dusautoir et al., 2021; Sleiman et al., 2016; Williams et al., 2019). Tous ces éléments constituent une grande variabilité et peuvent rendre complexe l'interprétation des réponses cellulaires découlant du deuxième type d'exposition. Outre les paramètres inhérents au dispositif de vapotage, les protocoles établis pour les expositions varient de manière considérable selon les travaux (Cirillo et al., 2019b; Sleiman et al., 2016). Bien souvent, pour une exposition aux aérosols piégés, le protocole et le matériel ont été élaborés et conçus en interne au sein des laboratoires, sans suivre une norme spécifique. Ainsi, la méthode de piégeage peut différer selon les travaux tant par le dispositif de barbotage utilisé que par le profil de puffs utilisé (Higham et al., 2016; Hwang et al., 2016; Nair et al., 2020; Ween et al., 2017). Toutes ces problématiques concernent également la 3^{ème} méthode d'exposition qui consiste à exposer le modèle cellulaire de manière directe à l'aérosol. En effet, une nouvelle fois, plusieurs dispositifs d'exposition aux aérosols (Vitrocell®, Cultex® etc..) peuvent être choisis par les laboratoires (dispositifs commercialisés ou fabriqués « maison »). Leur fonctionnement peut induire de manière assez conséquente des variations dans l'exposition finale du modèle in vitro aux aérosols. Cela multiplie et complexifie d'autant la reproduction des données issues des différentes sources bibliographiques. Notre choix d'appareillage s'est porté sur le dispositif VC1 Smoking Machine (Vitrocell®) car il est fréquemment référencé dans le domaine de la toxicologie de l'inhalation (Czekala et al., 2019; Dusautoir et al., 2021; Kim et al.,

2022; Zarcone et al., 2023). Le profil de puff que nous avons utilisé provient des recommandations et a été utilisé comme paramétrage pour la 2^{ème} et la 3^{ème} méthode d'exposition ("Routine Analytical Machine for E-Cigarette Aerosol Generation and Collection - Definitions and Standard Conditions | CORESTA," 2015).

Une fois l'ensemble des méthodes d'exposition mis au point, nous avons exposé :

- Le premier modèle de coculture (HULEC-5a/NCI-H441) à la première et deuxième méthode d'exposition, mais en raison des difficultés rencontrées avec la lignée endothéliale, nous avons dû interrompre les expérimentations.
 - Le nouveau modèle de coculture mis au point (EA.hy926/NCI-H441) aux trois méthodes d'expositions.
- Rôle des e-liquides sur la modulation de l'intégrité de la barrière

Pour le premier modèle de coculture, nous avons pu mettre en évidence plusieurs réponses cellulaires après 24 h d'exposition, dans la région apicale de l'insert, aux e-liquides/aérosols aromatisés à la mûre, framboise et myrtille. Pour chacun de ces e-liquides dilués dans le milieu de culture cellulaire, nous avons démontré une modulation de l'intégrité de la barrière *in vitro* par l'investigation de la résistance transépithéliale. En effet, à faible concentration d'e-liquide, une augmentation significative de la TER a été mise en évidence, tandis qu'à partir d'un certain seuil, variable selon l'arôme considéré, une baisse significative de l'intégrité de la barrière a été observée. Ces observations concordent avec celles décrites dans les précédents travaux de Sabo et al. (Sabo et al., 2023). L'augmentation de la TER à de faibles concentrations ne semble pas avoir été décrite dans d'autres travaux que ceux menés au laboratoire et suggère la mise en place de processus cellulaires qui méritent d'être étudiés plus en détail. Les baisses significatives de l'intégrité de la BAC sont corrélées à de fortes concentrations : 10 %, 20 % et 30 %. Cette baisse de TER semble principalement due à l'hyperosmolalité des véhicules des e-liquides, mais comparé à l'effet du véhicule seul, on observe

une légère différence qui laisse penser que les arômes ne sont pas sans importance dans les processus liés à l'intégrité de la BAC. Ces concentrations (> 5 %) ne correspondent pas, ou que rarement en cas de vapotage intensif, à des concentrations inhalées par un consommateur. En effet, d'après les équivalences établies par mesure de l'osmolalité des liquides, nous avons démontré que le plus grand nombre de puffs testés, soit 240 puffs, équivaut à 2,5 % d'e-liquide. Les utilisations moyennes quotidiennes des e-cigarettes avoisinent 300 puffs, soit un peu plus de 2,5 % par équivalence. Or, une baisse significative de la TER a été mise en évidence à partir de 5 % pour l'arôme Mûre. Pour la seconde méthode d'exposition, nous avons également mis en évidence une augmentation significative de l'intégrité de la BAC à de faibles concentrations pour l'e-liquide Mûre : 60 et 120 puffs (équivalentes à 0,2-1 % par dilution). Les processus modulant positivement l'intégrité de la barrière semblent donc également intervenir après exposition aux aérosols piégés.

Le nouveau modèle (EA.hy926 + NCI-H441) de coculture mimant la BAC a été exposé de trois manières distinctes aux e-liquides/aérosols : exposition à l'e-liquide dilué dans le milieu de culture cellulaire, exposition à l'aérosol piégé dans du milieu de culture et exposition directe à l'aérosol en ALI. Pour chacune de ces expositions, nous avons mis en évidence une augmentation significative de la TER à de faibles concentrations, ainsi qu'une chute de la TER à forte concentration pour chacun des arômes étudiés. Les données relatives à la baisse significative de la TER ont également été décrites dans d'autres travaux après exposition à des e-liquides avec ou sans nicotine (Effah et al., 2023; Raduka et al., 2023; Sabo et al., 2023).

Les données de la littérature montrent que les protéines de jonction jouent un rôle majeur dans ces processus de gain et perte d'intégrité de la BAC (Hermanns et al., 2010). Pour notre part, nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression de l'occludine après une exposition à 240 puffs d'aérosol d'e-liquide fraise. Cette protéine est essentielle dans les jonctions serrées cellulaires au niveau épithélial de la BAC notamment. Les autres aérosols piégés dans le milieu de culture ont provoqué une tendance à l'augmentation, statistiquement non-significative, de l'expression de cette protéine. Des résultats similaires ont été décrits après exposition directe à des

aérosols aromatisés sur cellules bronchiques BEAS-2B ou fibroblastes pulmonaires. En effet, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression protéique d'occludine (Wang et al., 2023). Les travaux de Raduka et al. ont également décrit une tendance à l'augmentation de l'expression protéique de l'occludine après une exposition à 2,5 % de PG/VG dans un ratio 50/50 (Raduka et al., 2023). Pour consolider notre résultat, nous avons souhaité investiguer l'expression d'autres protéines de jonctions serrées : ZO-1 et Claudin-5. Contrairement à ce qui était attendu, l'expression de ces deux protéines de jonctions serrées n'a pas été modifiée par une exposition à l'e-liquide, quel qu'il soit. L'occludine, la claudin-5 et ZO-1 sont étroitement liées dans l'établissement de ces jonctions serrées. En effet, ZO-1 intervient comme un intermédiaire de liaison entre les protéines de jonctions membranaires (occludine et claudines) et le cytosquelette d'actine (Kuo et al., 2022). Cette organisation suggère donc que l'altération d'expression d'une de ces protéines pourrait désorganiser les jonctions intercellulaires et ainsi moduler l'intégrité de la BAC. Cependant, plusieurs travaux semblent démentir cette hypothèse (Raduka et al., 2023). En effet, une réorganisation des structures de jonctions cellulaires provoquée par un stress ne signifie pas nécessairement une altération de leur expression. Ces protéines ont alors une localisation cytoplasmique visible en immunofluorescence sans nécessairement altérer leur expression protéique totale (Raduka et al., 2023). C'est cette hypothèse que nous privilégions pour expliquer nos résultats. Ainsi, l'étude de la répartition entre les protéines ZO-1 et occludine phosphorylées et non phosphorylées permettra de mieux comprendre la structuration des jonctions serrées. Pour ce faire, la localisation de l'occludine sera étudiée par immunofluorescence. De cette manière, nous pourrions évaluer la localisation de la protéine après exposition aux aérosols piégés. Des résultats préliminaires avaient été obtenus au laboratoire par une exposition à l'e-liquide fruits rouges dilué (2,5 %). Alors que l'occludine est exprimée très nettement en région membranaire en condition contrôle, l'exposition à l'e-liquide semble augmenter son expression en relocalisant la protéine en région majoritairement cytoplasmique (Figure 34). L'objectif à court terme est d'investiguer plus précisément ces phénomènes (expression, localisation), liés de manière directe à la modulation de la TER, par immunofluorescence sur la BAC

après exposition directe aux aérosols. Cependant, une des limites de cette sous-partie est que nous sommes focalisés uniquement sur les formes totales des protéines de jonctions serrées. Or, il a été démontré que la phosphorylation de ces dernières joue un rôle majeur dans leur fonction et localisation (Van Itallie and Anderson, 2017). Il paraît donc indispensable de prendre en compte la forme phosphorylée et totale des protéines de jonctions étudiées intervenant très probablement dans la modulation de l'intégrité de la BAC. De plus, il est prévu de reproduire ces investigations pour les deux autres méthodes d'exposition (dilution et exposition directe) qui n'ont pas encore été étudiées afin d'affirmer ou infirmer ces observations.

- Viabilité des cellules : perméabilisation de la membrane plasmique et activité enzymatique cellulaire

Plusieurs tests évaluant la cytotoxicité ont pu être menés sur les deux modèles de coculture en aval de leur exposition.

Pour le premier modèle de coculture et après exposition aux e-liquides mûre, framboise et myrtille, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de la mortalité après une exposition à des concentrations inférieures à 2,5 % pour l'e-liquide myrtille et inférieures à 20 % d'e-liquide dilué pour les autres aromes. La nette augmentation de la concentration en LDH en extracellulaire peut être expliquée par une perméabilisation de la membrane cellulaire consécutive à l'hyperosmolalité des véhicules PG et VG qui provoque la lyse cellulaire par choc osmotique. Lors de l'exposition aux aérosols piégés, nous n'avons observé aucune différence significative après exposition aux e-liquides par rapport au contrôle (cellules non exposées). Ce résultat est à mettre en regard des résultats d'équivalence obtenus entre les pourcentages de liquides dilués et le nombre de puffs. Aucune augmentation de la mortalité cellulaire n'a été observée pour les concentrations d'e-liquide équivalentes à 10, 20, 30, 60 et 120 puffs c'est-à-dire inférieures à 1 % de e-liquide dilué. De même, nous n'avons pas mis en évidence de nécrose cellulaire accrue par exposition à des aérosols piégés, dans lesquels des produits de dégradation et d'oxydation pourraient être présents.

Le deuxième modèle de BAC (EA.hy926 + NCI-H441) a été exposé aux e-liquides fraise, framboise, mûre et myrtille dilués dans le milieu de culture, aux aérosols piégés dans le milieu de culture et aux aérosols de manière directe. Par dilution et piégeage de l'aérosol, contrairement à ce qui était attendu, nous n'avons pas décrit de réponses cellulaires liées à une augmentation significative de la mort cellulaire. En effet, la concentration en LDH semble stable pour tous les e-liquides aromatisés (fraise, framboise, mûre et myrtille) par rapport au contrôle (milieu de culture). Bien au contraire, une légère diminution de la mortalité cellulaire a été démontrée pour l'e-liquide myrtille dilué à 0,2 ; 1 et 2,5 %. Aucune donnée dans la littérature n'a mis ce type de résultats en avant. Soit cela suggère un artéfact, soit les arômes présents dans ces e-liquides ont des propriétés protectrices vis-à-vis de la mort cellulaire qu'il serait intéressant d'étudier. Parmi les pistes à investiguer, nous pouvons lister le rôle antioxydant de certains composés des fruits rouges tels que les flavonoïdes (Manganaris et al., 2014). Enfin, par exposition directe aux aérosols par le dispositif Vitrocell®, nous avons décrit des résultats plus contrastés. En effet, une augmentation significative de la mortalité cellulaire se traduisant par une libération de LDH dans le milieu extracellulaire pour 3 des aérosols aromatisés testés (mûre, myrtille et framboise) a été mise en évidence. L'aérosol fraise n'a cependant pas induit de réponse cellulaire relative à la mortalité cellulaire avec libération de LDH.

Concernant l'activité métabolique cellulaire, évaluée par un test MTS, nous avons décrit des résultats similaires à ceux obtenus pour les mesures de la TER pour le premier modèle de coculture (HULEC-5a/NCI-H441). En effet, après dilution des e-liquides mûre, framboises et myrtilles, une augmentation significative de l'activité métabolique cellulaire a été mise en évidence à de faibles concentrations pour chacun des e-liquides (0,2% et 1 %). Au contraire, à 20 %, l'activité métabolique chute de manière significative par rapport au contrôle et de manière concomitante à l'augmentation de la mort cellulaire dans les mêmes conditions décrites précédemment. Les résultats liés à la seconde méthode d'exposition (aérosol aromatisé à la mûre piégé dans le milieu de culture cellulaire) sont plus contrastés et difficiles à interpréter du fait de la fin de vie du modèle. En effet, une baisse significative

de l'activité métabolique a été décrite pour 60 puffs seulement. Cependant, la variabilité de ces résultats et le faible nombre d'expérimentation ne nous permettent pas de conclure de manière fiable. Pour le deuxième modèle de coculture, les résultats n'ont pas révélé de différences notables par rapport au contrôle pour les e-liquides dilués (données non présentées). Par piégeage de l'aérosol, nous avons mis en évidence une légère baisse de cette activité à 10 et 20 puffs pour l'arôme fraise par piégeage de l'aérosol (données non présentées). Au contraire, par exposition directe à l'aérosol, nous avons décrit une augmentation significative de l'activité métabolique cellulaire après exposition directe à 20 puffs d'aérosol aromatisé à la mûre et 120 puffs d'aérosol aromatisé à la framboise. Ces résultats ne correspondent pas à ceux attendus et contrastent avec ceux obtenus pour le test de mortalité LDH. En effet, une augmentation de la LDH et du MTS peuvent être simultanément décrites, comme c'est le cas pour la BAC exposée à l'aérosol aromatisé à la framboise (120 puffs). Cette hausse simultanée des deux marqueurs peut être expliquée par une réponse métabolique compensatoire cellulaire face à un stress exogène (augmentation de l'activité métabolique) parallèlement à l'augmentation des dommages cellulaires menant à la libération de LDH dans le milieu extracellulaire. Cette hypothèse n'a pas été décrite dans la littérature car les différentes études *in vitro* semblent majoritairement décrire des diminutions de la viabilité cellulaire et une augmentation de la mort cellulaire après les 3 types d'exposition étudiées (Effah et al., 2023; Hwang et al., 2016; Matsumoto et al., 2022; Morris et al., 2021; Muthumalage et al., 2018; Rouabhia et al., 2020; Sabo et al., 2023). Cependant, le laboratoire avait déjà démontré une augmentation de l'activité métabolique observée par le test de MTS alors qu'une nécrose cellulaire était aussi présente, ceci pouvant être mis en lien avec une augmentation du stress oxydant mitochondrial phénomène qui active les déshydrogénases dépendantes de l'activité des coenzymes NAD(P)H, H^+ .

- Rôle du stress oxydant mitochondrial dans la réponse cellulaire après exposition aux e-liquides

Nous avons étudié le stress oxydant mitochondrial induit par une exposition aux e-liquides ou aux aérosols dilués. En effet, l'exposition des modèles *in vitro* aux aérosols et e-liquides aromatisés ont fréquemment été assimilés à une augmentation de la production de ROS (Lerner et al., 2015; Morris et al., 2021; Muthumalage et al., 2018; Nair et al., 2020; Sabo et al., 2023). Ces expérimentations se sont focalisées sur la lignée épithéliale NCI-H441 en monocouche. Des différences majeures ont été mises en évidence selon le type d'arôme composant les e-liquides/aérosols. En effet, une augmentation du stress oxydant mitochondrial a été mise en évidence à des concentrations plus faibles pour l'e-liquide mûre que pour le véhicule ou les autres e-liquides aromatisés. Ainsi, dès 2,5 % une augmentation significative de la production de ROS mitochondrial par rapport au contrôle tandis qu'elle a été décrite dès 10 % pour les autres e-liquides aromatisés. Contrairement à ce qui était attendu, aucune modulation du stress oxydant mitochondrial n'a été mise en évidence après exposition aux différents aérosols piégés. Ces résultats suggèrent que, les composés aromatisants selon leurs propriétés de volatilisation, ne sont probablement pas entraînés ou en faible quantité dans le milieu de culture où est piégé l'aérosol.

La composition chimique des arômes présents dans les e-liquides semble jouer un rôle pivot dans certains types de réponses cellulaires comme les processus oxydants. En effet, Morris et al. ont démontré une augmentation significative de la libération de ROS cellulaires après exposition à des composés aromatisants régulièrement utilisés dans les e-liquides (vanilline, cinnamaldéhyde, eugénol) (Morris et al., 2021).

Cette composante n'a pas encore pu être étudiée pour notre troisième méthode d'exposition. En effet, les limitations techniques liées au support exigé pour effectuer le test MitoSOX™ (plaque à fond noir à 96 puits) ne nous permettent pas d'étendre cette expérimentation à notre modèle de BAC. Pour pallier cet obstacle, nous envisageons d'étudier le stress oxydant induit après exposition directe aux aérosols aromatisés par le dosage du glutathion réduit et du glutathion oxydé présents dans les cellules

exposées. Ce type d'expérimentation a été décrit précédemment en toxicologie d'inhalation (Wang et al., 2022; Zhang et al., 2015). Ce dosage sera possible grâce à une technique de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem LC-MS-MS. Le principe est de : doser les deux formes du glutathion, procéder à la dérivation de la forme réduite pour la stabiliser en empêchant son oxydation, établir le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé. Ce rapport reflète l'équilibre redox cellulaire : si le rapport est élevé, alors l'environnement cellulaire est dans un état physiologique, caractérisé par une prédominance de la forme réduite du glutathion. En revanche, si le rapport est faible, cela indique l'existence d'un stress oxydant intracellulaire déjà important, associé à une accumulation de la forme oxydée du glutathion. Dans cette situation la cellule ne pourra plus survivre et mettra à contribution les processus d'autophagie, d'apoptose ou de nécrose.

A plus long terme, il serait indispensable d'explorer de manière plus fine les réponses cellulaires observées. En effet, des méthodes multi-omiques, nous permettraient d'approfondir les pistes des différentes voies cellulaires impliquées après exposition aux e-liquides et aérosols. Une analyse protéomique permettrait d'investiguer plus largement les réponses induites par la potentielle altération de voies de signalisation impliquées dans les mécanismes oxydants, inflammatoires, métaboliques ou de mort programmée par apoptose par exemple. Cette approche permettra peut-être d'identifier les cibles activées par les arômes dont on ne connaît pas de récepteurs spécifiques.

- Composition chimique des e-liquides avant et après vaporisation

Pour finir, nous avons investigué les caractéristiques chimiques des différents e-liquides et aérosols par deux méthodes de chromatographie couplées à de la spectrométrie de masse en identifiant leurs différents composés chimiques. Les analyses chromatographiques menées pendant ces travaux reposent essentiellement sur la méthode de TD-GC-MS. Les résultats démontrent des différences entre les arômes d'e-liquides considérés, mais aussi selon la forme de l'échantillon (liquide ou aérosolisée). La présence de composés aromatisants a été relevée dans les formes liquides ou

aérosolisées des e-liquides aromatisés à la mûre, myrtille, framboise et fraise comme le cis-3-hexenol, l'acétate d'hexyle, le butyrate d'éthyle ou l'acétate d'éthyle (Tierney et al., 2016). Certains esters fruités sont connus pour être des composants irritants pour les voies respiratoires comme l'acétate d'isoamyle et le butyrate d'éthyle. Toutefois, ces toxicités dépendent des doses inhalées et nous n'avons pas jusqu'à présent quantifié ces molécules dans nos échantillons (National Center for Biotechnology Information, 2025g, 2025h).

Nous avons également mis en évidence une forte proportion de produits de dégradation, solvants et contaminants dans les formes aérosolisées. L'acétaldéhyde, identifié dans tous les e-liquides testés, est connu comme substance cancérigène et tératogène chez l'animal (National Center for Biotechnology Information, 2025i). Des produits de dégradation du PG comme l'éthylglycolate ont également été identifiés dans tous les e-liquides étudiés sous leurs formes aérosolisées. Le glycidol qui est également un produit de dégradation du PG, classé carcinogène, est lui identifié uniquement dans la forme aérosolisée de l'e-liquide mûre. Ces différences de composition pourraient justifier les réponses cellulaires délétères à plus faibles doses identifiées pour l'arôme mûre.

Les listes de composés identifiés dans nos échantillons et fournies dans la partie « résultats » de ce manuscrit ne sont pas exhaustives. En effet, des composés chimiques intégrés normalement aux e-liquides que nous avons testés (données confidentielles) n'ont pas tous été identifiés par les analyses en TD-GC-MS. Nous pouvons donc supposer qu'une partie des composés n'a pas été détectée par notre méthode d'analyse car leur identification n'était pas suffisamment fiable ($R\text{-match} < 700$) en raison de pics non séparés chromatographiquement. Les mélanges d'arômes étant de plus en plus complexes, il paraît difficile d'évaluer la totalité des molécules pouvant être formées par l'interaction de ces composés aromatiques et véhicules. Des méthodes plus fines et plus adaptées aux mélanges complexes comme la LC-MS-TOF sont donc recommandées. C'est la raison pour laquelle l'ensemble des e-liquides natifs et aérosols piégés dans le milieu de culture seront analysés par cette technique.

CONCLUSION

VI. Conclusion

Ce projet de thèse a consisté à mettre au point différentes techniques analytiques et de culture cellulaire en vue d'étudier les réponses cellulaires induites par une exposition à différents e-liquides aromatisés : mûre, myrtille, fraise, framboise. Pour ce faire, nous avons développé un nouveau modèle in vitro de BAC qui a été validé phénotypiquement et fonctionnellement. Ce dernier a été exposé aux e-liquides/aérosols par l'intermédiaire de trois méthodes d'expositions différentes développées et mises en place pendant ces travaux de thèse. Les réponses cellulaires induites varient selon la méthode d'exposition utilisée, mais également selon le type d'arôme utilisé dans l'e-liquide. Pour tenter de répondre à ces interrogations, nous avons mis au point deux techniques analytiques par chromatographie en vue d'identifier de potentiels composés nocifs pouvant expliquer les réponses cellulaires observées sur la BAC (stress oxydant mitochondrial, perte d'intégrité de la barrière etc). Ce travail s'inscrit dans une dynamique plus large visant à combiner différentes techniques biologiques et chimiques, essentielles en toxicologie de l'inhalation, afin de répondre aux interrogations liées à l'utilisation et à la sécurité de ces produits de vapotage.

Bibliographie

- 6230B Time-of-Flight LC/MS | Agilent [WWW Document], n.d. URL <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-instruments/time-of-flight-lc-ms/6230b-time-of-flight-tof-lc-ms> (accessed 7.4.25).
- Abrial, C., 2014. Caractérisation de la polarisation des macrophages pulmonaires humains et voies de régulation. *Biol. Cell.* 230.
- Adeloye, D., Song, P., Zhu, Y., Campbell, H., Sheikh, A., Rudan, I., 2022. Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Respir. Med.* 10, 447–458. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00511-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00511-7)
- Alexandrov, L.B., Ju, Y.S., Haase, K., Van Loo, P., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Totoki, Y., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Shibata, T., Campbell, P.J., Vineis, P., Phillips, D.H., Stratton, M.R., 2016. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science* 354, 618–622. <https://doi.org/10.1126/science.aag0299>
- Ali, A., Bashmil, Y.M., Cottrell, J.J., Suleria, H.A.R., Dunshea, F.R., 2021. LC-MS/MS-QTOF Screening and Identification of Phenolic Compounds from Australian Grown Herbs and Their Antioxidant Potential. *Antioxidants* 10, 1770. <https://doi.org/10.3390/antiox10111770>
- Arora, S., Dev, K., Agarwal, B., Das, P., Syed, M.A., 2018a. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology* 223, 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.11.001>
- Arora, S., Dev, K., Agarwal, B., Das, P., Syed, M.A., 2018b. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology* 223, 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.11.001>
- Aufderheide, M., Emura, M., 2017. Phenotypical changes in a differentiating immortalized bronchial epithelial cell line after exposure to mainstream cigarette smoke and e-cigarette vapor. *Exp. Toxicol. Pathol.* 69, 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.03.004>
- Azzopardi, D., Patel, K., Jaunky, T., Santopietro, S., Camacho, O.M., McAughey, J., Gaça, M., 2016. Electronic cigarette aerosol induces significantly less cytotoxicity than tobacco smoke. *Toxicol. Mech. Methods* 26, 477–491. <https://doi.org/10.1080/15376516.2016.1217112>
- Barnes, J., McRobbie, H., Dong, C.Y., Walker, N., Hartmann-Boyce, J., 2019. Hypnotherapy for smoking cessation. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2019, CD001008. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001008.pub3>
- Barua, R.S., Rigotti, N.A., Benowitz, N.L., Cummings, K.M., Jazayeri, M.-A., Morris, P.B., Ratchford, E.V., Sarna, L., Stecker, E.C., Wiggins, B.S., 2018. 2018 ACC Expert Consensus Decision Pathway on Tobacco Cessation Treatment. *J. Am. Coll. Cardiol.* 72, 3332–3365. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.10.027>

- Baxter, E.W., Graham, A.E., Re, N.A., Carr, I.M., Robinson, J.I., Mackie, S.L., Morgan, A.W., 2020. Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J. Immunol. Methods* 478, 112721. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112721>
- Behar, R.Z., Luo, W., McWhirter, K.J., Pankow, J.F., Talbot, P., 2018. Analytical and toxicological evaluation of flavor chemicals in electronic cigarette refill fluids. *Sci. Rep.* 8, 8288. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25575-6>
- Bellou, V., Gogali, A., Kostikas, K., 2022. Asthma and Tobacco Smoking. *J. Pers. Med.* 12, 1231. <https://doi.org/10.3390/jpm12081231>
- Benowitz, N.L., 2010. Nicotine Addiction. *N. Engl. J. Med.*
- Boers, E., Barrett, M., Su, J.G., Benjafield, A.V., Sinha, S., Kaye, L., Zar, H.J., Vuong, V., Tellez, D., Gondalia, R., Rice, M.B., Nunez, C.M., Wedzicha, J.A., Malhotra, A., 2023. Global Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Through 2050. *JAMA Netw. Open* 6, e2346598. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.46598>
- Brennan, K., Lea, R., Fitzmaurice, P., Truman, P., 2010. Review: Nicotinic receptors and stages of nicotine dependence. *J. Psychopharmacol. (Oxf.)* 24, 793–808. <https://doi.org/10.1177/0269881108100256>
- Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) · Inserm, La science pour la santé [WWW Document], 2020. . Inserm. URL <https://www.inserm.fr/dossier/bronchopneumopathie-chronique-obstructive-bpco/> (accessed 3.9.25).
- Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) [WWW Document], 2024. URL [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)) (accessed 3.9.25).
- Buchanan, N.D., Grimmer, J.A., Tanwar, V., Schwieterman, N., Mohler, P.J., Wold, L.E., 2020. Cardiovascular risk of electronic cigarettes: a review of preclinical and clinical studies. *Cardiovasc. Res.* 116, 40–50. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz256>
- Buettner-Schmidt, K., Steward, K., Goniewicz, M.L., Schaeffer Fraase, K., Orr, M., Miller, D.R., 2024. Development of a Flavor Ingredient Wheel Linking E-Liquid Additives to the Labeled Flavor of Vaping Products. *Toxics* 12, 372. <https://doi.org/10.3390/toxics12050372>
- Bupropion : substance active à effet thérapeutique [WWW Document], 2024. . VIDAL. URL <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/bupropion-21787.html> (accessed 3.17.25).
- Butler, K., Chenoweth, M.J., El-Boraie, A., Giratallah, H., Kowalczyk, W.J., Heishman, S.J., Tyndale, R.F., Le Foll, B., 2021. Impact of CYP2A6 Activity on Nicotine Reinforcement and Cue-Reactivity in Daily Smokers. *Nicotine Tob. Res.* 23, 1735–1743. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntab064>

- Cahill, K., Lindson-Hawley, N., Thomas, K.H., Fanshawe, T.R., Lancaster, T., 2016. Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016, CD006103. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006103.pub7>
- Cancer Today [WWW Document], 2024. URL <https://gco.iarc.who.int/today/> (accessed 3.19.25).
- Carey, L., Johnson, K., Villalba, J., Baqir, M., 2024. Vaping-associated constrictive bronchiolitis. *Respir. Med. Case Rep.* 51, 102062. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2024.102062>
- Cassady, S.J., Reed, R.M., 2019. Pulmonary Hypertension in COPD: A Case Study and Review of the Literature. *Medicina (Mex.)* 55, 432. <https://doi.org/10.3390/medicina55080432>
- Chaintreuil, P., Kerreneur, E., Bourgoin, M., Savy, C., Favreau, C., Robert, G., Jacquel, A., Auberger, P., 2023. The generation, activation, and polarization of monocyte-derived macrophages in human malignancies. *Front. Immunol.* 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1178337>
- Charlton, A., 2004. Medicinal uses of tobacco in history. *J. R. Soc. Med.* 97, 292–296.
- Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions [WWW Document], 2022. . Chemicalize. URL <https://chemicalize.com> (accessed 6.8.25).
- Chen, H., Li, G., Chan, Y.L., Chapman, D.G., Sukjamnong, S., Nguyen, T., Annissa, T., McGrath, K.C., Sharma, P., Oliver, B.G., 2018. Maternal E-Cigarette Exposure in Mice Alters DNA Methylation and Lung Cytokine Expression in Offspring. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 58, 366–377. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0206RC>
- Cheng, T., 2014. Chemical evaluation of electronic cigarettes. *Tob. Control* 23, ii11–ii17. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2013-051482>
- Chevalier, C., Nguyen, A., 2016. Composition et nocivité du tabac. *Actual. Pharm.* 55, 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2016.09.005>
- Christen, S.E., Hermann, L., Bekka, E., Vonwyl, C., Hammann, F., van der Velpen, V., Eap, C.B., Benowitz, N.L., Haschke, M., Liakoni, E., 2024. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Inhaled Nicotine Salt and Free-Base Using an E-cigarette: A Randomized Crossover Study. *Nicotine Tob. Res.* 26, 1313–1321. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntae074>
- Cirillo, S., Vivarelli, F., Turrini, E., Fimognari, C., Burattini, S., Falcieri, E., Rocchi, M.B.L., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M.T., Paolini, M., Canistro, D., 2019a. The Customizable E-cigarette Resistance Influences Toxicological Outcomes: Lung Degeneration, Inflammation, and Oxidative Stress-Induced in a Rat Model. *Toxicol. Sci.* 172, 132–145. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz176>
- Cirillo, S., Vivarelli, F., Turrini, E., Fimognari, C., Burattini, S., Falcieri, E., Rocchi, M.B.L., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M.T., Paolini, M., Canistro, D., 2019b. The Customizable E-cigarette Resistance Influences Toxicological Outcomes: Lung Degeneration, Inflammation, and Oxidative Stress-Induced in a Rat Model. *Toxicol. Sci.* 172, 132–145. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz176>

- Committee on the Review of the Health Effects of Electronic Nicotine Delivery Systems, Board on Population Health and Public Health Practice, Health and Medicine Division, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2018. Public Health Consequences of E-Cigarettes. National Academies Press, Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/24952>
- Czekala, L., Simms, L., Stevenson, M., Tschierske, N., Maione, A.G., Walele, T., 2019. Toxicological comparison of cigarette smoke and e-cigarette aerosol using a 3D in vitro human respiratory model. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 103, 314–324. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.01.036>
- De Groot, P., Munden, R.F., 2012. Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Radiol. Clin. North Am.* 50, 863–876. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2012.06.006>
- de las Casas-Engel, M., Corbí, A.L., 2014. Serotonin Modulation of Macrophage Polarization: Inflammation and Beyond, in: Camps, J. (Ed.), *Oxidative Stress and Inflammation in Non-Communicable Diseases - Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics*, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 89–115. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07320-0_9
- DeFranco, A.L., Robertson, M., Locksley, R.M., 2009. Immunité: la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. De Boeck, Bruxelles.
- Dépistage du cancer du poumon : la HAS recommande l'engagement d'un programme pilote [WWW Document], 2022. Haute Aut. Santé. URL https://www.has-sante.fr/jcms/p_3312901/fr/depistage-du-cancer-du-poumon-la-has-recommande-l-engagement-d-un-programme-pilote (accessed 6.2.25).
- Di Chiara, G., 2000. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *Eur. J. Pharmacol.* 393, 295–314. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00122-9)
- Dietrich, A., Steinritz, D., Gudermann, T., 2017. Transient receptor potential (TRP) channels as molecular targets in lung toxicology and associated diseases. *Cell Calcium* 67, 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.04.005>
- Dimic-Janjic, S., Hoda, M.A., Milenkovic, B., Kotur-Stevuljevic, J., Stjepanovic, M., Gompelmann, D., Jankovic, J., Miljkovic, M., Milin-Lazovic, J., Djurdjevic, N., Maric, D., Milivojevic, I., Popevic, S., 2023. The usefulness of MMP-9, TIMP-1 and MMP-9/TIMP-1 ratio for diagnosis and assessment of COPD severity. *Eur. J. Med. Res.* 28, 127. <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01094-7>
- Doll, R., Hill, A.B., 1950. Smoking and Carcinoma of the Lung. *Br. Med. J.* 2, 739–748.
- Dusautoir, R., Zarcone, G., Verrielle, M., Garçon, G., Fronval, I., Beauval, N., Allorge, D., Riffault, V., Locoge, N., Lo-Guidice, J.-M., Anthérieu, S., 2021. Comparison of the chemical composition of aerosols from heated tobacco products, electronic cigarettes and tobacco cigarettes and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *J. Hazard. Mater.* 401, 123417. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123417>

- Effah, F., Adragna, J., Luglio, D., Bailey, A., Marczylo, T., Gordon, T., 2023. Toxicological assessment of E-cigarette flavored E-liquids aerosols using Calu-3 cells: A 3D lung model approach. *Toxicology* 500, 153683. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153683>
- Effah, F., Taiwo, B., Baines, D., Bailey, A., Marczylo, T., 2022. Pulmonary effects of e-liquid flavors: a systematic review. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 25, 343–371. <https://doi.org/10.1080/10937404.2022.2124563>
- Ekanayake, V., Elkins, G.R., 2025. Systematic Review on Hypnotherapy and Smoking Cessation. *Int. J. Clin. Exp. Hypn.* 73, 4–78. <https://doi.org/10.1080/00207144.2024.2434082>
- Elje, E., Mariussen, E., McFadden, E., Dusinska, M., Rundén-Pran, E., 2023. Different Sensitivity of Advanced Bronchial and Alveolar Mono- and Coculture Models for Hazard Assessment of Nanomaterials. *Nanomaterials* 13, 407. <https://doi.org/10.3390/nano13030407>
- Ernst, S.M., Mankor, J.M., Riet, J. van, Thüsen, J.H. von der, Dubbink, H.J., Aerts, J.G.J.V., Langen, A.J. de, Smit, E.F., Dingemans, A.-M.C., Monkhorst, K., 2023. Tobacco Smoking-Related Mutational Signatures in Classifying Smoking-Associated and Nonsmoking-Associated NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* 18, 487–498. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.11.030>
- Erythropel, H.C., Jabba, S.V., DeWinter, T.M., Mendizabal, M., Anastas, P.T., Jordt, S.E., Zimmerman, J.B., 2018. Formation of flavorant–propylene Glycol Adducts With Novel Toxicological Properties in Chemically Unstable E-Cigarette Liquids. *Nicotine Tob. Res.* 21, 1248–1258. <https://doi.org/10.1093/ntr/nty192>
- FDA, C. for T., 2025. E-Cigarettes, Vapes, and other Electronic Nicotine Delivery Systems (ENDS). FDA.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombert, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., Bray, F., 2024. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Forrester, M.A., Wassall, H.J., Hall, L.S., Cao, H., Wilson, H.M., Barker, R.N., Vickers, M.A., 2018. Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell. Immunol.* 332, 58–76. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.008>
- Franchitto, N., Bloch, J., Solal, C., French PCC Research Group, Pélissier, F., 2024. Self-poisoning by E-cigarette and E-liquids: National Reports to French Poison Control Centers from July 2019 to December 2020: VIGilance and VAPE: The VIGIVAPE Study. *Nicotine Tob. Res.* 26, 281–288. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntad116>
- Freedman, N.D., Silverman, D.T., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., Abnet, C.C., 2011. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women.
- Gandhi, L., Rodríguez-Abreu, D., Gadgeel, S., Esteban, E., Felip, E., De Angelis, F., Domine, M., Clingan, P., Hochmair, M.J., Powell, S.F., Cheng, S.Y.-S., Bischoff, H.G., Peled, N., Grossi, F., Jennens, R.R., Reck, M., Hui, R., Garon, E.B., Boyer, M., Rubio-Viqueira, B., Novello, S.,

- Kurata, T., Gray, J.E., Vida, J., Wei, Z., Yang, J., Raftopoulos, H., Pietanza, M.C., Garassino, M.C., 2018. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 378, 2078–2092. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801005>
- Garcia-Arcos, I., Geraghty, P., Baumlin, N., Campos, M., Dabo, A.J., Jundi, B., Cummins, N., Eden, E., Grosche, A., Salathe, M., Foronjy, R., 2016. Chronic electronic cigarette exposure in mice induces features of COPD in a nicotine-dependent manner. *Thorax* 71, 1119–1129. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-208039>
- Gemine, R.E., Davies, G.R., Lanyon, K., Rees, S.E., Campbell, I., Lewis, K.E., 2023. Quitting smoking improves two-year survival after a diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 186, 107388. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2023.107388>
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., Michiels, C., 2015. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* 15. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1546-9>
- Gholap, V.V., Kosmider, L., Golshahi, L., Halquist, M.S., 2020. Nicotine forms: why and how do they matter in nicotine delivery from electronic cigarettes? *Expert Opin. Drug Deliv.* 17, 1727–1736. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1814736>
- Gilbert, H., 1965. U.S. Patent 3,200,819. Smokeless Non-Tobacco Cigarette.
- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2024. GLOBAL STRATEGY FOR THE DIAGNOSIS, MANAGEMENT, AND PREVENTION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (No. 2024 Report).
- Glynos, C., Bibli, S.-I., Katsaounou, P., Pavlidou, A., Magkou, C., Karavana, V., Topouzis, S., Kalomenidis, I., Zakynthinos, S., Papapetropoulos, A., 2018. Comparison of the effects of e-cigarette vapor with cigarette smoke on lung function and inflammation in mice. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 315, L662–L672. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00389.2017>
- Golpe, M.C., Ramil, M., Rodríguez, I., 2023. Comprehensive characterization of volatile and semi-volatile compounds in e-liquids for electronic cigarette using gas chromatography accurate mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1703, 464114. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464114>
- Gonzalez-Suarez, I., Marescotti, D., Martin, F., Scotti, E., Guedj, E., Acali, S., Dulize, R., Baumer, K., Peric, D., Frentzel, S., Ivanov, N.V., Hoeng, J., Peitsch, M.C., 2017. *In Vitro* Systems Toxicology Assessment of Nonflavored e-Cigarette Liquids in Primary Lung Epithelial Cells. *Appl. Vitro Toxicol.* 3, 41–55. <https://doi.org/10.1089/aivt.2016.0040>
- Goodman, J., 2005. Tobacco in History: The Cultures of Dependence. Taylor and Francis, Hoboken.
- Gosselink, I.F., Van Schooten, F.J., Drittij, M.J., Höppener, E.M., Leonhardt, P., Moschini, E., Serchi, T., Gutleb, A.C., Kooter, I.M., Remels, A.H., 2024. Assessing toxicity of amorphous

nanoplastics in airway- and lung epithelial cells using air-liquid interface models. *Chemosphere* 368, 143702. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143702>

- Gumus, Z.P., 2023. Assessment of Toxic Pyrrolizidine and Tropane Alkaloids in Herbal Teas and Culinary Herbs Using LC-Q-ToF/MS. *Foods* 12, 3572. <https://doi.org/10.3390/foods12193572>
- Guo, P., Li, R., Piao, T.H., Wang, C.L., Wu, X.L., Cai, H.Y., 2022. Pathological Mechanism and Targeted Drugs of COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 17, 1565–1575. <https://doi.org/10.2147/COPD.S366126>
- Ha, T.-A.N., Madison, M.C., Kheradmand, F., Altman, K.W., 2019. Laryngeal inflammatory response to smoke and vape in a murine model. *Am. J. Otolaryngol.* 40, 89–92. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2018.10.001>
- Hahn, J., Monakhova, Y.B., Hengen, J., Kohl-Himmelseher, M., Schüssler, J., Hahn, H., Kuballa, T., Lachenmeier, D.W., 2014. Electronic cigarettes: overview of chemical composition and exposure estimation. *Tob. Induc. Dis.* 12, 23. <https://doi.org/10.1186/s12971-014-0023-6>
- Hajek, P., Przulj, D., Phillips, A., Anderson, R., McRobbie, H., 2017. Nicotine delivery to users from cigarettes and from different types of e-cigarettes. *Psychopharmacology (Berl.)* 234, 773–779. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4512-6>
- Han, S.G., Sillé, F.Cm., Mihalic, J.N., Rule, A.M., 2023. The relationship between the use of electronic nicotine delivery systems (ENDS) and effects on pulmonary immune responses—a literature review. *Environ. Res.* 221, 115234. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115234>
- Harris, A.C., Tally, L., Muelken, P., Banal, A., Schmidt, C.E., Cao, Q., LeSage, M.G., 2015. Effects of nicotine and minor tobacco alkaloids on intracranial-self-stimulation in rats. *Drug Alcohol Depend.* 153, 330–334. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.06.005>
- Harvanko, A.M., Havel, C.M., Jacob, P., Benowitz, N.L., 2020. Characterization of Nicotine Salts in 23 Electronic Cigarette Refill Liquids. *Nicotine Tob. Res.* 22, 1239–1243. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntz232>
- Havermans, A., Krüsemann, E.J.Z., Pennings, J., De Graaf, K., Boesveldt, S., Talhout, R., 2021. Nearly 20 000 e-liquids and 250 unique flavour descriptions: an overview of the Dutch market based on information from manufacturers. *Tob. Control* 30, 57–62. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2019-055303>
- Health, N.C. for C.D.P. and H.P. (US) O. on S. and, 2016. Introduction, Conclusions, and Historical Background Relative to E-Cigarettes, in: *E-Cigarette Use Among Youth and Young Adults: A Report of the Surgeon General* [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention (US).
- Hermanns, M.I., Kasper, J., Dubruel, P., Pohl, C., Uboldi, C., Vermeersch, V., Fuchs, S., Unger, R.E., Kirkpatrick, C.J., 2010. An impaired alveolar-capillary barrier in vitro: effect of proinflammatory cytokines and consequences on nanocarrier interaction. *J. R. Soc. Interface* 7, S41–S54. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0288.focus>

- Herrington, J.S., Myers, C., 2015. Electronic cigarette solutions and resultant aerosol profiles. *J. Chromatogr. A* 1418, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.034>
- Hiemke, C., Stolp, M., Reuss, S., Wevers, A., Reinhardt, S., Maelicke, A., Schlegel, S., Schröder, H., 1996. Expression of alpha subunit genes of nicotinic acetylcholine receptors in human lymphocytes. *Neurosci. Lett.* 214, 171–174. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12908-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12908-6)
- Higham, A., 2019. The pathology of small airways disease in COPD: historical aspects and future directions.
- Higham, A., Rattray, N.J.W., Dewhurst, J.A., Trivedi, D.K., Fowler, S.J., Goodacre, R., Singh, D., 2016. Electronic cigarette exposure triggers neutrophil inflammatory responses. *Respir. Res.* 17, 56. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0368-x>
- Hill, C., 2010. Le point sur l'épidémie de cancer du poumon dû au tabagisme.
- Hinds, D.M., Nick, H.J., Vallin, T.M., Bloomquist, L.A., Christeson, S., Bratcher, P.E., Cooper, E.H., Brinton, J.T., Bosco-Lauth, A., White, C.W., 2022. Acute vaping in a golden Syrian hamster causes inflammatory response transcriptomic changes. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 323, L525–L535. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00162.2022>
- Hodge, S., Hodge, G., Ahern, J., Jersmann, H., Holmes, M., Reynolds, P.N., 2007. Smoking Alters Alveolar Macrophage Recognition and Phagocytic Ability: Implications in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37, 748–755. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0025OC>
- Hoffmann, D., Hoffmann, I., El-Bayoumy, K., 2001. The Less Harmful Cigarette: A Controversial Issue. A Tribute to Ernst L. Wynder. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 767–790. <https://doi.org/10.1021/tx000260u>
- Hon, L., 2004. CA Patent 2518174. A NON-SMOKABLE ELECTRONIC SPRAY CIGARETTE.
- Hsu, G., Sun, J.Y., Zhu, S.-H., 2018. Evolution of Electronic Cigarette Brands From 2013-2014 to 2016-2017: Analysis of Brand Websites. *J. Med. Internet Res.* 20, e80. <https://doi.org/10.2196/jmir.8550>
- Huang, W. min, Liang, Y.Q., Tang, L.J., Ding, Y., Wang, X.H., 2013. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Astragalus polysaccharide on EA.hy926 cells. *Exp. Ther. Med.* 6, 199–203. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1074>
- Hwang, J.H., Lyes, M., Sladewski, K., Enany, S., McEachern, E., Mathew, D.P., Das, S., Moshensky, A., Bapat, S., Pride, D.T., Ongkeko, W.M., Crotty Alexander, L.E., 2016. Electronic cigarette inhalation alters innate immunity and airway cytokines while increasing the virulence of colonizing bacteria. *J. Mol. Med.* 94, 667–679. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1378-3>
- Improgo, Ma.R.D., Scofield, M.D., Tapper, A.R., Gardner, P.D., 2010. The nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster: Dual role in nicotine addiction and lung cancer. *Prog. Neurobiol.* 92, 212–226. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.05.003>

- Institut National de Recherche et de Sécurité, 2023. Éthylène-glycol : Fiche toxicologique n°25 [WWW Document]. Base Données FICHES Toxicol. URL https://www.inrs.fr/dam/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_25-1.pdf
- Institut National de Recherche et de Sécurité, 2020. Propylène Glycol : Fiche toxicologique n°226 [WWW Document]. Base Données FICHES Toxicol. URL https://www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_226-2/FicheTox_226.pdf (accessed 4.1.25).
- Interdiction de vapoter (cigarette électronique) [WWW Document], 2025. URL <https://www.service-public.fr/particuliers/vosdroits/F35111> (accessed 3.25.25).
- Jabba, S.V., Diaz, A.N., Erythropel, H.C., Zimmerman, J.B., Jordt, S.-E., 2020. Chemical Adducts of Reactive Flavor Aldehydes Formed in E-Cigarette Liquids Are Cytotoxic and Inhibit Mitochondrial Function in Respiratory Epithelial Cells. *Nicotine Tob. Res.* 22, S25–S34. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntaa185>
- Jablonski, K.A., Amici, S.A., Webb, L.M., Ruiz-Rosado, J. de D., Popovich, P.G., Partida-Sanchez, S., Guerau-de-Arellano, M., 2015a. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS ONE* 10, e0145342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342>
- Jablonski, K.A., Amici, S.A., Webb, L.M., Ruiz-Rosado, J. de D., Popovich, P.G., Partida-Sanchez, S., Guerau-de-Arellano, M., 2015b. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342>
- Kavvalakis, M.P., Stivaktakis, P.D., Tzatzarakis, M.N., Kouretas, D., Liesivuori, J., Alegakis, A.K., Vynias, D., Tsatsakis, A.M., 2015. Multicomponent Analysis of Replacement Liquids of Electronic Cigarettes Using Chromatographic Techniques. *J. Anal. Toxicol.* 39, 262–269. <https://doi.org/10.1093/jat/bkv002>
- Kennedy, R.D., Awopegba, A., De León, E., Cohen, J.E., 2017. Global approaches to regulating electronic cigarettes. *Tob. Control* 26, 440–445. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2016-053179>
- Khudhur, Z.O., Smail, S.W., Awla, H.K., Ahmed, G.B., Khdhir, Y.O., Amin, K., Janson, C., 2025. The effects of heavy smoking on oxidative stress, inflammatory biomarkers, vascular dysfunction, and hematological indices. *Sci. Rep.* 15, 18251. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-03075-8>
- Kim, M.D., Chung, S., Baumlin, N., Sun, L., Silswal, N., Dennis, J.S., Yoshida, M., Sabater, J., Horrigan, F.T., Salathe, M., 2023. E-cigarette aerosols of propylene glycol impair BK channel activity and parameters of mucociliary function. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 324, L468–L479. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00157.2022>
- Kim, M.D., Chung, S., Dennis, J.S., Yoshida, M., Aguiar, C., Aller, S.P., Mendes, E.S., Schmid, A., Sabater, J., Baumlin, N., Salathe, M., 2022. Vegetable glycerin e-cigarette aerosols cause airway inflammation and ion channel dysfunction. *Front. Pharmacol.* 13, 1012723. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1012723>

- Kirsch, M., 2010. Génèse d'une épidémie. Lett. Collège Fr. 5–14. <https://doi.org/10.4000/lettre-cdf.278>
- Kondo, T., Nakano, Y., Adachi, S., Murohara, T., 2019. Effects of Tobacco Smoking on Cardiovascular Disease. *Circ. J.* 83, 1980–1985. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-19-0323>
- Krüsemann, E.J.Z., Boesveldt, S., de Graaf, K., Talhout, R., 2018. An E-Liquid Flavor Wheel: A Shared Vocabulary Based on Systematically Reviewing E-Liquid Flavor Classifications in Literature. *Nicotine Tob. Res.* 21, 1310–1319. <https://doi.org/10.1093/ntr/nty101>
- Krüsemann, E.J.Z., Havermans, A., Pennings, J.L.A., De Graaf, K., Boesveldt, S., Talhout, R., 2021. Comprehensive overview of common e-liquid ingredients and how they can be used to predict an e-liquid's flavour category. *Tob. Control* 30, 185–191. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2019-055447>
- Krüsemann, E.J.Z., Pennings, J.L.A., Cremers, J.W.J.M., Bakker, F., Boesveldt, S., Talhout, R., 2020. GC–MS analysis of e-cigarette refill solutions: A comparison of flavoring composition between flavor categories. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 188, 113364. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113364>
- Kubota, T., Nakajima-Taniguchi, C., Fukuda, T., Funamoto, M., Maeda, M., Tange, E., Ueki, R., Kawashima, K., Hara, H., Fujio, Y., Azuma, J., 2006. CYP2A6 polymorphisms are associated with nicotine dependence and influence withdrawal symptoms in smoking cessation. *Pharmacogenomics J.* 6, 115–119. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500348>
- Kulhánek, A., Baptistová, A., 2020. Chemical Composition of Electronic Cigarette e-Liquids: Overview of Current Evidence of Toxicity. *ADIKTOLOGIE J.* <https://doi.org/10.35198/01-2020-002-0007>
- Kuo, W.-T., Odenwald, M.A., Turner, J.R., Zuo, L., 2022. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1514, 21–33. <https://doi.org/10.1111/nyas.14798>
- Lai, L., Qiu, H., 2020. Biological toxicity of the compositions in electronic-cigarette on cardiovascular system. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 10.1007/s12265-020-10060-1. <https://doi.org/10.1007/s12265-020-10060-1>
- Larcombe, A.N., Janka, M.A., Mullins, B.J., Berry, L.J., Bredin, A., Franklin, P.J., 2017. The effects of electronic cigarette aerosol exposure on inflammation and lung function in mice. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 313, L67–L79. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00203.2016>
- Laroumagne, S., Salinas-Pineda, A., Hermant, C., Murriss, M., Gourraud, P.-A., Do, C., Segonds, C., Didier, A., Mazières, J., 2011. Incidence et caractéristiques des colonisations des voies respiratoires lors du diagnostic de cancer bronchique : étude rétrospective de 388 cas. *Rev. Mal. Respir.* 28, 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2010.05.020>
- Le Calvez, F., Mukeria, A., Hunt, J.D., Kelm, O., Hung, R.J., Tanière, P., Brennan, P., Boffetta, P., Zaridze, D.G., Hainaut, P., 2005. *TP53* and *KRAS* Mutation Load and Types in Lung Cancers

- in Relation to Tobacco Smoke: Distinct Patterns in Never, Former, and Current Smokers. *Cancer Res.* 65, 5076–5083. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0551>
- Le Houezec, J., 2003a. Pharmacologie de la nicotine et dépendance au tabac. *Med Hyg* 2452, 1845–1848.
- Le Houezec, J., 2003b. Pharmacologie de la nicotine et dépendance au tabac. *Rev. Médicale Suisse* 61, 1845–1848. <https://doi.org/10.53738/REVMED.2003.61.2452.1845>
- Le Nézet, O., Pasquereau, A., Guignard, R., Philippon, A., Nguyen-Thanh, V., Spilka, S., 2025. Tabagisme et vapotage parmi les 18-75 ans en 2023 (No. 168), *Tendances. OFTD*.
- Lechasseur, A., Jubinville, É., Routhier, J., Bérubé, J., Hamel-Auger, M., Talbot, M., Lamothe, J., Aubin, S., Paré, M., Beaulieu, M., Bossé, Y., Duchaine, C., Morissette, M.C., 2017. Exposure to electronic cigarette vapors affects pulmonary and systemic expression of circadian molecular clock genes. *Physiol. Rep.* 5, e13440. <https://doi.org/10.14814/phy2.13440>
- Lee, J., Mehta, K., Blick, M., Gutterman, J., Lopez-Berestein, G., 1987. Expression of c-fos, c-myc, and c-myc in human monocytes: correlation with monocytic differentiation. *Blood* 69, 1542–1545. <https://doi.org/10.1182/blood.v69.5.1542.1542>
- Lerner, C.A., Sundar, I.K., Yao, H., Gerloff, J., Ossip, D.J., McIntosh, S., Robinson, R., Rahman, I., 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. *PLOS ONE* 10, e0116732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116732>
- Les médicaments du sevrage tabagique [WWW Document], 2024. . VIDAL. URL <https://www.vidal.fr/maladies/psychisme/arreter-fumer-cigarette-tabac/medicaments.html> (accessed 3.16.25).
- Les traitements médicamenteux de la BPCO [WWW Document], 2020. . Haute Aut. Santé. URL https://www.has-sante.fr/jcms/p_3118949/fr/les-traitements-medicamenteux-de-la-bpco (accessed 6.6.25).
- Li, X., Lu, L., He, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Sheng, H., Chen, M., Ru, J., Gao, Y., 2023. Pharmacological effects of nicotine salts on dopamine release in the nucleus accumbens. *Front. Pharmacol.* 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1279512>
- Li, Y., Hecht, S.S., 2022. Carcinogenic Components of Tobacco and Tobacco Smoke: A 2022 Update. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 165, 113179. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113179>
- Li, Y., Papke, R.L., He, Y.-J., Millard, W.J., Meyer, E.M., 1999. Characterization of the neuroprotective and toxic effects of $\alpha 7$ nicotinic receptor activation in PC12 cells.
- Li, Y., Yan, B., He, S., 2023. Advances and challenges in the treatment of lung cancer. *Biomed. Pharmacother.* 169, 115891. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115891>

- Lindson, N., Thompson, T.P., Ferrey, A., Lambert, J.D., Aveyard, P., 2019. Motivational interviewing for smoking cessation. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2019. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006936.pub4>
- Lombard, É., Neuder, Y., 2025. LOI no 2025-175 du 24 février 2025 visant à interdire les dispositifs électroniques de vapotage à usage unique.
- Lugg, S.T., Scott, A., Parekh, D., Naidu, B., Thickett, D.R., 2022. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease. *Thorax* 77, 94–101. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-216296>
- Lung Cancer Survival Rates | 5-Year Survival Rates for Lung Cancer [WWW Document], 2024. URL <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html> (accessed 6.5.25).
- Ma, S., Qiu, Z., Yang, Q., Bridges, J.F.P., Chen, J., Shang, C., 2022. Expanding the E-Liquid Flavor Wheel: Classification of Emerging E-Liquid Flavors in Online Vape Shops. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 19, 13953. <https://doi.org/10.3390/ijerph192113953>
- Madison, M.C., Landers, C.T., Gu, B.-H., Chang, C.-Y., Tung, H.-Y., You, R., Hong, M.J., Baghaei, N., Song, L.-Z., Porter, P., Putluri, N., Salas, R., Gilbert, B.E., Levental, I., Campen, M.J., Corry, D.B., Kheradmand, F., 2019. Electronic cigarettes disrupt lung lipid homeostasis and innate immunity independent of nicotine. *J. Clin. Invest.* 129, 4290–4304. <https://doi.org/10.1172/JCI128531>
- Manganaris, G.A., Goulas, V., Vicente, A.R., Terry, L.A., 2014. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *J. Sci. Food Agric.* 94, 825–833. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6432>
- Manna, V.J., Dwyer, S., Pizutelli, V., Caradonna, S.J., 2024. Utilizing primary human airway mucociliary tissue cultures to model ramifications of chronic E-cigarette usage. *Toxicol. In Vitro* 94, 105725. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105725>
- Matsumoto, S., Traber, M.G., Leonard, S.W., Choi, J., Fang, X., Maishan, M., Wick, K.D., Jones, K.D., Calfee, C.S., Gotts, J.E., Matthay, M.A., 2022. Aerosolized vitamin E acetate causes oxidative injury in mice and in alveolar macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 322, L771–L783. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00482.2021>
- McLaughlin, I., Dani, J.A., De Biasi, M., 2015. Nicotine Withdrawal. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 24, 99–123. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13482-6_4
- Mihalak, K.B., Carroll, F.I., Luetje, C.W., 2006. Varenicline Is a Partial Agonist at $\alpha 4\beta 2$ and a Full Agonist at $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic Receptors. *Mol. Pharmacol.* 70, 801–805. <https://doi.org/10.1124/mol.106.025130>
- Mikołajczak, B., Fornal, E., Montowska, M., 2018. LC–Q–TOF–MS/MS Identification of Specific Non-Meat Proteins and Peptides in Beef Burgers. *Molecules* 24, 18. <https://doi.org/10.3390/molecules24010018>

- Morris, A.M., Leonard, S.S., Fowles, J.R., Boots, T.E., Mnatsakanova, A., Attfield, K.R., 2021. Effects of E-Cigarette Flavoring Chemicals on Human Macrophages and Bronchial Epithelial Cells. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 18, 11107. <https://doi.org/10.3390/ijerph182111107>
- Mottillo, S., Filion, K.B., Bélisle, P., Joseph, L., Gervais, A., O'Loughlin, J., Paradis, G., Pihl, R., Pilote, L., Rinfret, S., Tremblay, M., Eisenberg, M.J., 2009. Behavioural interventions for smoking cessation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. Heart J.* 30, 718–730. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn552>
- Munakata, S., Ishimori, K., Kitamura, N., Ishikawa, S., Takanami, Y., Ito, S., 2018. Oxidative stress responses in human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke and vapor from tobacco- and nicotine-containing products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 99, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.09.009>
- Muséum national d'Histoire naturelle, n.d. Tabac [WWW Document]. URL <https://www.mnhn.fr/fr/tabac> (accessed 1.2.25).
- Muthumalage, T., Prinz, M., Ansah, K.O., Gerloff, J., Sundar, I.K., Rahman, I., 2018. Inflammatory and Oxidative Responses Induced by Exposure to Commonly Used e-Cigarette Flavoring Chemicals and Flavored e-Liquids without Nicotine. *Front. Physiol.* 8, 1130. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01130>
- Nair, V., Tran, M., Behar, R.Z., Zhai, S., Cui, X., Phandthong, R., Wang, Y., Pan, S., Luo, W., Pankow, J.F., Volz, D.C., Talbot, P., 2020. Menthol in electronic cigarettes: A contributor to respiratory disease? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 407, 115238. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115238>
- National Center for Biotechnology Information, 2025a. PubChem Compound Summary for CID 1030, Propylene Glycol. [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propylene-Glycol> (accessed 4.1.25).
- National Center for Biotechnology Information, 2025b. PubChem Compound Summary for CID 753, Glycerin. [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/753> (accessed 5.7.25).
- National Center for Biotechnology Information, 2025c. PubChem Compound Summary for CID 174, Ethylene Glycol. [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/174> (accessed 5.19.25).
- National Center for Biotechnology Information, 2025d. PubChem Compound Summary for CID 6061, Methylhydrazine. [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6061> (accessed 7.20.25).
- National Center for Biotechnology Information, 2025e. PubChem Compound Summary for CID 542451, (2-Methoxyethyl)hydrazine. [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/542451> (accessed 7.20.25).

- National Center for Biotechnology Information, 2025f. PubChem Compound Summary for CID 11164, Glycidol. [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11164> (accessed 7.20.25).
- National Center for Biotechnology Information, 2025g. PubChem Compound Summary for CID 7762, Ethyl butyrate. [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7762> (accessed 7.18.25).
- National Center for Biotechnology Information, 2025h. PubChem Compound Summary for CID 31276, Isoamyl acetate. [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31276> (accessed 7.18.25).
- National Center for Biotechnology Information, 2025i. PubChem Compound Summary for CID 177, Acetaldehyde. [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/177> (accessed 7.18.25).
- Neczypor, E.W., Mears, M.J., Ghosh, A., Sassano, M.F., Gumina, R.J., Wold, L.E., Tarran, R., 2022. E-Cigarettes and Cardiopulmonary Health: Review for Clinicians. *Circulation* 145, 219–232. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056777>
- Nguyen, T., Li, G.E., Chen, H., Cranfield, C.G., McGrath, K.C., Gorrie, C.A., 2018. Maternal E-Cigarette Exposure Results in Cognitive and Epigenetic Alterations in Offspring in a Mouse Model. *Chem. Res. Toxicol.* 31, 601–611. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00084>
- Noël, J.-C., Ruzsanyi, V., Rainer, M., Bonn, G., 2019. Investigation of the evaporation behavior of aroma compounds in e-cigarettes. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 3029–3035. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01749-7>
- Observatoire français des drogues et des tendances addictives (OFDT), 2025. Drogues et addictions, chiffres clés 2025. Observatoire français des drogues et des tendances addictives (OFDT), Paris.
- Ogunwale, M.A., Li, M., Ramakrishnam Raju, M.V., Chen, Y., Nantz, M.H., Conklin, D.J., Fu, X.-A., 2017. Aldehyde Detection in Electronic Cigarette Aerosols. *ACS Omega* 2, 1207–1214. <https://doi.org/10.1021/acsomega.6b00489>
- Omaiye, E.E., Luo, W., McWhirter, K.J., Pankow, J.F., Talbot, P., 2022. Disposable Puff Bar Electronic Cigarettes: Chemical Composition and Toxicity of E-liquids and a Synthetic Coolant. *Chem. Res. Toxicol.* 35, 1344–1358. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00423>
- Omaiye, E.E., McWhirter, K.J., Luo, W., Pankow, J.F., Talbot, P., 2019. High-Nicotine Electronic Cigarette Products: Toxicity of JUUL Fluids and Aerosols Correlates Strongly with Nicotine and Some Flavor Chemical Concentrations. *Chem. Res. Toxicol.* 32, 1058–1069. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00381>

- Orekhov, A.N., Orekhova, V.A., Nikiforov, N.G., Myasoedova, V.A., Grechko, A.V., Romanenko, E.B., Zhang, D., Chistiakov, D.A., 2019. Monocyte differentiation and macrophage polarization. *Vessel Plus* 2019. <https://doi.org/10.20517/2574-1209.2019.04>
- Osann, K.E., Lowery, J.T., Schell, M.J., 2000. Small cell lung cancer in women: risk associated with smoking, prior respiratory disease, and occupation. *Lung Cancer* 28, 1–10. [https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(99\)00106-3](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(99)00106-3)
- Osorio-Valencia, S., Zhou, B., 2024. Roles of Macrophages and Endothelial Cells and Their Crosstalk in Acute Lung Injury. *Biomedicines* 12, 632. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12030632>
- Page, M.K., Goniewicz, M.L., 2021. New Analytical Method for Quantifying Flavoring Chemicals of Potential Respiratory Health Risk Concerns in e-Cigarette Liquids. *Front. Chem.* 9, 763940. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.763940>
- Pandey, N., Pal, S., Sharma, L.K., Guleria, R., Mohan, A., Srivastava, T., 2017. SNP rs16969968 as a Strong Predictor of Nicotine Dependence and Lung Cancer Risk in a North Indian Population. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 18, 3073–3079. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.11.3073>
- Parlement Européen et Conseil, 2014. Directive 2014/40/UE du Parlement Européen et du Conseil relative au rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres en matière de fabrication, de présentation et de vente des produits du tabac et des produits connexes, et abrogeant la directive 2001/37/CE.
- Parsons, A., Daley, A., Begh, R., Aveyard, P., 2010. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis. *BMJ* 340, b5569–b5569. <https://doi.org/10.1136/bmj.b5569>
- Pasquereau, A., 2021. Consommation de tabac parmi les adultes en 2020 : résultats du baromètre de santé publique france / tobacco use among adults in 2020: results from the santé publique france health barometer. *Journée mondiale sans tabac 2021*.
- Pasquereau, A., Andler, R., Guignard, R., Soullier, N., Beck, F., Nguyen-Thanh, V., 2023. Prévalence du tabagisme et du vapotage en France métropolitaine en 2022 parmi les 18-75 ans.
- Pasquereau, A., Guignard, R., Andler, R., Le Nézet, O., Spilka, S., Obradovic, I., Airagnes, G., Beck, F., Nguyen-Thanh, V., 2024. Prévalence du tabagisme en France hexagonale en 2023 parmi les 18-75 ans, résultats de l'édition 2023 de l'enquête EROPP de l'OFDT., *Le point sur. Santé publique France*, Saint-Maurice.
- Peiffer, G., Underner, M., Perriot, J., 2018. Les effets respiratoires du tabagisme. *Rev. Pneumol. Clin.* 74, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.pneumo.2018.04.009>
- Peiffer, G., Underner, M., Perriot, J., Ruppert, A.-M., Tiotiu, A., 2020. Sevrage tabagique et dépistage du cancer du poumon. *Rev. Mal. Respir.* 37, 722–734. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2020.09.005>

- Petrella, F., Faverio, P., Cara, A., Cassina, E.M., Libretti, L., Torto, S.L., Pirondini, E., Raveglia, F., Spinelli, F., Tuoro, A., Perger, E., Luppi, F., 2025. Clinical Impact of Vaping. *Toxics* 13, 470. <https://doi.org/10.3390/toxics13060470>
- Pfeifer, G.P., Denissenko, M.F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S.S., Hainaut, P., 2002. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21, 7435–7451. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205803>
- Poklis, J.L., Wolf, C.E., Peace, M.R., 2017. Ethanol Concentration in 56 Refillable Electronic Cigarettes Liquid Formulations Determined by Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (HS-GC-FID). *Drug Test. Anal.* 9, 1637–1640. <https://doi.org/10.1002/dta.2193>
- Quick, M.W., Lester, R.A.J., 2002. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J. Neurobiol.* 53, 457–478. <https://doi.org/10.1002/neu.10109>
- Raduka, A., Gao, N., Chatburn, R.L., Rezaee, F., 2023. Electronic cigarette exposure disrupts airway epithelial barrier function and exacerbates viral infection. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 325, L580–L593. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00135.2023>
- Ramoz, N., Gorwood, P., 2015. Les addictions sous l’angle de la génétique. *médecine/sciences* 31, 432–438. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153104018>
- Rantaša, M., Majer, D., Finšgar, M., 2025. A review of analytical techniques for the determination of e-liquid and electronic cigarette aerosol composition. *J. Chromatogr. A* 1748, 465859. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.465859>
- Ren, H., Birch, N.P., Suresh, V., 2016. An Optimised Human Cell Culture Model for Alveolar Epithelial Transport. *PLOS ONE* 11, e0165225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165225>
- Rey Brandariz, J., Rungay, H., Ayo-Yusuf, O., Edwards, R., Islami, F., Liu, S., Pérez-Ríos, M., Rodrigues Pinto Corrêa, P.C., Ruano-Ravina, A., Soerjomataram, I., 2024. Estimated impact of a tobacco-elimination strategy on lung-cancer mortality in 185 countries: a population-based birth-cohort simulation study. *Lancet Public Health* 9, e745–e754. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(24\)00185-3](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(24)00185-3)
- Rodgman, A., Perfetti, T.A., 2013. The chemical components of tobacco and tobacco smoke, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.
- Rodríguez-Martínez, Á., Ruano-Ravina, A., Torres-Durán, M., Vidal-García, I., Leiro-Fernández, V., Hernández-Hernández, J., García-García, S., Provencio, M., Castro-Añón, O., Parente-Lamelas, I., Abdulkader, I., Abal-Arca, J., Montero-Martínez, C., Amenedo, M., Guzmán-Taveras, R., Fernández-Villar, A., Barros-Dios, J.M., 2017. Small Cell Lung Cancer. Methodology and Preliminary Results of the SMALL CELL Study. *Arch. Bronconeumol. Engl. Ed.* 53, 675–681. <https://doi.org/10.1016/j.arbr.2017.10.011>

- Rouabhia, M., Piché, M., Corriveau, M.-N., Chakir, J., 2020. Effect of e-cigarettes on nasal epithelial cell growth, Ki67 expression, and pro-inflammatory cytokine secretion. *Am. J. Otolaryngol.* 41, 102686. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2020.102686>
- Routine Analytical Machine for E-Cigarette Aerosol Generation and Collection - Definitions and Standard Conditions | CORESTA [WWW Document], 2015. URL <https://www.coresta.org/routine-analytical-machine-e-cigarette-aerosol-generation-and-collection-definitions-and-standard> (accessed 7.7.25).
- Rudin, C.M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., Sage, J., 2021. Small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* 7, 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0>
- Rüther, T., Hagedorn, D., Schiela, K., Schettgen, T., Osiander-Fuchs, H., Schober, W., 2018. Nicotine delivery efficiency of first- and second-generation e-cigarettes and its impact on relief of craving during the acute phase of use. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 221, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.012>
- Sabnis, A.S., Shadid, M., Yost, G.S., Reilly, C.A., 2008. Human Lung Epithelial Cells Express a Functional Cold-Sensing TRPM8 Variant. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39, 466–474. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0440OC>
- Sabo, A.-N., Filaudeau, E., Da Silva, S., Becker, G., Monassier, L., Kemmel, V., 2023. Flavoured and nicotine-containing e-liquids impair homeostatic properties of an alveolar-capillary cell model. *Food Chem. Toxicol.* 174, 113650. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113650>
- Sachdeva, J., Karunanathan, A., Shi, J., Dai, W., Kleinman, M.T., Herman, D., Kloner, R.A., 2023. Flavoring Agents in E-cigarette Liquids: A Comprehensive Analysis of Multiple Health Risks. *Cureus* 15, e48995. <https://doi.org/10.7759/cureus.48995>
- Saffari, A., Daher, N., Ruprecht, A., De Marco, C., Pozzi, P., Boffi, R., Hamad, S.H., Shafer, M.M., Schauer, J.J., Westerdahl, D., Sioutas, C., 2014. Particulate metals and organic compounds from electronic and tobacco-containing cigarettes: comparison of emission rates and secondhand exposure. *Env. Sci. Process. Impacts* 16, 2259–2267. <https://doi.org/10.1039/C4EM00415A>
- Salomon, J.J., Muchitsch, V.E., Gausterer, J.C., Schwagerus, E., Huwer, H., Daum, N., Lehr, C.-M., Ehrhardt, C., 2014. The Cell Line NCI-H441 Is a Useful *in Vitro* Model for Transport Studies of Human Distal Lung Epithelial Barrier. *Mol. Pharm.* 11, 995–1006. <https://doi.org/10.1021/mp4006535>
- Schmidt, H.D., Rupprecht, L.E., Addy, N.A., 2019. Neurobiological and Neurophysiological Mechanisms Underlying Nicotine Seeking and Smoking Relapse. *Mol. Neuropsychiatry* 4, 169–189. <https://doi.org/10.1159/000494799>
- Shah, N.H., Noe, M.R., Agnew-Heard, K.A., Pithawalla, Y.B., Gardner, W.P., Chakraborty, S., McCutcheon, N., Grisevich, H., Hurst, T.J., Morton, M.J., Melvin, M.S., Miller IV, J.H., 2021. Non-Targeted Analysis Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Evaluation of

- Chemical Composition of E-Vapor Products. *Front. Chem.* 9, 742854. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.742854>
- Shao, B.-Z., Ke, P., Xu, Z.-Q., Wei, W., Cheng, M.-H., Han, B.-Z., Chen, X.-W., Su, D.-F., Liu, C., 2017. Autophagy Plays an Important Role in Anti-inflammatory Mechanisms Stimulated by Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Front. Immunol.* 8, 553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00553>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., Sahebkar, A., 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Sheikh, M., Mukeriya, A., Shangina, O., Brennan, P., Zaridze, D., 2021. Postdiagnosis Smoking Cessation and Reduced Risk for Lung Cancer Progression and Mortality: A Prospective Cohort Study. *Ann. Intern. Med.* 174, 1232–1239. <https://doi.org/10.7326/M21-0252>
- Sherafat, Y., Bautista, M., Fowler, C.D., 2021. Multidimensional Intersection of Nicotine, Gene Expression, and Behavior. *Front. Behav. Neurosci.* 15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.649129>
- Shi, S., Liang, D., Bao, M., Xie, Y., Xu, W., Wang, L., Wang, Z., Qiao, Z., 2016. Gx-50 Inhibits Neuroinflammation via $\alpha 7$ nAChR Activation of the JAK2/STAT3 and PI3K/AKT Pathways. *J. Alzheimers Dis.* 50, 859–871. <https://doi.org/10.3233/JAD-150963>
- Sleiman, M., Logue, J.M., Montesinos, V.N., Russell, M.L., Litter, M.I., Gundel, L.A., Destailats, H., 2016. Emissions from Electronic Cigarettes: Key Parameters Affecting the Release of Harmful Chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 50, 9644–9651. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01741>
- Smith, E.A., Malone, R.E., 2009. “Everywhere the Soldier Will Be”: Wartime Tobacco Promotion in the US Military. *Am. J. Public Health* 99, 1595–1602. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2008.152983>
- Song, J.-S., Cho, K.-S., Yoon, H.-K., Moon, H.-S., Park, S.-H., 2005. Neutrophil Elastase Causes MUC5AC Mucin Synthesis Via EGF Receptor, ERK and NF- κ B Pathways in A549 Cells. *Korean J. Intern. Med.* 20, 275. <https://doi.org/10.3904/kjim.2005.20.4.275>
- Soulet, S., Duquesne, M., Toutain, J., Pairaud, C., Lalo, H., 2019. Experimental Method of Emission Generation Calibration Based on Reference Liquids Characterization. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 2262. <https://doi.org/10.3390/ijerph16132262>
- Stewart, G.G., 1967. A history of the medicinal use of tobacco 1492-1860. *Med. Hist.* 11, 228–268.
- Tabagisme, conséquences sur la santé - Santé publique France [WWW Document], 2023. URL <https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/tabac/quelles-sont-les-consequences-du-tabagisme-sur-la-sante> (accessed 3.10.25).

- Takashiba, S., Van Dyke, T.E., Amar, S., Murayama, Y., Soskolne, A.W., Shapira, L., 1999. Differentiation of Monocytes to Macrophages Primes Cells for Lipopolysaccharide Stimulation via Accumulation of Cytoplasmic Nuclear Factor κ B. *Infect. Immun.* 67, 5573–5578. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.11.5573-5578.1999>
- Talhout, R., Leventhal, A.M., 2024. Coolants, organic acids, flavourings and other additives that facilitate inhalation of tobacco and nicotine products: implications for regulation. *Tob. Control* tc-2024-058738. <https://doi.org/10.1136/tc-2024-058738>
- Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P., Changeux, J.-P., 2009. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 733–750. <https://doi.org/10.1038/nrd2927>
- Tantucci, C., Modina, D., 2012. Lung function decline in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 7, 95–99. <https://doi.org/10.2147/COPD.S27480>
- Tehrani, M.W., Newmeyer, M.N., Rule, A.M., Prasse, C., 2021. Characterizing the Chemical Landscape in Commercial E-Cigarette Liquids and Aerosols by Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 34, 2216–2226. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00253>
- Thandra, K.C., Barsouk, Adam, Saginala, K., Aluru, J.S., Barsouk, Alexander, 2021a. Epidemiology of lung cancer. *Contemp. Oncol.* 25, 45–52. <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>
- Thandra, K.C., Barsouk, Adam, Saginala, K., Aluru, J.S., Barsouk, Alexander, 2021b. Epidemiology of lung cancer. *Contemp. Oncol.* 25, 45–52. <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>
- Thermal Desorption – Clarus GC with TurboMatrix ATD: SIMPLIFY AND SPEED ANALYSIS Complete, Fully Integrated, World-Class GC Solutions [WWW Document], n.d. . Envirotech Online. URL <https://www.envirotech-online.com/news/environmental-laboratory/7/perkinelmer/thermal-desorption-ndash-clarus-gc-with-turbomatrix-atd-simplify-and-speed-analysis-complete-fully-integrated-world-class-gc-solutions/43261> (accessed 7.4.25).
- Tierney, P.A., Karpinski, C.D., Brown, J.E., Luo, W., Pankow, J.F., 2016. Flavour chemicals in electronic cigarette fluids. *Tob. Control* 25, e10–e15. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2014-052175>
- Tran, L.N., Rao, G., Robertson, N.E., Hunsaker, H.C., Chiu, E.Y., Poulin, B.A., Madl, A.K., Pinkerton, K.E., Britt, R.D., Nguyen, T.B., 2024. Quantification of Free Radicals from Vaping Electronic Cigarettes Containing Nicotine Salt Solutions with Different Organic Acid Types and Concentrations. *Chem. Res. Toxicol.* 37, 991–999. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.4c00065>
- United States Surgeon General, 2014. The Health Consequences of Smoking -- 50 Years of progress: A Report of the Surgeon General: (510072014-001). <https://doi.org/10.1037/e510072014-001>

- Valentine, G., Sofuoglu, M., 2018. Cognitive Effects of Nicotine: Recent Progress. *Curr. Neuropharmacol.* 16, 403–414. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666171103152136>
- Vallés, A.S., Barrantes, F.J., 2023. Nicotinic Acetylcholine Receptor Dysfunction in Addiction and in Some Neurodegenerative and Neuropsychiatric Diseases. *Cells* 12, 2051. <https://doi.org/10.3390/cells12162051>
- Van Itallie, C.M., Anderson, J.M., 2017. Phosphorylation of tight junction transmembrane proteins: Many sites, much to do. *Tissue Barriers* 6, e1382671. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1382671>
- Vivarelli, F., Canistro, D., Cirillo, S., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M.T., Paolini, M., 2019. Impairment of testicular function in electronic cigarette (e-cig, e-cigs) exposed rats under low-voltage and nicotine-free conditions. *Life Sci.* 228, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.059>
- Wall, A., Roslin, S., Borg, B., McDermott, S., Walele, T., Nahde, T., O'Connell, G., Thompson, J., Lubberink, M., Antoni, G., 2022. E-Cigarette Aerosol Deposition and Disposition of [11C]Nicotine Using Positron Emission Tomography: A Comparison of Nicotine Uptake in Lungs and Brain Using Two Different Nicotine Formulations. *Pharmaceuticals* 15, 367. <https://doi.org/10.3390/ph15030367>
- Wang, Q., Lucas, J.H., Pang, C., Zhao, R., Rahman, I., 2023. Tobacco and Menthol flavored electronic cigarettes induced inflammation and dysregulated repair in lung fibroblast and epithelium. *Res. Sq.* rs.3.rs-3037297. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3037297/v1>
- Wang, Y., Adamcakova-Dodd, A., Steines, B.R., Jing, X., Salem, A.K., Thorne, P.S., 2020. Comparison of in vitro toxicity of aerosolized engineered nanomaterials using air-liquid interface mono-culture and co-culture models. *NanoImpact* 18, 100215. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100215>
- Wang, Y., Wu, Q., Ren, B., Muskhelishvili, L., Davis, K., Wynne, R., Rua, D., Cao, X., 2022. Subacute Pulmonary Toxicity of Glutaraldehyde Aerosols in a Human In Vitro Airway Tissue Model. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 12118. <https://doi.org/10.3390/ijms232012118>
- Ween, M.P., Whittall, J.J., Hamon, R., Reynolds, P.N., Hodge, S.J., 2017. Phagocytosis and Inflammation: Exploring the effects of the components of E-cigarette vapor on macrophages. *Physiol. Rep.* 5, e13370. <https://doi.org/10.14814/phy2.13370>
- Williams, M., Bozhilov, K.N., Talbot, P., 2019. Analysis of the Elements and Metals in Multiple Generations of Electronic Cigarette Atomizers. *Environ. Res.* 175, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.05.014>
- Wittenberg, R.E., Wolfman, S.L., De Biasi, M., Dani, J.A., 2020. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotine Addiction: A Brief Introduction. *Neuropharmacology* 177, 108256. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108256>

- Wojdyło, A., Nowicka, P., Carbonell-Barrachina, Á.A., Hernández, F., 2016. Phenolic compounds, antioxidant and antidiabetic activity of different cultivars of *Ficus carica* L. fruits. *J. Funct. Foods* 25, 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.015>
- Wooltorton, J.R.A., Pidoplichko, V.I., Broide, R.S., Dani, J.A., 2003. Differential Desensitization and Distribution of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes in Midbrain Dopamine Areas. *J. Neurosci.* 23, 3176–3185. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03176.2003>
- World Health Organization, 2024. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000–2030. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization, 2023a. Tabac [WWW Document]. URL <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/tobacco> (accessed 2.26.25).
- World Health Organization, 2023b. WHO report on the global tobacco epidemic, 2023: protect people from tobacco smoke. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization, 2023c. Cancer du poumon [WWW Document]. URL <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer> (accessed 3.19.25).
- World Health Organization, 2023d. WHO report on the global tobacco epidemic, 2023: protect people from tobacco smoke. Geneva.
- Wu, Q., Jiang, D., Minor, M., Chu, H.W., 2014. Electronic Cigarette Liquid Increases Inflammation and Virus Infection in Primary Human Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE* 9, e108342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108342>
- Wynder, E.L., Graham, E.A., 1950. TOBACCO SMOKING AS A POSSIBLE ETIOLOGIC FACTOR IN BRONCHIOGENIC CARCINOMA.
- Xie, W., Kathuria, H., Galiatsatos, P., Blaha, M.J., Hamburg, N.M., Robertson, R.M., Bhatnagar, A., Benjamin, E.J., Stokes, A.C., 2020. Association of Electronic Cigarette Use With Incident Respiratory Conditions Among US Adults From 2013 to 2018. *JAMA Netw. Open* 3, e2020816. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.20816>
- Xu, Z.-Q., Zhang, W.-J., Su, D.-F., Zhang, G.-Q., Miao, C.-Y., 2021. Cellular responses and functions of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation in the brain: a narrative review. *Ann. Transl. Med.* 9, 509. <https://doi.org/10.21037/atm-21-273>
- Yan, Q., Gao, C., Li, M., Lan, R., Wei, S., Fan, R., Cheng, W., 2024. TRP Ion Channels in Immune Cells and Their Implications for Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms25052719>
- Yang, P., 2002. Adenocarcinoma of the Lung Is Strongly Associated with Cigarette Smoking: Further Evidence from a Prospective Study of Women. *Am. J. Epidemiol.* 156, 1114–1122. <https://doi.org/10.1093/aje/kwf153>

- Yang, Z., Ming, X.-F., 2014. Functions of Arginase Isoforms in Macrophage Inflammatory Responses: Impact on Cardiovascular Diseases and Metabolic Disorders. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00533>
- Yanina, I.Yu., Genin, V.D., Genina, E.A., Mudrak, D.A., Navolokin, N.A., Bucharskaya, A.B., Kistenev, Y.V., Tuchin, V.V., 2023. Multimodal Diagnostics of Changes in Rat Lungs after Vaping. *Diagnostics* 13, 3340. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13213340>
- Yin, C., Cai, J., Gou, Y., Li, D., Tang, H., Wang, L., Liu, H., Luo, B., 2023. Dynamic changes in human THP-1-derived M1-to-M2 macrophage polarization during *Thelazia callipaeda* MIF induction. *Front. Immunol.* 13, 1078880. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1078880>
- Yoshida, K., Gowers, K.H., Lee-Six, H., Chandrasekharan, D.P., Coorens, T., Maughan, E.F., Beal, K., Menzies, A., Millar, F.R., Anderson, E., Clarke, S.E., Pennycuik, A., Thakrar, R.M., Butler, C.R., Kakiuchi, N., Hirano, T., Hynds, R.E., Stratton, M.R., Martincorena, I., Janes, S.M., Campbell, P.J., 2020. Tobacco exposure and somatic mutations in normal human bronchial epithelium. *Nature* 578, 266–272. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1961-1>
- Zajac, E., Schweighofer, B., Kupriyanova, T.A., Juncker-Jensen, A., Minder, P., Quigley, J.P., Deryugina, E.I., 2013. Angiogenic capacity of M1- and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9. *Blood* 122, 4054–4067. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501494>
- Zarcone, G., Lenski, M., Martinez, T., Talahari, S., Simonin, O., Garçon, G., Allorge, D., Nesslany, F., Lo-Guidice, J.-M., Platel, A., Anthérieu, S., 2023. Impact of Electronic Cigarettes, Heated Tobacco Products and Conventional Cigarettes on the Generation of Oxidative Stress and Genetic and Epigenetic Lesions in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells. *Toxics* 11, 847. <https://doi.org/10.3390/toxics11100847>
- Zelikoff, J.T., Parmalee, N.L., Corbett, K., Gordon, T., Klein, C.B., Aschner, M., 2018. Microglia Activation and Gene Expression Alteration of Neurotrophins in the Hippocampus Following Early-Life Exposure to E-Cigarette Aerosols in a Murine Model. *Toxicol. Sci.* 162, 276–286. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx257>
- Zhang, F., Bartels, M.J., LeBaron, M.J., Schisler, M.R., Gollapudi, B.B., Moore, N.P., 2015. A novel approach for concurrent quantitation of glutathione, glutathione disulfide, and 2-hydroxyethylated glutathione in lungs of mice exposed to ethylene oxide, using liquid chromatography–positive electrospray tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 29, 1364–1374. <https://doi.org/10.1002/bmc.3432>
- Zhang, G., Zhang, H., Liu, Y., He, Y., Wang, W., Du, Y., Yang, C., Gao, F., 2014. CD44 clustering is involved in monocyte differentiation. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 46, 540–547. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmu042>
- Zhang, M., Liu, K., Zhang, Q., Xu, J., Liu, J., Lin, H., Lin, B., Zhu, M., Li, M., 2023. Alpha fetoprotein promotes polarization of macrophages towards M2-like phenotype and inhibits

macrophages to phagocytize hepatoma cells. *Front. Immunol.* 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1081572>

Zhang, W.-Z., Venardos, K., Chin-Dusting, J., Kaye, D.M., 2006. Adverse Effects of Cigarette Smoke on NO Bioavailability: Role of Arginine Metabolism and Oxidative Stress. *Hypertension* 48, 278–285. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000231509.27406.42>

Zhu, S.-H., Melcer, T., Sun, J., Rosbrook, B., Pierce, J.P., 2000. Smoking cessation with and without assistance. *Am. J. Prev. Med.* 18, 305–311. [https://doi.org/10.1016/S0749-3797\(00\)00124-0](https://doi.org/10.1016/S0749-3797(00)00124-0)

Zoli, M., Pistillo, F., Gotti, C., 2015. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* 96, 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.003>

Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., Gotti, C., 2018. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr. Neuropharmacol.* 16, 338–349. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170912110450>

Zwar, N.A., 2020. Smoking cessation. *Aust. J. Gen. Pract.* 49, 474–481. <https://doi.org/10.31128/AJGP-03-20-5287>



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

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,c}

^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

^b Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67200, Strasbourg, France

^c Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Pôle Pharmacie-Pharmacologie, 67200, France

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Bryan Delaney

Keywords:

E-cigarettes
Alveolar-capillary barrier
Oxidative stress
Inflammation
Barrier disruption
Cell death

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 coil 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.

1. Introduction

It is now well established that tobacco smoke has serious effects on the respiratory health status of users and represents the main etiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). This pathology described by the Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD, 2017) as a persistent airflow limitation in the airways, is associated with a chronic inflammatory response of the airways and a degradation of lung function (<https://goldcopd.org>). The pathophysiological mechanism of COPD, even if not yet fully elucidated, involves mediators of oxidative stress (reactive oxygen species or ROS, such as the superoxide anion and the hydroxyl radical) and inflammation (cytokines, chemokines) (Rahman, 2006; Taylor, 2010). The oxidant burden in the lungs due to smoke toxicants is enhanced by the release of

ROS from macrophages and neutrophils, with the increased migration of these cells in the lungs of smokers observed as a response to chemokine signalling (Wang et al., 2018).

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

* Corresponding author. 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.

E-mail addresses: amelia-naomi.sabo@chru-strasbourg.fr (A.-N. Sabo), emma.filaudeau@etu.unistra.fr (E. Filaudeau), sylvia.dasilva@unistra.fr (S. Da Silva), guillaume.becker@chru-strasbourg.fr (G. Becker), laurent.monassier@unistra.fr (L. Monassier), kemmel@unistra.fr, veronique.kemmel@chru-strasbourg.fr (V. Kemmel).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113650>

Received 29 August 2022; Received in revised form 26 January 2023; Accepted 1 February 2023

Available online 8 February 2023

0278-6915/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

addition of these flavours gives a pleasant taste to the e-liquid consumption.

However, a growing body of evidence points to e-cigarettes cytotoxicity. Wattage and voltage settings influence the generation of hazardous components through heating and transformation of the e-liquid (formaldehyde, acrolein and free radical generation) (Bitzer et al., 2019) or through decomposition of the metallic systems (copper, lead, and nickel) (Olmedo et al., 2701). Although most of the components of e-liquids are food additives considered safe, their safety for inhalation has not yet been confirmed. In addition, e-liquids contain a wide variety of flavours in different PG/VG ratios, with or without nicotine at different concentrations, making e-liquids the most variable element of e-cigarettes. Exposure to e-cigarettes has been shown to trigger cellular markers of oxidative stress, inflammation and cell death (Chen et al., 2020; Iskandar et al., 2016; Wang et al., 2021). Therefore, the question of the involvement of the main components of e-liquids in the development of lung diseases such as COPD remains open.

The literature contains multiple cell models for toxicological studies of conventional and electronic cigarettes on the bronchial region of the airways (Morris et al., 2021). However, it has been shown that e-cigarette aerosol particles, like those from conventional cigarettes, predominantly reach the alveolar region of the lung (Son et al., 2020), making *in vitro* models of the alveolar-capillary barrier essential for comparing their tissue toxicities. The first *in vitro* models of this barrier were published in the 2000s (Birkness et al., 1999). Since then, other multicellular models, including cells with a structural role or inflammatory cells, have been developed and have been used to study the effect of certain xenobiotics or particles on the alveolar-capillary barrier (Lehmann et al., 2011). To our knowledge, few multicellular models mimicking this air-blood interface have been used to explore the effect of electronic cigarettes (Ganguly et al., 2020).

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

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

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

RPMI-1640 medium (#21875091), MCDB131 medium (#10372019), penicillin-streptomycin (#15140122), glutamine (#25030024), fetal bovine serum (#10270106), TRIzol® reagent (#15596018), MitoSOX Red® (#M36008) and mouse occludin antibody (#33-1500) were purchased by Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France). Human EGF (#E9644), hydrocortisone (#H0888), secondary antibodies conjugated with goat anti-rabbit Alexa fluor-488 (#AP132JA4) were ordered from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Heparin was ordered from Panpharma (La Selle-en-Luitré, France). The iScript™ cDNA Synthesis Kit (#1708891BUN), the SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (#1725274) and all mRNA primers were obtained from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). The goat serum (#S2000-100) was ordered from Dutscher (Bernolsheim, France). The MTS assay (#ab197010), CD31 (#ab28364), Bax (#ab32503), Bcl-2 (#ab182858), LC3B (#ab192890) and rabbit occludin (#ab216327) antibodies, secondary antibodies goat anti-mouse conjugated with Alexa fluor-647 (#ab150115) and DAPI

(#ab104139), were ordered from Abcam (Cambridge, UK). The horseradish peroxidase (HRP) substrate Luminata™ (#WBLUC0500) was from Merck Millipore (Molsheim, France). PG, VG, and marketed e-liquids were obtained from Gaiatrend® (Rohrbach-lès-Bitche, France). PG and VG meet USP testing specifications.

2.2. Cell culture

2.2.1. Cell lines

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

2.2.2. Co-culture of the epithelial cells with the endothelial cells

2.2.2.1. Co-culture steps. The different steps needed to obtain the alveolar-capillary barrier construction were represented in Fig. 1. The first day, HULEC-5a (5×10^4 cells/30 µL of usually used MCDB131 medium) were placed on the lower surface of inverted translucent inserts for 24-well plates in polyethylene terephthalate (PET) with 0.4 mm pore size and 10^8 pores/cm² membrane (Sarstedt, Germany) and incubated for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. The inserts were then inverted and placed in 24-well plates filled with 0.8 mL HULEC-5a medium per well. A 0.2 mL volume of the same medium was placed in the upper compartment. After 48 h, NCI-H441 alveolar epithelial cells were added on the apical side of the insert (5×10^4 cells/well in 200 µL). The culture medium from day 2 was MCDB131 medium usually used for HULEC-5a culture but enriched with heparin (25 µg/mL) (named “optimal medium” in Fig. 1). The two cell lines grew to confluence simultaneously over 12 days and fresh medium was replaced every second day for further experiments.

2.2.2.2. Functional and phenotype characterisation of the co-culture model

2.2.2.2.1. Functional role characterised by measuring Trypan blue kinetics across the barrier. To test barrier permeability to a colorimetric marker of known molecular weight (Trypan Blue, MW = 873 g/mol ≈ 0.9 kDa), at different culture times (day 4, day 7 and day 9), 200 µL of a 1/16th diluted Trypan blue solution was deposited on the apical side of the cell insert, either cells in monoculture (NCI-H441 or HULEC-5a), cells in co-culture on each side of the insert, or on inserts without cells that serve as a negative control corresponding to the absence of cell barrier (Supplementary Data 1A). Trypan blue passage kinetics were performed by taking 100 µL of basolateral medium at different times (0, 15, 30, 60, 120 and 240 min). The 100 µL collected were placed in a 96-well plate and the absorbance of the wells was read spectrophotometrically at a wavelength of 490 nm (Supplementary Data 1B). The faster Trypan blue passed from the apical to the basolateral compartment, the more permeable and therefore dysfunctional the cell barrier was.

2.2.2.2.3. Functional role characterised by measuring trans-epithelial endothelial resistance. Trans-Epithelial/Endothelial Resistance (TEER), indicating the paracellular permeability of a solute across the NCI-H441/HULEC-5a co-culture, was measured with standard STX2 electrodes connected to the Evom2® epithelial ohmmeter (World Precision Instruments, Hitchin, UK). Unlike the Trypan blue colorimetric method, this method is non-invasive with the advantage of being in real-time. TEER of inserts with NCI-H441 monolayer placed in the upper compartment or HULEC-5a monolayer placed in the lower membrane was also measured.

Two alternative co-cultured cell arrangements were tested: first,

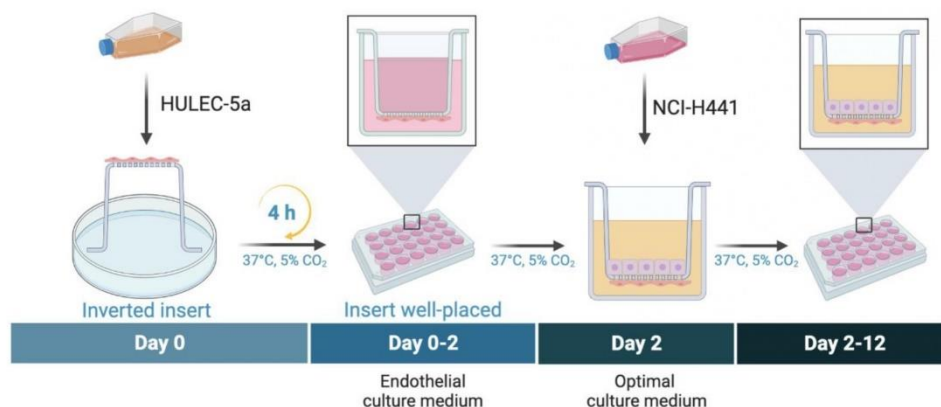


Fig. 1. Steps to build the alveolar-capillary barrier model. The co-culture model involves NCI-H441 as alveolar epithelial cells (seeded at 5×10^4 cells/well) and HULEC-5a as pulmonary endothelial cells (seeded at 5×10^4 cells/well) on a 24-well plate insert.

HULEC-5a cells were placed at the bottom of the 24-well plate and second, HULEC-5a cells were seeded in the same compartment as NCI-H441 cells.

TEER values for an insert without cells (blank) were subtracted from the TEER values measured with co-cultures, NCI-H441 and HULEC-5a monolayers. The result was multiplied by the total membrane surface area (0.3 cm^2) to obtain the resistance value in $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Measurements were performed daily for 12 days.

2.2.2.4. Phenotype characterisation of the co-culture model

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

2.2.2.4.2. Western blot. Proteins were extracted from cells with the lysis buffer supplemented with phosphatase and protease inhibitors and denatured using a solution containing β -mercaptoethanol (5 min at 95°C). Samples containing 20 μg of proteins were then separated using SDS-PAGE (10%) and transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane using a Trans-blot Turbo system. One hour incubation in a non-fat milk powder solution (10% in phosphate buffered saline (PBS) with 0.1% Tween 20 detergent) blocked non-specific sites. Then, the membranes were incubated overnight with the primary antibody specific for the target being tested (diluted according to the supplier's recommendations, usually 1:1000). The next day, the membranes were washed and incubated with the secondary antibody (diluted 1:10,000) conjugated to a horseradish peroxidase (HRP) for 1 h at room temperature. Revealing the bands of interest was done by chemiluminescence after 3 min incubation with the HRP substrate Luminata™, using the ChemiDoc XRS + detection system (Bio-Rad). The quantification of band intensity was performed by Image Lab™ 6.0 Software (Bio-Rad) relative to total protein in each lane revealed by stain-free method.

2.2.2.4.3. Immunostaining. On day 3, 5 and 8 of co-culture on transparent 24-well inserts, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Cells were permeabilized with Triton X-100 (0.3%) and non-specific sites blocked with 5% goat serum in PBS for 1 h at room temperature. Then, the inserts were incubated at 4°C

overnight with the primary antibodies in 1% bovine serum albumin: occludin (mouse, 1:100) and CD31 antibodies (rabbit, 1:100) were placed in the upper and lower compartment, respectively. The next day, cells were extensively washed and then incubated with the secondary antibodies for 2 h in 1% bovine serum albumin. As primary antibodies were from different species, secondary antibodies were goat anti-mouse and goat anti-rabbit antibodies coupled with Alexa fluor-647 and Alexa fluor-488, respectively. The inserts were mounted on 35 mm culture dishes with 15 mm glass bottom with aqueous mounting medium containing DAPI which counterstained the nuclei. The cells on both sides of the permeable insert were observed by confocal fluorescent microscopy (Zeiss LSM 800) in z-Stack acquisition.

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

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

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

To study the mechanisms induced by e-liquid exposure (oxidative stress, inflammation, type of cell death induced), lower concentrations were used (<10%), which are compatible with alveolar exposure in a vapor with normal or event intensive use of the e-cigarette.

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

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

2.2.3.2.2. E-liquids hypertonic properties. Osmolality of solutions was determined using the Fiske® Micro Osmometer model 210 (Advanced instruments, Norwood, Massachusetts, USA). The quantification range of this system goes from 0 to 2000 mOsm/kg H₂O. Concentrations between 0.2 and 30% of each mixture (V/V in optimal MCDB medium) were tested.

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

2.2.3.4. Investigation on the epithelial cell death pathway induced by exposure to e-liquid components

2.2.3.4.1. Apoptosis (Bax/Bcl-2 ratio) and autophagy (LC3B-II). NCI-H441 were seeded on 6-well plates (0.5×10^6 cells/well) and treated with the mixtures (0.2, 1 and 2.5%) on day 4. Twenty-four hours after exposure, NCI-H441 cells were lysed. Apoptosis, by the Bax/Bcl-2 ratio, and autophagy, by the autophagosome marker LC3B-II, were investigated by Western blot as described previously.

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

For this, cells were seeded at 10^5 cells/well on a black 96-well plate and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 48 h. On the day of the experiment, cells were washed twice with HBSS buffer and incubated 30 min with MitoSOX Red® (5 µM in HBSS). The cells were washed 3 times in HBSS and basal fluorescence was recorded at 510/580 nm using a Varioskan LUX plate reader (Thermo Fisher Scientific). Immediately after the signal stabilisation, PG/VG vehicles ratio of 76/24 and e-liquids (0.2–10%, V/V) were added to the cell medium. The fluorescence was read every minute over a period of 60 min. Results were expressed as a percentage of basal fluorescence (F/F_0). The kinetics of superoxide production was assessed by the area under the curve (AUC) of the MitoSOX Red® fluorescence intensity measurement over the 60-min period.

2.2.3.6. Cytokines and chemokines produced by the alveolar epithelial cells after e-liquids exposure. NCI-H441 were seeded on 12-well plates (2×10^5 cells/well) and treated on day 3 with 2.5% of the following e-liquids: PG/VG 76/24, three flavoured e-liquids without nicotine (red fruits, mint-eucalyptus, blond tobacco) and two commercial e-liquids EL1 and EL2 containing 6 mg/mL nicotine and blond tobacco flavour in 50/50 and 76/24 PG/VG ratio respectively. Impact of e-liquids components and mixtures was tested on a panel of 20 cytokines released by the alveolar epithelial cells during the early (4 h) and late (24 h) phases of exposure. Cytokine concentrations were measured using the Human Th1/Th2 Cytokine & Chemokine 20-Plex ProcartaPlex Panel 1 which enables exploration of immune function by analysing 20 parameters in a single well using the MAGPIX® Luminex instrument (Thermo Fisher Scientific). The parameters analysed were some Th1/Th2 cytokines as

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon gamma (IFN-γ), IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-18, tumor necrosis factor alpha (TNF-α), some chemokines as eotaxin-1 (CCL11), growth-regulated oncogene-alpha (GRO-α, CXCL1), interferon gamma-induced protein 10 (IP-10, CXCL10), monocyte chemoattractant protein (MCP-1 (CCL2)), macrophage inflammatory proteins ((MIP-1α (CCL3) and MIP-1β (CCL4)), Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES, CCL5) and stromal cell-derived factor 1 alpha (SDF1-α, CXCL12) were analysed. Results were expressed as a percentage of the vehicle control (PG/VG 76/24).

2.3. Statistical analysis

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

3. Results

3.1. Characterisation of the alveolar-capillary barrier model

3.1.1. Functional role of the alveolar-capillary barrier model characterised by a colorimetric marker

The kinetics of Trypan blue across the barrier showed that NCI-H441 cells provide a major role in the efficiency of the alveolar-capillary barrier integrity in our model (Supplementary Data 1C). From day 7, the barrier formed by the endothelial line HULEC-5a limits the passage of Trypan blue and the barriers comprising NCI-H441 in monoculture and co-culture are functional earlier, from day 4. Thus, the culture time at D7 seems to be the most appropriate for further experiments. At day 9, a disorganisation of the barrier, certainly due to contact toxicity, can be suspected. Indeed, too many cells present in the cell culture cause the detachment of the cells from the support, which produces surfaces without cells and therefore where the passage of Trypan blue is totally free as for the control.

3.1.2. Functional role of the alveolar-capillary barrier model characterised by measuring TEER

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

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

Alternative cell arrangements were tested, and the results were shown in Supplementary Data 2. Briefly, when HULEC-5a cells were placed on the bottom of the 24-well plate, TEER curve showed a slowly and progressive increase until day 7. On day 8, TEER values reached a fleeting peak of $361.2 \pm 18.9 \Omega \text{ cm}^2$, which was significantly lower than the TEER values observed with standard co-culture model on day 8 ($407.3 \pm 85.7 \Omega \text{ cm}^2$, $p < 0.0001$), then a drastic drop in values was observed at day 9. In contrast to this, the arrangement of NCI-H441 and HULEC-5a cells seeded on both sides of the insert resulted in TEER values in the range of 300–500 $\Omega \text{ cm}^2$ from day 7 to day 9, increasing the time window of a possible exposure to e-liquids. In the second arrangement, HULEC-5a cells were seeded in the same compartment as

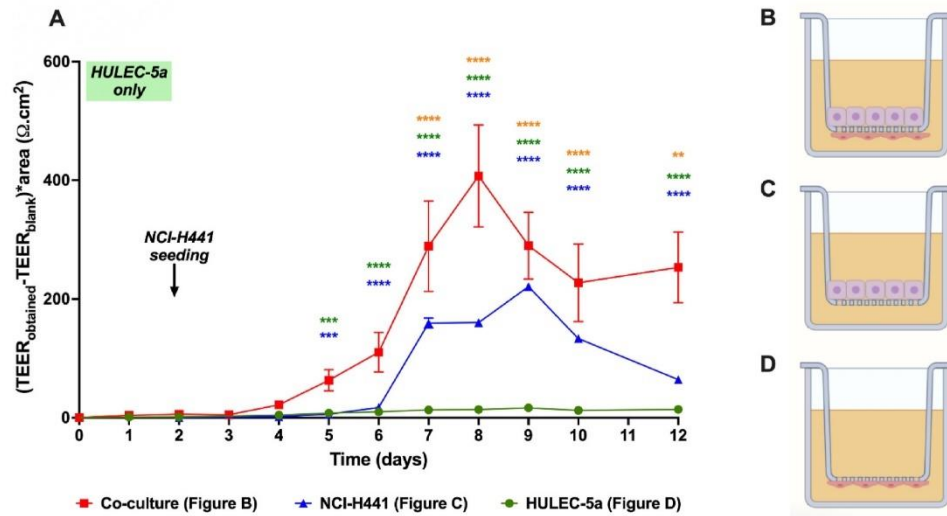


Fig. 2. Functional validation of the alveolar-capillary barrier model by measuring TEER: (A) Evolution of transepithelial/endothelial resistance (TEER) over time for the co-culture arrangements described in figures (B–D). Initial cell density for HULEC-5a on day 0 and NCI-H441 monolayer and co-culture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

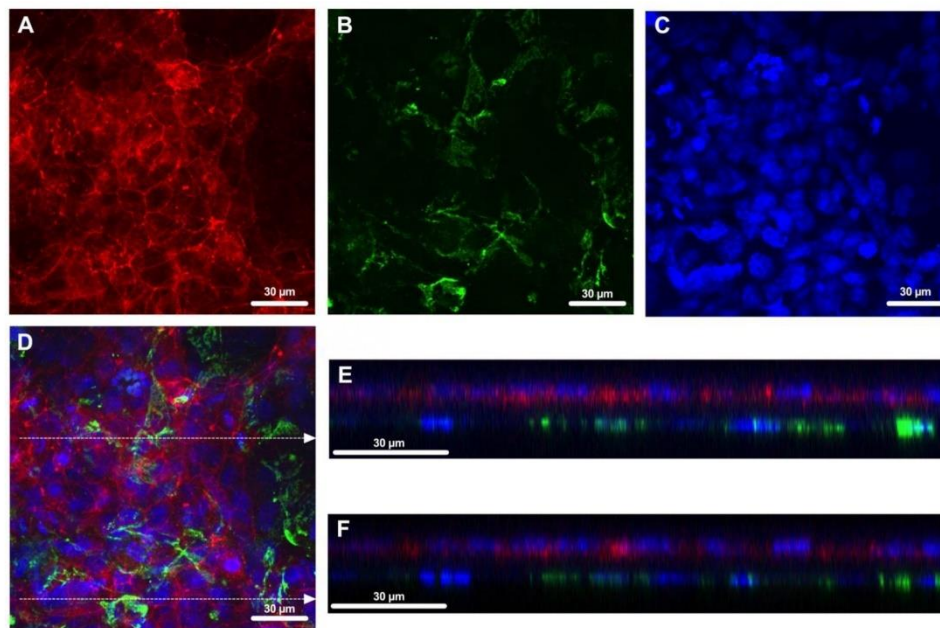


Fig. 3. Immunofluorescence of the alveolar-capillary barrier model. (A) The epithelial NCI-H441 cells were stained with occludin (red) in upper compartment, (B) the endothelial HULEC-5a cells were stained with CD31 marker (green) in lower compartment, (C) nuclei were stained with DAPI (blue). The image (D) illustrates the z-projection of the slices obtained with a Zeiss confocal microscope for the 3 markers. The images (E and F) illustrate two orthogonal views, indicated by white arrowed lines, of (D). The confocal threshold was arbitrarily set so that the very weak signal of occludin from HULEC-5a cells was not visible in the lower compartment. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

NCI-H441 cells and, in this case, the TEER values remained low and no peak was observed, suggesting a difficulty for both cell lines to collaborate in the construction of an effective alveolar-capillary barrier when seeded together without a structure mimicking a basal lamina.

For further experiments, the most robust arrangement of NCI-H441 and HULEC-5a cells seeded on both sides of the insert, was chosen. Only standard co-cultures with TEER values between 300 and 500 Ω cm² were exposed to the e-liquid components or mixtures on day 8.

3.1.3. Phenotype characterisation of the alveolar-capillary barrier model

Specific markers were screened for each cell line by RT-qPCR, Western blot or immunofluorescence allowing the phenotype characterisation of NCI-H441 as alveolar type II cells, and HULEC-5a as endothelial cells. The specific markers selected for alveolar type II cells were surfactant A and D, aquaporin 5 and thyroid transcription factor 1 (TTF-1) and those selected for endothelial cells were CD-31, eNOS and von Willebrand factor (vWF). The presence of occludin and ZO-1, proteins playing a crucial role in cell-cell tight junctions was also investigated. While ZO-1 was moderately and weakly found in NCI-H441 and HULEC-5a, respectively, the two cell lines showed a positive but much varying expression of occludin. As NCI-H441 cells very highly expressed occludin, HULEC-5a revealed a very low expression. Supplementary Data 3 resumes the expression of these markers for the two cell lines.

Finally, Fig. 3 showed the localisation of CD31 in HULEC-5a cells and occludin in NCI-H441 cells, two major membrane proteins of each cell line and illustrated their distribution around the PET membrane. The two cell lines were well distributed on each side of the membrane without apparent interactions one with the other. Anyway, this co-culture model possesses all the functional and phenotypic characteristics of the alveolar-capillary barrier and can subsequently be used for e-cigarette exposure.

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

3.2.1. E-liquids modified alveolar-capillary barrier integrity

Exposure (24 or 48 h) to increasing concentrations of e-liquid's vehicles (PG, VG or 50/50 and 76/24 PG/VG ratios) triggered a biphasic effect on TEER values. For low concentrations, between 1% and 5%, an increase in resistance was observed, then higher concentrations altered the integrity of the barrier, leading to a decrease of more than 50% of TEER values for concentrations above 10% for PG and VG alone, and above 20% for 50/50 and 76/24 PG/VG ratios, compared to untreated cells. Mannitol, a compound known for its hypertonic properties that break down barrier integrity, showed a similar pattern with a drop of more than 50% in TEER values for a concentration above 10% (Fig. 4A).

Exposure to e-liquids with flavours were also tested (Fig. 4B). When the red fruits and mint-eucalyptus flavours were present in an e-liquid with a PG/VG ratio of 76/24, the concentrations required to trigger a drop of more than 50% in TEER were 5% and 2.5% respectively, suggesting a greater role of these flavours in achieving barrier integrity impairment compared to the ratio of 76/24 of vehicles. In contrast, the presence of blond tobacco flavour in the 76/24 PG/VG ratio decreased the TEER values for the 0.2 and 1% and for the 20 and 30% concentrations. However, the addition of nicotine at 6 mg/mL in the latter e-liquid restored the biphasic pattern for EL2 but not EL1. In both cases, nicotine neutralises blond tobacco flavour effect on barrier permeability at low percentages of flavours (0.2–1%). Furthermore, while concentrations above 20% continued to decrease of more than 50% the TEER for EL1, a concentration of 30% was necessary to cause a decrease of more than 50% in TEER for EL2 (Fig. 4B).

3.2.1.1. Low concentrations of e-liquids increase occludin expression and barrier integrity. To further investigate the effect of lower concentrations of vehicles and e-liquids on cell membrane rearrangements and cell-cell

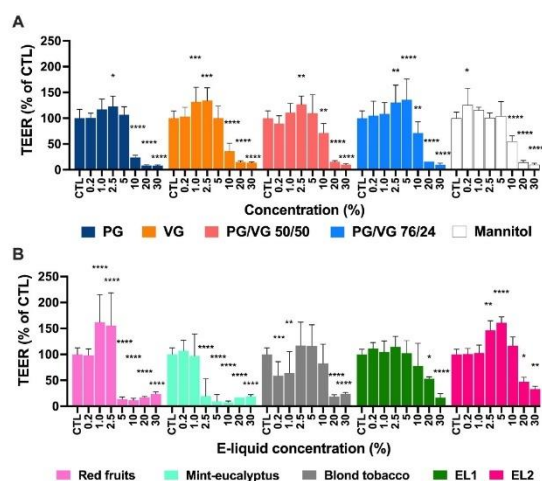


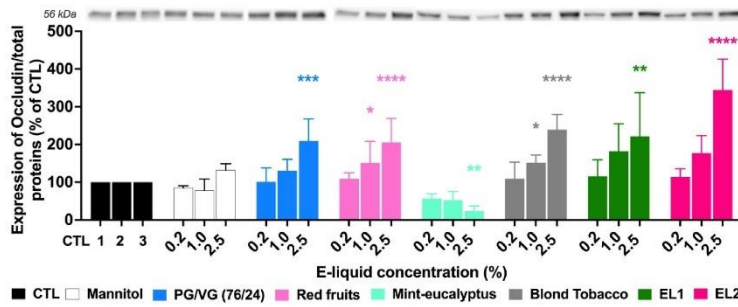
Fig. 4. Histograms of TEER's values of alveolar-capillary barrier model after 48 h exposure to vehicles or marketed e-liquids. TEER's values indicate the paracellular permeability of the NCI-H441/HULEC-5a co-culture and in consequence the barrier integrity. (A) represents TEER measures after 48 h of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

junctions, the changes in occludin expression, a tight junction protein, were studied in both cell types. An increase in occludin expression was observed in NCI-H441 monolayers exposed to concentrations from 0.2 to 2.5% of 76/24 ratio of vehicle, red fruits and blond tobacco flavoured e-liquids compared to untreated cells. In contrast, exposure of alveolar epithelial cells to increasing concentrations of mint-eucalyptus e-liquid highly decreased occludin expression, with protein expression being statistically lower at the 2.5% concentration ($p = 0.0013$) compared to control. Although there was a tendency for occludin expression to increase after 24 h of treatment with 2.5% of mannitol, no significant difference was observed compared to control ($p = 0.2610$).

Interestingly, the presence of nicotine in the 76/24 blond tobacco e-liquid (EL2) enhanced the phenomenon by increasing occludin expression. Thus, occludin expression after exposure to the 2.5% concentration was statistically higher for the blond tobacco e-liquid with nicotine compared to the same e-liquid without nicotine ($p = 0.0245$) (Fig. 5).

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

3.2.1.2. Hypertonic properties of e-liquids disturbed the tight junctions of the barrier. Hyperosmotic solutions like mannitol are known to decrease the TEER of barriers by increasing their permeability. To investigate the effect of higher concentrations of vehicles and e-liquids, the osmolality of the co-culture medium was measured. The initial osmolality of the medium was similar to physiological values (around 294 mOsm/L). However, the solutions osmolality showed similar curves for PG, VG, and PG/VG ratios 50/50 and 76/24, with a value above 500 mOsm/L



0.05; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

being reached above concentrations of 2.5%. In contradiction to these data, the e-liquid containing mint-eucalyptus flavour in a PG/VG ratio of 76/24 showed a lower osmolality and values above 500 mOsm/L were reached above the concentration of 5% (Supplementary Data 4). This latter phenomenon could be explained by the higher freezing point of menthol compared to PG/VG mixtures.

3.2.2. E-liquids reduced cell viability

To determine whether the decrease in TEER was only due to a response to the hyperosmolality of the medium which opens the barriers or also to cell death, an MTS viability test was performed on the upper and lower compartments of the co-culture post-exposure to PG and VG vehicles alone or in a ratio of 50/50 and 76/24, and then to marketed flavoured e-liquids with and without nicotine. In the upper

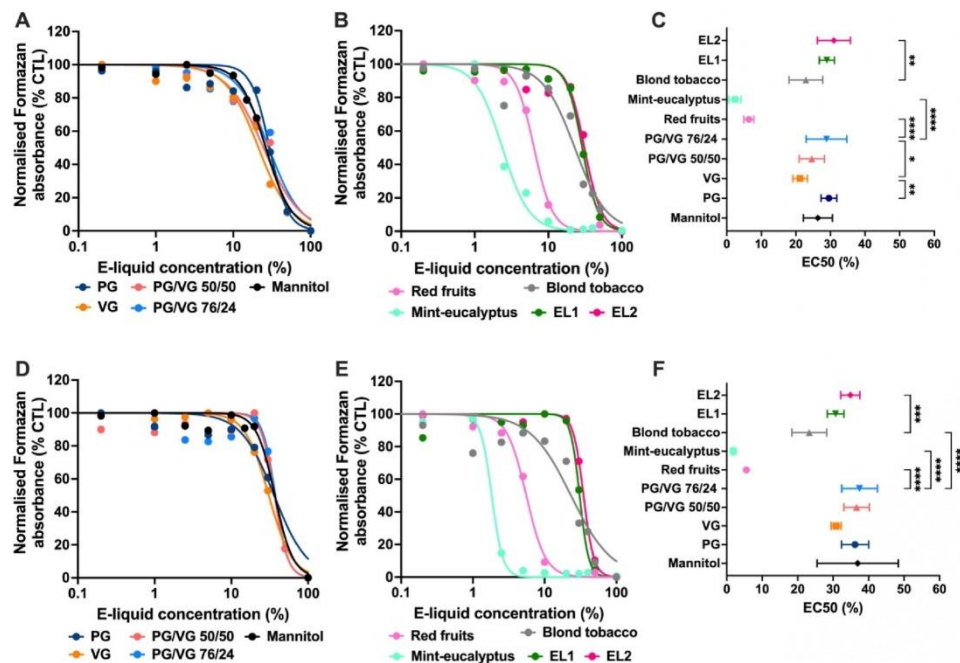


Fig. 6. Cell viability with increasing percentage of vehicles or marketed e-liquids in co-culture upper (A, B and C) and lower (D, E and F) compartments. Cell viability of NCI-H441 and HUVEC-5a cells was measured with MTS viability assay. After a 48-h exposure, the formazan dye absorbance decreased with the increase concentration of (A and D) mannitol, vehicles PG and VG alone or in ratios of 50/50 and 76/24, and (B and E) marketed flavoured e-liquids red fruits, mint-eucalyptus and blond tobacco without nicotine. Each point on the curves represents triplicates of at least 3 independent experiments. Dose-effect curves are fitted from a logarithmic (agonist) versus normalized response model allowing for variable slope of the curves through a least squares analysis calculation. Obtained EC50 values derived from dose-effect curves were plotted with their 95% confidence intervals and comparison between different exposures was performed using a one-factor ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Šidák's multiple comparisons test (C and F). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. CTL: control, meaning untreated cells. EL1 and EL2 contain blond tobacco flavour, 6 mg/mL of nicotine and ratios of 50/50 and 76/24 of PG/VG, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

compartment of the co-culture (NCI-H441 cells), the cell viability was reduced by 50% after exposure to 29.5%, 21.2%, 24.6%, 28.8% of PG alone, VG alone, PG/VG 50/50 and PG/VG 76/24 ratios, respectively (Fig. 6A). According to EC50 values, VG alone decreased viability of NCI-H441 compared to PG ($p = 0.0018$) and to PG/VG 76/24 ($p = 0.0172$), but EC50 values were not statistically different between VG and PG/VG 50/50 ($p > 0.05$) (Fig. 6C). Addition of red fruits and mint-eucalyptus flavours decreased the cell viability for lower concentrations of marketed e-liquids compared to the vehicle control, the PG/VG 76/24 ratio ($p < 0.0001$), but EC50 values did not differ between blond tobacco flavoured e-liquid and the vehicle control ($p > 0.05$). Thus, concentrations of 6.4% of red fruits, 2.4% of mint-eucalyptus and 22.9% of blond tobacco were sufficient to reduce the viability by 50%. Mannitol triggered 50% drop of viability at a concentration of 26.4%, which did not differ from that of PG, VG alone, or in different ratios tested (Fig. 6A and C). The presence of nicotine in the blond tobacco flavoured e-liquid, seemed to improve cell viability compared to the blond tobacco e-liquid without nicotine ($p = 0.0039$), but these results could be due to an experimental artifact related to the perturbation of the cellular NAD(P)H required for the MTS viability test reaction by nicotine (Aleshin et al., 2015). Similar results were obtained in the lower compartment (HULEC-5a cells) of the co-culture except that the effect of VG was not different from that of PG and PG/VG 76/24 on viability and the blond tobacco flavoured e-liquid significantly decreased viability compared to the vehicle control ($p < 0.0001$) (Fig. 6D, E and F).

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

NCI-H441 monolayers were exposed to increasing concentrations of vehicles and flavoured e-liquids. No significant increase in Bax/Bcl-2 ratio was observed for concentrations between 0.2 and 2.5%, showing that apoptosis was not the primary mechanism inducing cell death in cells constituting the alveolar capillary barrier after exposure to e-liquids (Supplementary Data 5).

However, the expression of LC3B-II protein, the most specific marker of the autophagic process (Mizushima and Yoshimori, 2007) showed a weak increasing trend after vehicle exposure with a PG/VG ratio of 76/24, but not statistically different ($p = 0.1923$, Fig. 7). More interestingly, e-liquids containing red fruits and mint-eucalyptus flavours in a 76/24 PG/VG ratio significantly enhanced LC3B-II protein expression for the 2.5% concentration of red fruits ($p < 0.0001$ and $p = 0.0029$) and mint-eucalyptus ($p < 0.0001$ and $p = 0.0011$) compared to untreated cells and 2.5% PG/VG 76/24 ratio, respectively (Fig. 7). These results showed an amplification of the autophagic mechanism in the presence of red fruits and mint-eucalyptus flavours. Due to a large variability in the data for the blond tobacco e-liquid, the accentuation of the autophagic pathway compared to the PG/VG vehicle (76/24, 2.5%) could not be

demonstrated. However, the comparison with untreated cells was statistically significant ($p = 0.0147$). In another hand, the presence of nicotine with this last flavour significantly increased LC3B-II expression in the 50/50 and 76/24 PG/VG e-liquids compared to untreated cells ($p = 0.0100$ and $p < 0.0001$, respectively). Nevertheless, no difference could be demonstrated between blond tobacco e-liquids with and without nicotine, thereby making it difficult to conclude on the role of blond tobacco flavour or nicotine in enhancing autophagy by these e-liquids (Fig. 7).

3.2.4. E-liquids induced mitochondrial oxidative stress

Numerous studies have shown that ROS derived from mitochondria are major inducers of autophagy and in turn, autophagy serves to reduce oxidative damage (Filomeni et al., 2015). MitoSOX Red® was used to follow the level of mitochondrial superoxide production. The results of the kinetic curves of superoxide production in alveolar epithelial cells were expressed by calculating the AUC. Fig. 8A showed that the 76/24 vehicle ratio did not significantly increase mitochondrial stress for concentrations up to 5%, but that the 10% concentration triggered a 41.4% increase compared to untreated cells. The addition of flavourings affected the production of oxidative stress, with a significant increase in AUC starting at 2.5% for the mint-eucalyptus e-liquid and 5% for the red fruits e-liquid. A reduction in superoxide anion production was observed for 10% mint-eucalyptus e-liquid compared to 5%, which was explained by the time-fluorescence curve showing a sharp increase until the eighth minute, followed by a decrease in fluorescence due to cell death (Fig. 8B). Interestingly, the blond tobacco flavour in the 76/24 vehicle ratio did not increase cellular production of superoxide anions up to the 10% concentration compared to untreated cells. Moreover, the 10% concentration of the blond tobacco e-liquid triggered 32.3% less oxidative stress than the 10% of PG/VG 76/24 concentration (Fig. 8A and C). In contrast, the presence of nicotine at 6 mg/mL in the blond tobacco flavoured e-liquid induced the production of oxidative stress from the 2.5% concentration level, at both 50/50 and 76/24 PG/VG ratios, showing the effect of nicotine as an inducer of mitochondrial oxidative stress (Fig. 8C).

3.2.5. E-liquids increased the excretion of inflammatory cytokines

The secretion of inflammatory cytokines is known as a molecular stress response for epithelial (NCI-H441) cells. For example, IL-6 released from pulmonary epithelial cells, could promote cell autophagy (Hu et al., 2021). A total of 20 cytokines were measured with a multiplex method in cell supernatant collected from NCI-H441 monolayers treated with 2.5% of e-liquids for 4 and 24 h. Overall, only the levels of five cytokines were consistently increased after mint-eucalyptus e-liquid exposure compared to the vehicle control, with

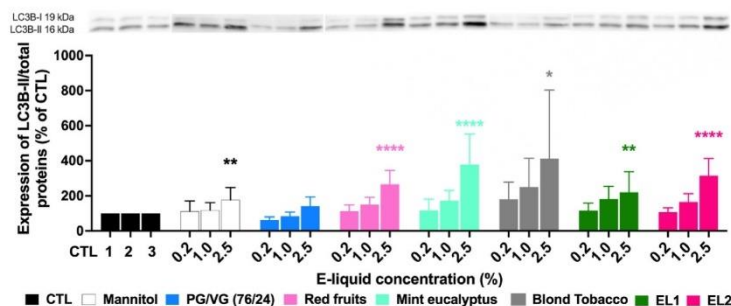


Fig. 7. Expression of LC3B-II, an autophagosome marker, in epithelial alveolar NCI-H441 cells 24 h after e-liquids exposure. Western blot analyses showing the expression of LC3B-I and -II, autophagosome proteins and histograms of LC3B-II bands quantification, in epithelial alveolar NCI-H441 cells. Cells were treated for 24 h with increasing concentrations of mannitol, PG/VG 76/24, marketed flavoured e-liquids red fruits, mint-eucalyptus, and blond tobacco without nicotine and 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. The relative to total proteins density values of LC3B-II (16 kDa) were shown in histograms which represented mean $\pm$ SD from at least three independent experiments. Comparison between different exposures versus untreated cells (CTL) was performed using a 2-factors ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a

Sidak's multiple comparisons test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

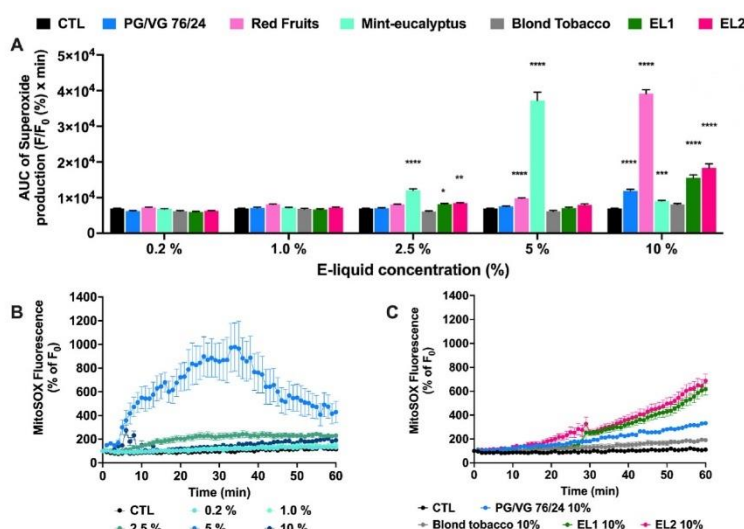


Fig. 8. Effects of increasing e-liquid concentrations on mitochondrial oxidative stress of alveolar NCI-H441 epithelial monolayers measured by MitoSOX® Red. (A) The area under the curve (AUC) of superoxide production kinetic curve for 1 h using the MitoSOX® Red fluorescent signal. (B) illustrates fluorescence kinetic curves obtained with increasing concentrations of mint-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 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 PG/VG, respectively. Histograms represent mean $\pm$ SD from at least three independent experiments. Comparisons between different exposures versus untreated cells (CTL) were performed using a 2-factors ANOVA test ($\alpha = 0.05$) followed by a Sidák's multiple comparisons test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

four in the early phase (IL-6, IL-8, MIP-1 β and SDF1- α) and five in the late phase (IL-6, IL-8, MIP-1 β , SDF1- α and GM-CSF) (Fig. 9). Level of GM-CSF was also significantly increased after exposure to the blond tobacco e-liquid with 6 mg/mL of nicotine (76/24 PG/VG ratio), but not after exposure to blond tobacco e-liquid without nicotine, showing that nicotine certainly had a role in GM-CSF release increase. However, while the most inflammatory e-liquid contained mint-eucalyptus flavour, red fruits flavour showed a tendency to increase the secretion of IL-6, IL-8, MIP-1 β , SDF1- α and GM-CSF. Otherwise, the levels of IP-10, MCP-1, MIP-1 α and RANTES were not different from those of vehicle control after 4 or 24 h of exposure and eleven out of 20 cytokines were below the lower limit of quantification (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-12p70, IL-13, IL-18, GRO- α and eotaxin-1).

4. Discussion

In this work, the effects of the main components of e-cigarette liquid were demonstrated on a functionally and phenotypically characterised cell model of the alveolar-capillary barrier. Thus, the results showed that the response of exposed cells varied considerably depending on the components and their mixture in e-liquids, with flavours playing a crucial role in the loss of barrier integrity, inflammation, oxidative stress and cell death. Indeed, after exposure to e-liquids, epithelial cells, the first cells to be exposed to aggression by e-liquids, responded with an increase in oxidative stress as evidenced by an escalation of mitochondrial-generated superoxide and the release of some cytokines and chemokines. However, low exposures to e-liquids or mixtures increased the expression of occludin, a tight junction protein, thus enhancing the barrier role in both cell lines. An increase in autophagy processes was also observed, corresponding to a stress response of the cells. Finally, at higher exposures to e-liquids, a loss of alveolar capillary barrier integrity and cell death in both cell lines occurred.

4.1. Interest of a cell alveolar-capillary barrier model

The alveolar-capillary barrier is involved in many aspects of normal lung physiology, and the loss of its integrity is a central characteristic of lung disorders such as smoking-related COPD, but also E-cigarette or Vaping Use-Associated Lung Injury (EVALI) (www.cdc.gov/EVALI). Thus, we first developed an *in vitro* technique of a functional, robust, and

reproducible co-culture model mimicking the physiological situation of an alveolo-capillary unit, particularly fostering the 3 Rs principle.

The model is a co-culture of the human distal lung epithelial cell line isolated from a papillary adenocarcinoma, NCI-H441, with the human pulmonary microvascular endothelial cells immortalised by the SV40 large T antigen transfection, HULEC-5a, placed on the upper and lower sides of a pored membrane respectively. In the phenotypic characterisation of the model, NCI-H441 cells were confirmed to possess specific markers of alveolar epithelial cells, including surfactant proteins and water transporters (AQP-5). Also, HULEC-5a cells express endothelial markers as CD31, eNOS and von Willebrand factor. The two cell lines also express tight junction proteins (Occludin and ZO-1). The measurement of TEER is a technique that assesses the ohmic resistance between the upper and lower compartments of a cell insert, while preserving the characteristics and growth of cell populations. It therefore indicates the degree of integrity of the intercellular junctions and allows a reliable characterisation of the barrier function *in vitro*. This technique has been widely used in other barrier models like blood-brain barrier (Becker et al., 2021). Functional characterisation of our cell model confirmed that it acts as a barrier by establishing a high TEER ($407.3 \pm 85.7 \Omega \text{ cm}^2$) and highlighted that NCI-H441 cells are primarily responsible for the barrier function by providing the greatest resistance to the model compared to the HULEC-5a cells. NCI-H441 cells have been widely used as a model of the alveolar epithelium and similar TEER values were obtained after 10 days of co-culture with the angiosarcoma cell line ISO-HAS-1 ($380 \Omega \text{ cm}^2$) (Dohle et al., 2018) or with primary human pulmonary microvascular endothelial cells ($565 \Omega \text{ cm}^2$) (Hermanns et al., 2004). These TEER values are higher than those found *in vivo* from tracheal epithelium, but TEER values from the alveolar-capillary barrier are missing in the literature because of the technical difficulties in obtaining them (Doryab and Schmid, 2022). Furthermore, co-culture of NCI-H441 with HULEC-5a on either side of the insert induced a reinforcement of resistance, indicating an increase in the barrier properties compared to the different cell arrangements tested. This latter finding suggests that both cell lines collaborate in the construction of a more effective alveolar-capillary barrier if seeded at either side of a basal lamina-like structure. Given the results obtained for the phenotypic characterisation of the cell lines, as well as the functional validation of the co-culture model, our alveolar-capillary model was used for further e-liquid exposure experiments. Thus, to better understand how the main

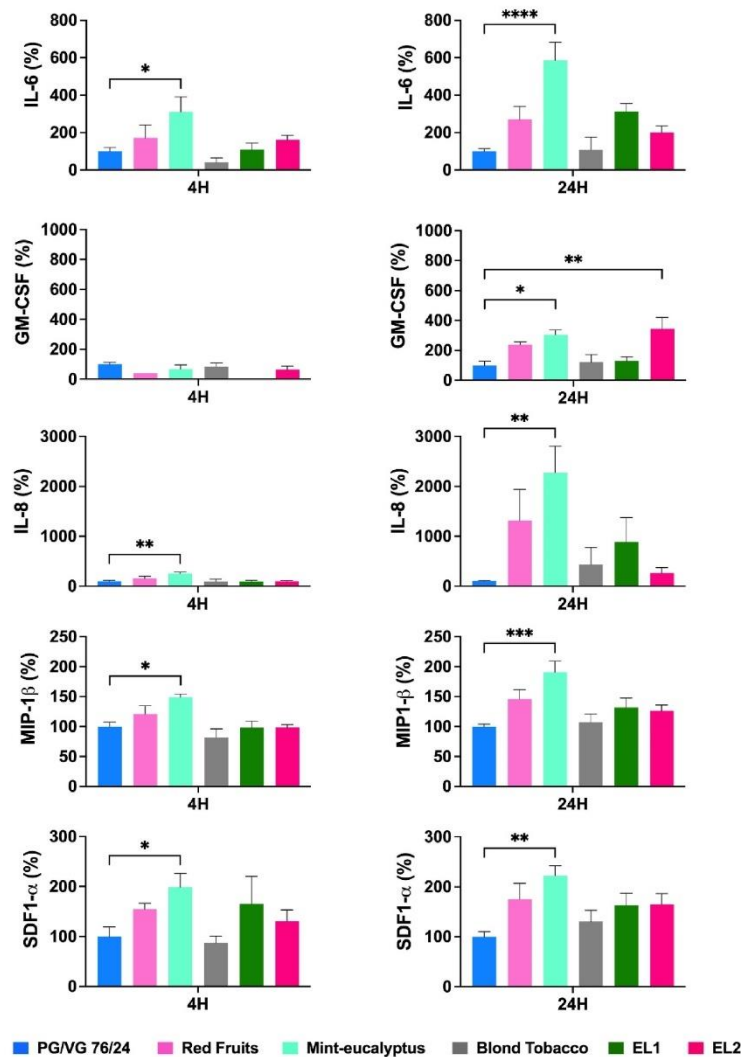


Fig. 9. Cytokine excretion after exposure of epithelial NCI-H441 cells to 2.5% of e-liquids. Histograms illustrate the levels of IL-6, IL-8, MIP-1β, SDF1-α and GM-CSF released by NCI-H441 cells after 4 and 24 h of exposure to e-liquids. EL1 and EL2 contain blond tobacco flavour, 6 mg/mL of nicotine and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

e-liquid components affect the cells and the properties of barrier model, increasing concentrations of PG, VG alone and in 50/50 and 76/24 ratios were applied to the apical surface of the co-culture or to the epithelial cell monolayer.

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

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

(Cummins, 2012). A biphasic effect on barrier resistance was observed after exposure to the vehicles: first, an increase in TEER for concentrations below 5% with an increase in occludin expression on the alveolar epithelium. Second, for higher concentrations, which resulted in a hypertonic effect on the barrier, a decrease in TEER was observed which reflects a destruction of the barrier due to cell death. These results indicate that hypertonic e-liquids can induce pressure on the tight junctions between adjacent epithelial cells resulting first in a cell membrane rearrangement with an increase in occludin synthesis followed by an opening of the barrier. Finally, hyperosmolality may lead to a dysregulation of the passage of molecules from the air into the blood. Interestingly, the mint-eucalyptus e-liquid, which has a lower hyperosmolality, did not increase occludin synthesis. For this e-liquid, the integrity of the barrier is broken at lower concentrations due to the induction of oxidation and inflammation mechanisms. These findings confirm a recent *in vitro* study, where a 55/45 ratio of PG/VG decreased

resistance of alveolar epithelium, reduced airway epithelial height, and increased epithelial permeability, although, this work did not focus on vehicle impact on tight junctions (Woodall et al., 2020). In addition, in rat Sertoli cells, VG at a 10% concentration disrupted the organisation of tight junctions associating actin microfilaments, occludin and tubulin, by exerting a sufficient osmotic stress (Wiebe et al., 2000). Furthermore, hyperosmotic VG was also shown to directly interact with the lipid components at the membrane interface (Biondi and Disalvo, 1990). Interestingly, the most common side effects of inhaling e-liquid containing PG and VG are dry mouth, sore throat and increased thirst which may be due to the hypertonic properties of these two compounds, indirectly triggering cell and systemic dehydration of the user depending on the intensity of the vaping. The higher the frequency and intensity of vaping, the more deleterious the effects of the vehicles on the barrier. Longer exposure of the barrier could result in a disbalance in the regulation of the alveolar surfactant fluid, the passage of inhaled pathogens from air to blood and the passage of immunity cells from blood to the alveolar space. To resume, disruption of alveolar immune homeostasis can be a source of edema fluid, impaired gas exchange and pulmonary infection.

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

The addition of flavours in e-liquids results in an additional deleterious effect on the alveolar-capillary unit as they lower the threshold for cells stress, barrier failure and finally cell death. Similar to PG/VG, flavours are designated *Generally Recognized As Safe* (GRAS) but there are only limited safety data after inhalational exposure. In literature, the most studied flavouring compounds are cinnamaldehyde, vanillin, ethyl-maltol and menthol. They have been shown to induce oxidative stress and inflammatory responses in human cells through a variety of more or less well identified mechanisms (Hua et al., 2019; Muthumalage et al., 2019; Rickard et al., 2021). However, users of flavoured e-cigarettes reported higher satisfaction than users of unflavoured e-cigarettes (Landry et al., 2019). For example, in Europe, the most popular flavours in e-liquids are fruity (red fruits being the most sold in this category), tobacco and menthol (Havermans et al., 2021). The appeal of flavours, particularly among young adults, could have long-term consequences that are currently poorly understood.

For this study, three commercially available flavoured e-liquids were chosen, with a PG/VG ratio of 76/24: red fruits, mint-eucalyptus and blond tobacco. While blond tobacco seems to be as safe as vehicles in terms of alveolar toxicity, red fruits and mint-eucalyptus trigger cellular stress, inflammatory and death mechanisms, with the mint-eucalyptus flavour causing the worst effects. Thus, when the co-culture model was exposed to red fruits and mint-eucalyptus e-liquids, cell viability decreased significantly, with 50% of cell death being reached after concentrations of 6.4% and 2.4%, respectively. These results confirm deleterious effects of menthol flavoured e-liquids described in the literature. For example, Goenka et al. showed that human retinal pigment epithelial cells viability was lowered by 41.7% and 96.5% at concentrations of 1% and 2% of menthol e-liquid, respectively (Goenka and Simon, 2021).

While cell death is related to osmotic shock for high concentrations of PG and VG, other mechanisms were demonstrated for lower PG and/or VG concentrations. The main mechanism of cell death initiated at low concentrations appears to be autophagy, as in this study flavoured e-liquids stimulated LC3B-II expression on NCI-H441 cells, reflecting increased autophagosome production. There is now considerable interest in autophagy in lung diseases, in which autophagy may be either a protective homeostatic mechanism as it clears cellular components damaged by oxidative stress or inflammation, nor even deleterious due to autophagy activation of fibrosis (Hill and Wang, 2022). The establishment of an autophagy mechanism after e-liquid exposure confirms the literature data, as Go et al. found a significant accumulation of LC3B-II in cells treated with tobacco and menthol flavoured e-liquids,

but not in the PG/VG treated group, compared to the control group (Go et al., 2020). They also identified higher expression levels of the pro-apoptotic genes of Bax and caspase-3, and lower expression levels of the anti-apoptotic marker Bcl-2 in tobacco and menthol flavoured e-liquids compared to the control group (Go et al., 2020). In our study, neither the blond tobacco nor the red fruits and mint-eucalyptus e-liquids increased significantly the pro-apoptotic ratio of Bax/Bcl-2 proteins, showing that this death pathway certainly exists but is not the principal pathway involved after exposure of increasing concentrations to the e-liquids studied. As autophagy is generally implemented to eliminate impaired proteins and organelles accumulated in the cell cytoplasm, the impact of e-liquid compounds on the formation and accumulation of highly reactive oxygen species was further investigated in this work.

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

Mitochondrial superoxide anion production was increased when alveolar epithelial cells were exposed to e-liquids, but in an unequal manner. Thus, mint-eucalyptus and red fruits e-liquids induced a significant dose-dependent increase in superoxide ion production for concentrations above 2.5% and 5%, respectively. In literature, Lamb et al. found that menthol flavoured e-cigarette exposure to bronchial epithelial cells caused mitochondrial dysfunction, reducing basal and maximal respiration, consequently affecting mitochondrial oxidative stress (Lamb et al., 2020). In addition, tobacco flavour exposure resulted in non-significant alterations of mitochondrial respiration in this previously cited study, which is in concordance with our work where blond tobacco e-liquid up to 10% did not enhance superoxide production compared to untreated cells and even reduced by 32.3% the superoxide anion production induced by the PG/VG 76/24 ratio at a 10% concentration. In contrast, when nicotine was present in blond tobacco flavoured (6 mg/ml nicotine) in both 50/50 and 76/24 ratios, e-liquids induced an increase in superoxide anions production compared to tobacco-flavoured e-liquid without nicotine, demonstrating the activation of mitochondrial activity and intracellular oxidative stress by nicotine, as previously described in literature (Barr et al., 2007; Zanetti et al., 2014). Nicotine has been shown to mediate intracellular Ca^{2+} flux and activate protein kinase C pathway, which then activates NADPH oxidase (NOX) enzymes. NOXs catalyze the conversion of oxygen to superoxide, which can lead to increased cellular and mitochondrial oxidative stress (Zanetti et al., 2014).

The present study did not focus on the flavouring chemicals present in e-liquids and responsible for cytotoxic effects since only the data present on the packaging of the e-liquids were available to the investigators. However, toxicity of mint-eucalyptus e-liquid may be attributed to menthol as it increases oxidative stress through the binding of menthol to Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8). TRPM8 is a cation channel with Ca^{2+} selectivity, which triggers an increase in cytoplasmic and mitochondrial Ca^{2+} concentrations which can be the source of excessively ROS generation (Nair et al., 2020). Further studies are needed to explore the mechanisms by which flavoured e-liquids alter mitochondrial function (mitophagy, respiration ...) and to find the molecules responsible for these adverse effects.

Additionally, autophagy and inflammation have been described to be connected, and their networks are complex as inflammation is involved in the induction and suppression of autophagy (Chen et al., 2018; Saitoh and Akira, 2010). Different cytokines including IL-6 and TNF- α have been shown to stimulate autophagy (Hu et al., 2021; Harris, 2011) and, in exchange, autophagy participates in the clearance of inflammasomes through proteasomal degradation (Shi et al., 2012). In our study, increased cytokine release was most markedly observed with mint-eucalyptus e-liquid, the only flavoured e-liquid without nicotine to produce increased inflammatory cytokine and chemokine release (IL-6,

IL-8, MIP-1 β , SDF1- α and GM-CSF). According to our works, several studies have reported increased pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, CXCL1, and G-CSF) after e-cigarette exposure in human bronchial cells (Iskandar et al., 2016; Anthérieu et al., 2017). E-cigarette aerosol condensate mediated inflammation in A549 cells with significant upregulation of cytokines and chemokines (IL-6, IL-8, and MCP-1) (Singh et al., 2021). Finally, e-cigarette extract, by activating the p38 MAPK, TLR-4/NF- κ B, and EGFR/ERK signal pathways, promotes the release of inflammatory mediators (Chen et al., 2020; Iskandar et al., 2016; Wang et al., 2022). Moreover, exposure of bronchial epithelial cells from patients with COPD to the Virginia tobacco and menthol flavoured e-cigarette aerosols triggered comparable release of inflammatory cytokine levels (IL-6 and IL-8) that conventional cigarette smoke (O'Farrell et al., 2021). In fact, epithelial and endothelial cells activated by cigarette smoke and other inhaled irritants, secrete a variety of proinflammatory mediators, including cytokines, chemokines, like TNF- α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF, and IL-8 (Gao et al., 2015). Other mediators, MCP-1 and GRO-, increase the recruitment of monocytes from the circulation, while the direct stimulatory effect of GM-CSF acts on the production and release of granulocytes from the bone marrow (Barnes, 2016). Overall, the mediators secreted after prolonged exposure to menthol-flavoured e-liquids are involved in the lung inflammation that leads to lung disorders and all these results raise questions about the potential involvement of e-cigarette use in the development of COPD or other lung diseases. Despite this, the mechanisms of induction of pro-inflammatory cytokines, oxidative stress and cellular death of individual chemicals require further investigation to better predict pulmonary effects of these formulations.

4.5. Limitations of the study

The main limitation of the present study is that it evaluated the toxicity of e-cigarettes liquids, in liquid and not aerosolised form, on an *in vitro* model. As e-cigarettes users inhale aerosols rather than e-liquids, further studies are needed to evaluate the effects of e-liquid aerosols using an appropriate inhalation system, and confirmation by a *in vivo* model. Furthermore, as physiological concentrations of e-liquid components have not been measured in humans after vaping, a wide range of concentrations of e-liquids and mixtures was tested for the assessment of the different toxicity tests in our study. Nevertheless, this exposure model has advantages as it defines the existence and the mechanisms of e-liquids toxicity before aerosolisation. Also, it has been shown that during this process other compounds were formed through decomposition of e-liquid vehicles and flavours chemicals (Khlystov and Samburova, 2016; Lorkiewicz et al., 2022). Furthermore, e-liquid aerosolisation varies a lot depending on the brand and features (voltage/wattage/resistance) of e-device studied, and the method of aerosol collection (Dusautoir et al., 2021), all this complexifying toxicity assays. Interestingly, Behar et al. demonstrated that e-liquid toxicity accurately predicts *in vitro* aerosol toxicity in about 74% of the cases (Behar et al., 2018), allowing a fast screening of deleterious e-liquids before their aerosolisation on air-liquid *in vitro* models.

Finally, there is a considerable disparity in the literature regarding e-cigarettes tolerance. Many groups have claimed that the toxicity of e-liquids is absent or less than that of tobacco (Wang et al., 2021; Scheffler et al., 2015; Su et al., 2022), while others have demonstrated the activation of cytotoxic pathways, including oxidative stress, inflammation, and cellular death, that are dependent on the composition of e-liquids, in consistency with our study (Hua et al., 2019; Khachatoorian et al., 2021). These conflicting results reflect the urgent need for standardised *in vitro* e-cigarette exposure models and interpretation. Moreover, further research is needed to investigate the effects of e-cigarette exposure in humans. Therefore, we suggest continued caution in the use of e-cigarettes for smoking cessation purposes and strongly recommend the use of controlled e-liquids, which means that their components have been validated for safe use.

5. Conclusion

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

CRediT authorship contribution statement

Amelia-Naomi Sabo: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Emma Filaudeau:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Sylvia Da Silva:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Guillaume Becker:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Laurent Monassier:** Funding acquisition, Resources, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Véronique Kennel:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Resources, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

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

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

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113650>.

References

- Aleshin, V.A., Artiukhov, A.V., Oppermann, H., Kazantsev, A.V., Lukashev, N.V., Buniik, V.I., 2015. Mitochondrial impairment may increase cellular NAD(P)H: resazurin oxidoreductase activity, perturbing the NAD(P)H-based viability assays. *Cells* 4 (3), 427–451.
- Anthérieu, S., Garat, A., Beauval, N., Soyey, M., Allorge, D., Garçon, G., et al., 2017. Comparison of cellular and transcriptomic effects between electronic cigarette vapor and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Vitro* 45, 417–425.
- Barnes, P.J., 2016. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138 (1), 16–27.
- Barr, J., Sharma, C.S., Sarkar, S., Wise, K., Dong, L., Periyakuruppan, A., et al., 2007. Nicotine induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells. *Mol. Cell. Biochem.* 297 (1–2), 93–99.
- Becker, G., Da Silva, S., Sabo, A.N., Antal, M.C., Kennel, V., Monassier, L., 2021. Blood-brain barrier permeability: is 5-hydroxytryptamine receptor type 4 a game changer? *Pharmaceutics* 13 (11), 1856.

- Behar, R.Z., Wang, Y., Talbot, P., 2018. Comparing the cytotoxicity of electronic cigarette fluids, aerosols and solvents. *Tobac. Control* 27 (3), 325–333.
- Biondi, A.C., Disalvo, E.A., 1990. Effect of glycerol on the interfacial properties of dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes as measured with merocyanine 540. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1028 (1), 43–48.
- Birkness, K.A., Deslauriers, M., Bartlett, J.H., White, E.H., King, C.H., Quinn, F.D., 1999. An in vitro tissue culture bilayer model to examine early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Tuomanen EI, editor. *Infect. Immun.* 67 (2), 653–658.
- Bitzer, Z.T., Goel, R., Reilly, S.M., Bhangu, G., Trushin, N., Foulds, J., et al., 2019. Emissions of free radicals, carbonyls, and nicotine from the NIDA Standardized Research Electronic Cigarette and comparison to similar commercial devices. *Chem. Res. Toxicol.* 32 (1), 130–138.
- Chen, Y.M., Chang, C.Y., Chen, H.H., Hsieh, C.W., Tang, K.T., Yang, M.C., et al., 2018. Association between autophagy and inflammation in patients with rheumatoid arthritis receiving biologic therapy. *Arthritis Res. Ther.* 20 (1), 268.
- Chen, L.L., Todd, I., Tighe, P.J., Fairclough, L.C., 2020. Electronic cigarette vapour moderately stimulates pro-inflammatory signalling pathways and interleukin-6 production by human monocyte-derived dendritic cells. *Arch. Toxicol.* 94 (6), 2097–2112.
- Cummins, P.M., 2012. Occludin: one protein, many forms. *Mol. Cell Biol.* 32 (2), 242–250.
- Dohle, E., Singh, S., Nishigushi, A., Fischer, T., Wessling, M., Möller, M., et al., 2018. Human Co- and triple culture model of the alveolar capillary barrier on a basement membrane mimic. *Tissue Eng. C Methods* 24 (9), 495–503.
- Doryab, A., Schmid, O., 2022. Towards a gold standard functional readout to characterize in Vitro lung barriers. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 179, 106305.
- Dusautoir, R., Zarcone, G., Verrielle, M., Garçon, G., Fronval, L., Beauval, N., et al., 2021. Comparison of the chemical composition of aerosols from heated tobacco products, electronic cigarettes and tobacco cigarettes and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *J. Hazard Mater.* 401, 123417.
- Filomeni, G., De Zio, D., Ceconi, F., 2015. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* 22 (3), 377–388.
- Ganguly, K., Nordström, A., Thimraj, T.A., Rahman, M., Ramström, M., Sompa, S.I., et al., 2020. Addressing the challenges of E-cigarette safety profiling by assessment of pulmonary toxicological response in bronchial and alveolar mucosa models. *Sci. Rep.* 10 (1), 20460.
- Gao, W., Li, L., Wang, Y., Zhang, S., Adcock, I.M., Barnes, P.J., et al., 2015. Bronchial epithelial cells: the key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology* 20 (5), 722–729.
- Go, Y.Y., Mun, J.Y., Chae, S.W., Chang, J., Song, J.J., 2020. Comparison between in vitro toxicities of tobacco- and menthol-flavored electronic cigarette liquids on human middle ear epithelial cells. *Sci. Rep.* 10 (1), 2544.
- Goenka, S., Simon, S.R., 2021. Effects of E-cigarette refill liquid flavorings with and without nicotine on human retinal pigment epithelial cells: a preliminary study. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 18 (21), 11655.
- Harris, J., 2011. Autophagy and cytokines. *Cytokine* 56 (2), 140–144.
- Havermans, A., Krusemann, E.J.Z., Pennings, J., de Graaf, K., Boesveldt, S., Talhout, R., 2021. Nearly 20 000 e-liquids and 250 unique flavour descriptions: an overview of the Dutch market based on information from manufacturers. *Tobac. Control* 30 (1), 57–62.
- Hermanns, M.J., Unger, R.E., Kehe, K., Peters, K., Kirkpatrick, C.J., 2004. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Lab. Invest.* 84 (6), 736–752.
- Hill, C., Wang, Y., 2022. Autophagy in pulmonary fibrosis: friend or foe? *Genes Dis.* 9 (6), 1594–1607.
- Hu, F., Song, D., Yan, Y., Huang, C., Shen, C., Lan, J., et al., 2021. IL-6 regulates autophagy and chemotherapy resistance by promoting BECN1 phosphorylation. *Nat. Commun.* 12 (1), 3651.
- Hua, M., Omaiye, E.E., Luo, W., McWhirter, K.J., Pankow, J.F., Talbot, P., 2019. Identification of cytotoxic flavor chemicals in top selling electronic cigarette refill liquids. *Sci. Rep.* 9 (1), 2782.
- Iskandar, A.R., Gonzalez Suarez, I., Majeed, S., Marescotti, D., Sewer, A., Xiang, Y., et al., 2016. A framework for in vitro systems toxicology assessment of e-liquids. *Toxicol. Mech. Methods* 26 (6), 392–416.
- Khachaturian, C., Luo, W., McWhirter, K.J., Pankow, J.F., Talbot, P., 2021. E-cigarette fluids and aerosol residues cause oxidative stress and an inflammatory response in human keratinocytes and 3D skin models. *Toxicol. Vitro* 77, 105234.
- Khlystov, A., Samburova, V., 2016. Flavoring Compounds Dominate Toxic Aldehyde Production during E-Cigarette Vaping [Internet]. ACS Publications. American Chemical Society [cited 2022 May 26]. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.est.6b05145>.
- Lamb, T., Muthumalage, T., Rahman, I., 2020. Pod-based menthol and tobacco flavored e-cigarettes cause mitochondrial dysfunction in lung epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 333, 303–311.
- Landry, R.L., Groom, A.L., Vu, T.H.T., Stokes, A.C., Berry, K.M., Keshi, A., et al., 2019. The role of flavors in vaping initiation and satisfaction among U.S. adults. *Addict. Behav.* 99, 106077.
- Lehmann, A.D., Daum, N., Bur, M., Lehr, C.M., Gehr, P., Rothen-Rutishauser, B.M., 2011. An in vitro triple cell co-culture model with primary cells mimicking the human alveolar epithelial barrier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77 (3), 398–406.
- Lorkiewicz, P., Keith, R., Lynch, J., Jin, L., Theis, W., Krivokhizhina, T., et al., 2022. Electronic cigarette solvents, JUUL E-liquids, and biomarkers of exposure: in vivo evidence for acrolein and glycidol in E-cig-derived aerosols. *Chem. Res. Toxicol.* 35 (2), 283–292.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3 (6), 542–545.
- Morris, A.M., Leonard, S.S., Fowles, J.R., Boots, T.E., Mnatsakanova, A., Attfield, K.R., 2021. Effects of E-cigarette flavoring chemicals on human macrophages and bronchial epithelial cells. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 18 (21), 11107.
- Muthumalage, T., Lamb, T., Friedman, M.R., Rahman, I., 2019. E cigarette flavored pods induce inflammation, epithelial barrier dysfunction, and DNA damage in lung epithelial cells and monocytes. *Sci. Rep.* 9 (1), 19035.
- Nair, V., Tran, M., Behar, R.Z., Zhai, S., Cui, X., Phandthong, R., et al., 2020. Menthol in electronic cigarettes: a contributor to respiratory disease? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 407, 115238.
- Olmedo P, Goessler W, Tanda S, Grau -Perez Maria, Jarmul S, Aherrera A, et al. Metal concentrations in e cigarette liquid and aerosol samples: the contribution of metallic coils. *Environ. Health Perspect.* 126(2):027010.
- O'Farrell, H.E., Brown, R., Brown, Z., Miljevic, B., Ristovski, Z.D., Bowman, R.V., et al., 2021. E-cigarettes induce toxicity comparable to tobacco cigarettes in airway epithelium from patients with COPD. *Toxicol. Vitro* 75, 105204.
- Rahman, I., 2006. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur. Respir. J.* 28 (1), 219–242.
- Rickard, B.P., Ho, H., Tiley, J.B., Jaspers, I., Brouwer, K.L.R., 2021. E-cigarette flavoring chemicals induce cytotoxicity in HepG2 cells. *ACS Omega* 6 (10), 6708–6713.
- Saitoh, T., Akira, S., 2010. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J. Cell Biol.* 189 (6), 925–935.
- Scheffler, S., Dieken, H., Krischenowski, O., Förster, C., Branscheid, D., Aufderheide, M., 2015. Evaluation of E cigarette liquid vapor and mainstream cigarette smoke after direct exposure of primary human bronchial epithelial cells. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 12 (4), 3915–3925.
- Shi, C.S., Shenderov, K., Huang, N.N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K.A., et al., 2012. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* 13 (3), 255–263.
- Singh, D.P., Begum, R., Kaur, G., Bagam, P., Kambiranda, D., Singh, R., et al., 2021. E-cig vapor condensate alters proteome and lipid profiles of membrane rafts: impact on inflammatory responses in A549 cells. *Cell Biol. Toxicol.* 37 (5), 773–793.
- Son, Y., Mainelis, G., Delnevo, C., Wackowski, O.A., Schwander, S., Meng, Q., 2020. Investigating E-cigarette particle emissions and human airway depositions under various E-cigarette-use conditions. *Chem. Res. Toxicol.* 33 (2), 343–352.
- Su, L., Zhao, M., Ma, F., An, Z., Yue, Q., Zhao, C., et al., 2022. A comparative assessment of e cigarette aerosol extracts and tobacco cigarette smoke extracts on in vitro endothelial cell inflammation response. *Hum. Exp. Toxicol.* 41, 09603271221088996.
- Taylor, J.D., 2010. COPD and the response of the lung to tobacco smoke exposure. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 23 (5), 376–383.
- Wang, Y., Xu, J., Meng, Y., Adcock, I.M., Yao, X., 2018. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 13, 3341–3348.
- Wang, L., Wang, Y., Chen, J., Yang, X.M., Jiang, X.T., Liu, P., et al., 2021. Comparison of biological and transcriptomic effects of conventional cigarette and electronic cigarette smoke exposure at toxicological dose in BEAS 2B cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 222, 112472.
- Wang, L., Wang, Y., Chen, J., Liu, P., Li, M., 2022. A review of toxicity mechanism studies of electronic cigarettes on respiratory system. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (9), 5030.
- Wiebe, J.P., Kowalik, A., Gallardi, R.L., Egeler, O., Clubb, B.H., 2000. Glycerol disrupts tight junction—associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells. *J. Androl.* 11.
- Woodall, M., Jacob, J., Kalsi, K.K., Schroeder, V., Davis, E., Kenyon, B., et al., 2020. E-cigarette constituents propylene glycol and vegetable glycerin decrease glucose uptake and its metabolism in airway epithelial cells in vitro. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 319 (6), L957–L967.
- Zanetti, F., Giacomello, M., Donati, Y., Carnesecchi, S., Frieden, M., Barazzzone-Argiroffo, C., 2014. Nicotine mediates oxidative stress and apoptosis through cross talk between NOX1 and Bcl-2 in lung epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 76, 173–184.

Mise en place de méthodologies analytiques et de modèles cellulaires permettant l'identification d'éléments potentiellement toxiques présents dans l'aérosol d'e-cigarette

Résumé

Les nouveaux systèmes de délivrance de nicotine, dont la cigarette électronique (CE), sont régulièrement présentés comme des outils de substitution nicotinique. Les autorités de santé restent prudentes quant à l'utilisation de tels dispositifs étant donné le manque de données toxicologiques. Mon projet de thèse vise à étudier la toxicité en région pulmonaire, des e-liquides (EL), sans nicotine, contenus dans les CE. Les arômes fruits rouges, largement consommés, ont été étudiés et décomposés en 4 arômes distincts (fraise, framboise, myrtille et mûre).

Pour ce faire, un nouveau modèle cellulaire de Barrière Alvéolo-Capillaire (BAC) a été validé et a été exposé de manière plus ou moins directe aux EL/aérosols via 3 méthodes d'exposition distinctes. Plusieurs réponses cellulaires dont les modulations de l'intégrité de la barrière et du stress oxydant mitochondrial ont été mises en évidence. Ces réponses cellulaires varient selon la méthode d'exposition et suggèrent que les processus d'aérosolisation ne sont pas sans risque. De plus, l'identification des composés chimiques indique des réponses cellulaires dépendantes de chaque arôme considéré.

Mots clés : e-liquide, arôme, barrière alvéolo-capillaire, aérosol, cytotoxicité, méthode analytique

Abstract

New nicotine delivery systems, including the electronic cigarette (EC), are regularly presented as nicotine replacement tools. Health authorities remain cautious about the use of such devices, given the lack of toxicological data. The aim of my thesis project is to study the toxicity of nicotine-free e-liquids (EL) contained in ECs in the pulmonary region. The widely consumed red berry flavours were studied and broken down into 4 distinct flavours (strawberry, raspberry, blueberry and blackberry). To do this, a new cellular model of the Alveolar-Capillary Barrier (ACB) was validated and exposed more or less directly to EL/aerosols via 3 distinct exposure methods. Several cellular responses were identified, including modulations of barrier integrity and mitochondrial oxidative stress. These cellular responses vary according to exposure method, and suggest that aerosolization processes are not risk-free. In addition, the identification of chemical compounds indicates that cellular responses depend on the flavour considered.

Keywords : e-liquid, flavour, alveolar-capillary barrier, aerosol, cytotoxicity, analytical method