

## Synthèse publiable du rapport final

<b>Titre du projet</b>	Impacts clinico-biologiques des systèmes électroniques de délivrance de nicotine sur la barrière broncho alvéolo capillaire et l'évolution de la bronchopneumopathie chronique obstructive (Séro-BPCO)
<b>Coordonnateur scientifique du projet</b>	Véronique KEMMEL Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neuro-Cardiovasculaire UR7296 Université de Strasbourg
<b>Référence de l'appel à projets (année)</b>	Appels à projets de Lutte contre le Tabagisme - 2019

### Contexte et objectifs du projet

Le tabagisme est connu pour induire des pathologies pulmonaires telles que la broncho pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Les mécanismes physiopathologiques de la BPCO sont identifiés comme étant une réponse inflammatoire chronique due successivement à la dégradation, des réparations incomplètes puis une destruction du tissu pulmonaire. Ceci se traduit par un emphysème et une fibrose des alvéoles respiratoires. Si le lien entre la BPCO et le tabagisme est incontestable, celui entre la BPCO et l'utilisation de systèmes électroniques de délivrance de nicotine (ENDS) ou e-cigarettes reste en questionnement. De récentes études ont montré que l'exposition aux ENDS peut induire une BPCO dans certaines conditions d'utilisation qu'il reste à déterminer avec plus de précision [1]. En effet, les ENDS contiennent des véhicules comme le propylène glycol (PG) et la glycérine végétale (VG), souvent de la nicotine et certains arômes. Parmi ces arômes, on retrouve des molécules qui sont de potentiels toxiques (formaldéhydes, acroléine) car ils induisent des réactions inflammations aiguës des bronches et des bronchioles [2].

Par ailleurs, il a été démontré un possible lien entre la BPCO et le système sérotoninergique. Ainsi, une augmentation plasmatique de sérotonine (5-HT), concomitante à une augmentation du stress oxydant pulmonaire, existerai dans la BPCO. Mais les rares études sur le sujet ne permettent pas de confirmer ni d'identifier le rôle physiopathologique de la sérotonine dans la BPCO, même si les concentrations plasmatiques de 5-HT ou de certains de ses métabolites semblent corrélées à une évolution négative de la maladie [3].

Nos objectifs ont été de démontrer que : (1) Notre modèle cellulaire de barrière alvéolo capillaires (BAC) possède toutes les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de la barrière alvéolo capillaire du tissu pulmonaire humain et que la BAC possède bien certains éléments du système sérotoninergique. (2) L'exposition de ce modèle cellulaire aux e-liquides et à leurs différents composants augmente la perméabilité de la BAC et facilite le passage de la nicotine et des petites molécules présentes dans les e-liquides à travers cette barrière. (3) Les ENDS et ces composants induisent dans notre modèle cellulaire et selon une relation effet/dose des effets moléculaires, cellulaires et tissulaires aboutissant à une cytolysse et à l'autophagie cellulaire en lien avec une augmentation du stress oxydant dans le tissu alvéolaire et plus largement pulmonaire.

## Méthodologie utilisée

Dans cette étude, nous avons construit et validé plusieurs modèles cellulaires ayant les caractéristiques de la barrière alvéolo capillaire humaine et des sous types macrophagiques humains. Nous avons également souhaité développer un modèle murin de BPCO induit après une exposition intensive à la cigarette classique.

La validation des modèles cellulaires a été réalisée grâce à des techniques de biologie moléculaire et cellulaire permettant de vérifier que les lignées cellulaires, d'origine humaine, utilisées dans nos différents modèles possédaient bien les éléments protéiques nécessaires à leurs fonctions et que ces fonctions étaient mesurables et comparables à celle habituellement trouvées chez l'Homme.

Ensuite, nous avons pu mesurer l'impact des différents composants d'e-liquides sur les cellules de la BAC. Les constituants d'e-liquides testés ont été : la nicotine, les véhicules (PG, VG) seuls et mélangés à différentes proportions (50/50 et 76/24) ainsi que des e-liquides commercialisés ne contenant pas de nicotine mais des arômes très prisés par les consommateurs « Mint Eucalyptus », « Red Fruits » et « Blond Tobacco ». Enfin, deux e-liquides utilisés dans un essai clinique VapExpAir, EL1 et EL2, contenant tous les deux de la nicotine à 6 mg/ml, de l'arôme « Blond Tobacco » mais des proportions différentes de PG et de VG (EL1 à 50/50 et EL2 à 76/24).

Des marqueurs spécifiques de la perméabilité cellulaire, de la cytolyse, de l'apoptose et de l'autophagie cellulaire ont été mesurés après une exposition des cellules à des doses croissantes de chacun des constituants d'e-liquide ou aux e-liquides commercialisés. Cela a permis d'obtenir des courbes effet/dose pour chaque condition expérimentale. Nous avons également recherché les mécanismes inducteurs de ces phénomènes en mesurant l'osmolarité des milieux de culture cellulaire, la formation des ions superoxydes mitochondriaux qui sont des éléments du stress oxydant intracellulaire, mais aussi en mesurant l'évolution du niveau d'expression de certaines protéines. Par exemple, l'expression des protéines de jonction, comme l'occludine, ont été mesurées car elles sont fortement impliquées dans la fonctionnalité de « barrière » de la BAC.

Pour ce qui concerne le modèle murin de BPCO, nous avons exposé pendant un mois de manière intensive des souris à la fumée de cigarette classique. La validation de ce modèle murin de BPCO, nous servira par la suite de notre contrôle positif pour de futures expérimentations de souris exposées à la même quantité de nicotine mais délivrées par des ENDS.

## Principaux résultats obtenus

- *Apports en termes de connaissance*

Lors de notre étude, nous avons construit des outils nécessaires à l'étude d'impact des e-liquides et de leurs composés sur la barrière alvéolo capillaire. Ainsi, à partir de deux lignées cellulaires d'origine humaine, nous avons reconstitué in vitro une BAC, constituée de cellules épithéliales alvéolaires et de cellules endothéliales. Cette modélisation cellulaire, nous a permis de mettre en évidence que les cellules épithéliales alvéolaires sont principalement à l'origine de la fonction de barrière en augmentant la résistance trans épithélio endothéliale

(TEER). Il n'empêche que l'association de ces deux types cellulaires induit un effet synergique augmentant les propriétés de barrière du modèle de BAC.

La mise en contact des différents éléments composants les e-liquides avec les cellules de la BAC, nous a permis de construire des courbes effet/dose pour chacun de ces composés. Ainsi, nous avons pu déterminer qu'une exposition de la BAC aux véhicules des ENDS (PG, VG et PG/VG à 50/50 ou 76/24) induit, à partir de 1% de véhicule, une augmentation significative de l'osmolarité du milieu de culture cellulaire et proportionnelle à la quantité de véhicule ajouté. Cela entraîne des réactions cellulaires immédiates qui se traduisent par (1) une augmentation de la perméabilité de la BAC, mesurée par une diminution de la TEER, (2) une augmentation de l'expression de l'occludine qui est une protéine de jonction cellulaire et permet au tissu de résister à l'hyperosmolarité en renforçant les jonctions cellulaires et pour finir (3) à une mort cellulaire par cytolysse. Les ED50 mesurés, c'est-à-dire les concentrations auxquelles 50% de l'effet total est observé, sont les mêmes approximativement pour tous les véhicules testés, soit environ 10%. Lors d'une séance de vapotage de 11 minutes, nous avons déterminé, dans l'essai clinique VapExpAir, qu'en moyenne 0,2 mg d'e-liquide était vapoté soit un maximum de 0,5% d'e-liquide, si toute la vapeur entraînée s'est solubilisée dans le surfactant alvéolaire, ce qui n'est jamais le cas. Ces premiers résultats signifient qu'après un premier contact entre les cellules épithéliales et les e-liquides, l'hyperosmolarité induit une ouverture de la BAC, le passage des petites molécules du compartiment alvéolaire vers le compartiment systémique et leur dilution dans le sang. Ce phénomène d'absorption permet de limiter dans le temps les effets hyperosmolaires des ENDS sur les cellules de la BAC et permet aussi d'expliquer la sensation de soif de certains vapoteurs après une séance intensive de vapotages car leur osmolarité sanguine peut dans ce cas précis légèrement augmenter. Bien entendu, plus la fréquence et l'intensité du vapotage sont importantes et plus les effets des véhicules seront délétères pour la BAC.

Nous avons réalisé les mêmes tests avec de la nicotine à des concentrations croissantes et avons constaté les mêmes effets mais sans hyperosmolarité. Ainsi, une diminution de la TEER (ED50 d'environ 30  $\mu$ M soit 4,9 mg/L) a montré que la nicotine ouvre la BAC, puis provoque une cytolysse cellulaire pour des concentrations environ 3 fois supérieures (ED50 de 100  $\mu$ M soit 16,2 mg/L). La prise de nicotine lors d'une séance de vapotage est d'environ 1 mg. Dilué dans environ 40 ml de surfactant alvéolaire, cela représente 25 mg/L soit 154  $\mu$ M de nicotine, ce qui est proche de l'ED50 provoquant la cytolysse. Cependant, toute la nicotine n'est pas solubilisée dans le surfactant et elle traverse très rapidement la BAC pour être très fortement diluée dans le sang. Le pic artériel d'absorption de la nicotine se situe à des concentrations maximales comprises entre 600 et 1 000 ng/L et ces concentrations n'induisent aucun effet (TEER, cytolysse, expression de l'occludine) sur notre modèle cellulaire de la BAC. Ainsi, nous avons pu conclure que si le vapotage expose les cellules à des concentrations toxiques de nicotine, cette exposition très brève en limite les effets à long terme. Cependant un vapotage intensif pourrait être plus délétère.

Les mêmes tests ont été réalisés avec des e-liquides commercialisés contenant des arômes. L'ajout d'arômes dans les véhicules et sans nicotine montre que les arômes ont un impact non négligeable sur la BAC. En effet, les e-liquides contenant des arômes « Mint Eucalyptus » et « Red Fruits » ont des ED50 de 1 à 6% alors que les véhicules sont à plus de 10%. Cela signifie que ces arômes sont plus toxiques pour les cellules que les véhicules seuls. L'e-liquide contenant l'arôme « Blond Tobacco » a cependant un ED50 similaire aux véhicules.

Ainsi, nous avons pu conclure que les arômes ne sont pas tous égaux et que les molécules qui les composent sont les éléments déterminants de leur toxicité cellulaire.

Dans ce travail, nous nous sommes également intéressés à l'impact des composés des e-liquides sur la formation d'ions superoxyde dans la mitochondrie. Ce marqueur du stress oxydant est augmenté lors de l'exposition des cellules épithéliales de la BAC à tous les composants des e-liquides mais de manière inégale. Ainsi, la nicotine et les e-liquides contenant des arômes « Mint Eucalyptus » et « Red Fruits » induisent une augmentation de production d'ions superoxyde importante deux minutes après exposition, les courbes effet/dose ont donné des ED50 à 27  $\mu$ M, 6% et 7,5% respectivement. Cela montre qu'un stress oxydant est induit en plus de la réponse des cellules à l'hyperosmotiques. Plus intéressant, les e-liquides ayant un arôme « Blond Tobacco » montrent une augmentation d'ions superoxydes similaire aux véhicules lorsqu'ils ne contiennent pas de nicotine, en revanche, les liquides EL1 et EL2 contenant 6 mg/ml de nicotine, induisent une augmentation d'ions superoxydes similaire à celle obtenue lors de l'exposition à la nicotine ou au e-liquide contenant de l'arôme « Red Fruits » sans nicotine. Ce dernier résultat, montre bien l'impact négatif de la nicotine induisant une augmentation de l'activité mitochondriale et du stress oxydant intracellulaire.

D'autres types de mort cellulaire ont également été étudiés après exposition de notre modèle cellulaire aux composés des e-liquides, comme l'apoptose souvent induite par un stress oxydant. Nos résultats ont montré une légère induction, mais non significative, des phénomènes apoptotiques. En revanche, une augmentation significative de l'expression des protéines vésiculaires LCB3 I et II a indiqué l'entrée des cellules dans des processus formant des vésicules intracellulaires et aboutissant à une autophagie cellulaire.

- *Apports en termes d'action de santé publique*

Nos résultats, permettent de mettre en évidence le rôle délétère d'une consommation intense d'ENDS. Parmi les composés les plus impliqués dans ces effets toxiques, nous pouvons citer la nicotine et certains arômes « Mint Eucalyptus » et « Red Fruits ».

Ces résultats, sous-entendent également que l'usage des ENDS dans un cadre de réduction des risques tabagiques ne peut être envisagé que sur de courtes durées et avec un objectif d'arrêt complet de l'usage des ENDS et pas dans un cadre d'un remplacement de la cigarette classique par des ENDS avec ou sans nicotine. Par ailleurs, l'utilisation des ENDS dans un éventuel objectif de sevrage tabagique ne pourra se faire qu'avec des e-liquides et générateurs de vapeur maîtrisés ; c'est-à-dire, dont les constituants (arômes et systèmes de chauffe) validés en termes de sécurité d'utilisation de manière à empêcher les mésusages.

### **Impacts potentiels de ces résultats et perspectives pour la décision publique**

Nos résultats montrent qu'une utilisation à forte fréquence d'e-liquides contenant des arômes tels que « Mint Eucalyptus » ou « Red Fruits » et de la nicotine quel que soit le véhicule, peut avoir un impact délétère sur la barrière alvéolo capillaire et potentiellement induire une BPCO. Cependant, il existe très peu de résultats sur la composition exacte des arômes et aucune garantie n'est donnée au consommateur que les e-liquides qu'il achète ne provoquent pas de réponses cellulaires telles que celles identifiées lors de nos expérimentations (stress oxydant, cytolysse, autophagie). Et de nombreuses études

complémentaires sont nécessaires afin de pouvoir faire un tri efficace entre les molécules aromatiques considérées comme toxiques lors du vapotage et celles utilisables dans les e-liquides. Seules des études indépendantes, et bien argumentées permettront l'éviction des molécules à risques et la mise en place une réglementation claire. Par ailleurs, des études cliniques sont également à promouvoir de manière à trancher la question de l'intérêt du vapotage dans l'arrêt du tabagisme. Ainsi, des essais cliniques ayant pour objectif d'identifier les indications des ENDS dans le sevrage à la nicotine et quels patients cela concerne. Par ailleurs, chez ces patients (s'ils en existent), il deviendra indispensable de leur proposer des produits sécurisés sur la base de bonnes pratiques pharmaceutiques et cliniques.

## Références

1. Higham, A.; Bostock, D.; Booth, G.; Dungwa, J.V.; Singh, D. The Effect of Electronic Cigarette and Tobacco Smoke Exposure on COPD Bronchial Epithelial Cell Inflammatory Responses. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2018, 13, 989–1000, [doi:10.2147/COPD.S157728](https://doi.org/10.2147/COPD.S157728).
2. Sun, Y.-W.; Chen, K.-M.; Atkins, H.; Aliaga, C.; Gordon, T.; Guttenplan, J.B.; El-Bayoumy, K. Effects of E-Cigarette Aerosols with Varying Levels of Nicotine on Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation in Mice. *Chem Res Toxicol* 2021, 34, 1161–1168, [doi:10.1021/acs.chemrestox.1c00033](https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00033).
3. Lau, W.K.W.; Chan-Yeung, M.M.W.; Yip, B.H.K.; Cheung, A.H.K.; Ip, M.S.M.; Mak, J.C.W.; COPD Study Group of the Hong Kong Thoracic Society The Role of Circulating Serotonin in the Development of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One* 2012, 7, e31617, [doi:10.1371/journal.pone.0031617](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031617).