AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par

Iuliana Angelica CEPUC (épouse TIOTIU)

LA MODULATION DU REFLEXE DE TOUX PAR L'EXERCICE CHEZ LE LAPIN SENSIBILISE A L'OVALBUMINE

---

14 12 2016

Membres du jury :

Président : M. Yves MARTINET	PU-PH, Université de Lorraine, Nancy

Rapporteurs :

M. Christian STRAUS	PU-PH, Sorbonne Universités, Paris
Mme. Anne CHARLOUX	PU-PH, Université de Strasbourg, Strasbourg

Examinateurs :

M. Bruno CHENUEL	PU-PH, Université de Lorraine, Nancy (Directeur)
Mme. Camille TAILLE	MCU-PH, Université Paris-Diderot, Paris
M. Mathias POUSSEL	MCU-PH, Université de Lorraine, Nancy

EA 3450 - DevAH - Développement, Adaptation et Handicap. Régulations cardio-respiratoires et de la motricité. Université de Lorraine

REMERCIEMENTS

A mes directeurs de thèse

Monsieur le Professeur Bruno CHENUEL
Professeur de Physiologie

Merci pour votre aide, vos bons conseils et votre soutien.

Monsieur le Docteur Mathias POUSSEL
Maître de Conférences de Physiologie

Merci pour m'avoir accompagné dans ce travail.
Merci pour ton implication, tes conseils, tes remarques pertinentes et constructives.

A mes rapporteurs de thèse

Monsieur le Professeur Christian STRAUS
Professeur de Physiologie

&

Madame le Professeur Anne CHARLOUX
Professeur de Physiologie

Je vous exprime ici ma plus profonde reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail. Merci.

A mon président de jury M. Yves MARTINET
Professeur de Pneumologie

Merci de m'avoir toujours aidée et soutenue dans mes projets professionnels.

Au **Dr. Camille TAILLE**
Maitre de Conférences de Pneumologie

Merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse. Je vous considère comme la meilleure asthmologue de France et vous êtes un modèle de réussite pour moi.

Au Pr. Alain Didier, professeur de pneumologie à Toulouse

Pour l'accord d'utiliser dans ma thèse certaines images publiées dans le livre « Toux chronique » (Edition Margauxorange 2015).

Au **Pr. Philippe Devillier, professeur de Pharmacologie à Paris**

Pour les discussions scientifiques intéressantes sur la physiopathologie de la toux chronique.

Au **Pr. Christo Christov, professeur d'Histologie à Nancy**

Pour son aide dans la relecture des lames pour étude cytologique du LBA.

A toute **l'équipe EA 3450 – DevAH de l'Université de Lorraine**

Pour l'accompagnement et l'apprentissage des travaux pratiques ainsi que le soutien logistique du laboratoire.

A ma mère Aspazia,
Pour son soutien, son aide précieuse et ses encouragements.

A mes filles Delia et Diana,
Pour leur compréhension.

A **l'éditeur MargauxOrange** pour l'accord d'utiliser certaines images publiées dans le livre « Toux chronique » 2015 ainsi qu'aux auteurs des articles dont les figures sont insérées.

TABLE DES MATIERES

A. INTRODUCTION 1
B. PARTIE GENERALE 4
I. TOUX 5
1. Caractérisation des réflexes de défense respiratoire : réflexe de toux et réflexe expiratoire 5
2. Mécanique du réflexe de toux 7
3. Physiologie et physiopathologie de la toux 10
3.1 Description de l'arc réflexe de toux 12
3.1.1 Voie sensitive 14
3.1.2 Centres de la toux 22
3.1.3 Voie motrice 25
3.2 Mécanismes de passage à la chronicité 27
II. TOUX, ASTHME, ALLERGIE 32
1. Toux - Asthme 32
2. Toux- Allergie respiratoire 35
3. Toux - Bronchite à éosinophiles 36
4. Rôle de l'inflammation bronchique à éosinophilies dans la modulation de la toux 37
III. TOUX ET EXERCICE 46
1. Données cliniques et épidémiologiques 46
2. Physiopathologie de la toux à l'exercice 47

C. ETUDE 53
I. INTRODUCTION 54
II. MATERIEL ET METHODES 57
1. Considérations éthiques 57
2. Protocole de sensibilisation à l'ovalbumine (OVA) 57
3. Evaluation de la présence de la sensibilisation 58
3.1 Tests cutanés intradermiques 58
3.2 Lavage bronchiolo-alvéolaire (LBA) 59
3.3 Analyse en microscopie optique et comptage cellulaire du LBA : 59
4. Anesthésie et préparation chirurgicale 59
4.1 Protocole d'anesthésie 59
4.2 Préparation chirurgicale 60
5. Acquisition des signaux 61
6. Variables ventilatoires 62
7. Stimulation électrique rythmique entraînant des contractions musculaires (EMC) au niveau des pattes arrières 62
8. Stimulation trachéale et analyse de la réponse respiratoire 63
9. Electromyographie des muscles abdominaux 65
10. Protocole 65
11. Analyse des données 65
III. RESULTATS 67
1. Tests cutanés à l'OVA et étude cytologique du LBA 67
2. Analyse des variables fonctionnelles respiratoires 70
3. Réponses ventilatoires à la stimulation trachéale 71
IV. DISCUSSION 75
V. CONCLUSION 90
D. SYNTHESE ET PERPECTIVES 91
E. RÉFÉRENCES 93

LISTE DES ABREVIATIONS

AR : Absence de Réponse

ARNm : Acide ribonucléique messager ARNm

ASIC : Acid sensing ion channels

ATP : Adénosine TriPhosphate

CGRP: Calcitonin Gene-Related Peptide

ET : Ecart Type

GPCR : G protein coupled receptors

5-HT : 5- Hydroxytriptamine

NTS : Noyau du tractus solitaire

PA : Potentiel d'Action

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

RARs : Rapidly Adapting Pulmonary strech Receptors

RE : Réflexe Expiratoire

RT : Réflexe de Toux

RT-PCR : Retrotranscriptase-PCR

SARs : Slowly Adapting Pulmonary strech Receptors

T_E : Temps expiratoire

T_I : Temps inspiratoire

TRP : Transient Receptor Potential

TRPA1 : Transient Receptor Potential Ankyrin 1

TRPM 8: Transient Receptor potential melastatin 8

TRPV : Transient Receptor Potential Vanilloid

$V'E_{pic}$: Pic de débit expiratoire

V_T : Volume courant

A. INTRODUCTION

La toux est un motif de consultation fréquent auprès des médecins généralistes et spécialistes. La prévalence des consultations pour toux chronique (définie par une durée supérieure à 8 semaines) en Europe et aux Etats Unis est estimée à 6% chez le médecin généraliste et de 10 à 30% chez le pneumologue (Chung and Pavord, 2008). Certaines études européennes ont retrouvé une prévalence plus élevée de la toux sèche chez la femme (6,2% vs 4,6% chez l'homme dans la population britannique) (Ford et al., 2006; Janson et al., 2001).

La toux peut être le symptôme de très diverses pathologies respiratoires telles que l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou la fibrose pulmonaire mais elle peut avoir d'autres origines : digestive (ex. reflux gastro-oesophagien), ORL (ex. syndrome de rhinorrhée postérieure), médicamenteuse (ex. inhibiteurs de l'enzyme de conversion), toxique (ex. tabac, pollution aérienne extérieure, en particulier par les particules PM10), allergique, ou encore psychologique. Souvent négligée par le patient, la toux ne commence à être prise en compte que lorsqu'elle devient chronique et elle peut devenir une maladie invalidante avec retentissement important sur la qualité de vie des patients (Didier, 2015).

A ce jour, il n'y a pas d'enquête récente sur la prévalence de la toux en France. Selon l'étude française E3N chez la femme en période péri-ménopausique et ménopausique selon les auto-questionnaires la prévalence de la toux chronique est de 12,9% chez les asthmatiques (n=364) et de 5,6% chez les patientes non-asthmatiques (n=377) comparables aux résultats de l'étude EGEA sur des familles d'asthmatiques avec 12,3% de toux chroniques chez les asthmatiques (n=818) vs 5,7% chez les non-asthmatiques (n=1048). Ces résultats viennent confirmer ainsi la forte association entre toux chronique et asthme, et jusitfient que l'asthme doit être systématiquement recherché devant une toux chronique (Kauffmann and Varraso, 2011).

Indépendamment de l'asthme et de la rhinite allergique, causes reconnues de toux, certains auteurs identifient une entité appelée dans la littérature anglo-saxonne « atopic cough » (Magni et al., 2010), définie par la présence d'une toux survenant chez un patient atopique (éosinophilie sanguine ou bronchique, élévation des Ig E totales à plus de 200 UI/ml, tests cutanés aux pneumallergènes positifs avec des

élévations des Ig E spécifiques pour ces mêmes pneumallergènes) mais sans avoir des critères cliniques ou fonctionnels d'asthme ou d'atteinte ORL (Fujimura et al., 2003).

Si le clinicien aborde la toux comme une maladie pour laquelle il faut trouver non seulement une étiologie, mais aussi un traitement adapté (tâche difficile étant donné la multitude de causes et l'absence de traitements réellement efficaces si pas d'identification étiologique formelle), le physiologiste est surtout intéressé par les mécanismes physiopathologiques qui sont à l'origine de ce réflexe.

Historiquement, la toux a été clairement décrite en 1840 par Williams, en provoquant un puissant effort expiratoire associé à une fermeture de glotte, par l'insertion de son propre doigt dans le larynx d'un chien non anesthésié (Widdicombe, 2006). Les trois phases de la toux ont alors été identifiées et décrites : phase inspiratoire, phase d'effort expiratoire à glotte fermée et phase expiratoire expulsive avec ouverture de la glotte, accompagnée d'un son. Suite à des travaux ultérieurs, les réponses de défense respiratoire ont été différenciés en réflexe de toux (RT) et en réflexe expiratoire (RE), en fonction de la préexistence ou non d'une brève période d'inspiration initiale (Fontana and Widdicombe, 2007; Korpas, 1972).

La toux est une activité réflexe répondant à un arc réflexe, ayant un mécanisme de réponse intégrée faisant intervenir un centre nerveux, des récepteurs, des voies afférentes, efférentes et des effecteurs. En tant que réflexe de défense respiratoire, sa fonction première est de protéger les voies aériennes d'une agression : corps étranger, sécrétions. De nombreux stimuli peuvent être à l'origine de la toux : stimulation mécanique trachéale, accumulation de sécrétions, aspiration, particules solides, capsaïcine, bradykinine, variation de la température, allergènes ainsi que les modifications à l'origine d'une altération du pH ou de la tonicité du liquide bronchique (Didier, 2015).

Le réflexe de toux débute par l'activation de récepteurs spécifiques localisés dans les voies aériennes classés en trois catégories : les récepteurs des fibres Aδ du type « *Slowly Adapting Receptors* » (SARs) et du type *« Rapidly Adapting Receptors »* (RARs) et les récepteurs de fibres C (Didier, 2015). L'activation de ces récepteurs va générer des potentiels d'action qui seront véhiculés par les voies afférentes vagale, trigéminée et de la racine dorsale jusqu'au noyau du tractus solitaire (NTS) dans le tronc cérébral (Didier, 2015). Il existe de nombreuses connexions corticales ou avec les noyaux des neurones respiratoires. Il y a plusieurs

régions cérébrales qui interviennent dans la modulation de la toux, comme démontré par des études d'imagerie cérébrale fonctionnelle avec inhalation de capsaïcine : cortex sensoriel primitif, cortex insulaire, cortex cingulaire antérieur et régions cérébelleuses (Chung and Pavord, 2008). Les voies efférentes empruntent le nerf phrénique pour le diaphragme, les nerfs spinaux pour les muscles expiratoires et les nerfs laryngés pour la glotte, permettant l'effort moteur de toux via des motoneurones effecteurs (Chung and Widdicombe, 2009).

Malgré les multiples recherches dans le domaine de la toux, les mécanismes physiopathologiques sont loin d'être clairs, surtout sur le rôle joué par l'inflammation bronchique à éosinophiles dans l'augmentation de la sensibilité de la toux et le rôle de l'exercice dans la modulation de ce réflexe.

Ce travail est structuré en deux parties. La première partie est constituée d'une revue de la littérature sur les connaissances actuelles à propos de la toux (mécanismes, physiopathologie), les interactions entre l'inflammation bronchique à éosinophiles et la toux et le rôle de l'exercice dans la modulation de la toux. Dans la seconde partie, nous présentons les résultats de notre étude originale sur la modulation par l'exercice de la réponse défensive à une stimulation trachéale mécanique, sur un modèle animal sensibilisé à l'ovalbumine (OVA) comparé à un échantillon d'animaux contrôles. Enfin, nous confronterons ces données expérimentales animales aux données de la littérature afin d'envisager les perspectives pratiques de nos résultats.

B. PARTIE GENERALE

I. TOUX

1. Caractérisation des réflexes de défense respiratoire : réflexe de toux et réflexe expiratoire

La toux est le résultat d'une contraction spasmodique brutale et souvent répétitive de la cavité thoracique, ayant comme conséquence une expulsion violente d'air des poumons et habituellement accompagnée d'un son distinctif (Didier, 2015).

Classiquement, on décrit le réflexe de toux (RT) en 3 phases (**Figure 1**): une première phase inspiratoire, suivie d'une phase d'effort expiratoire à glotte fermée, appelée « phase compressive » et qui se termine par une phase expiratoire expulsive contemporaine de l'ouverture soudaine de la glotte (Brooks, 2011; Knudson et al., 1974). Si la phase inspiratoire initiale est absente, on parle alors de réflexe expiratoire (RE), comme il a été défini par Widdicombe en 2006 (Widdicombe and Fontana, 2006).

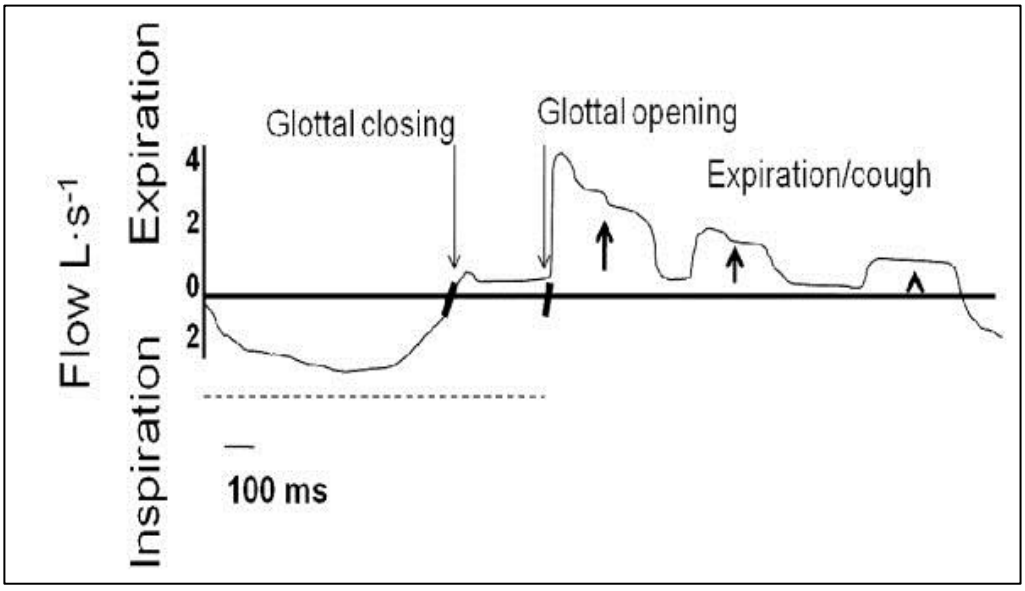
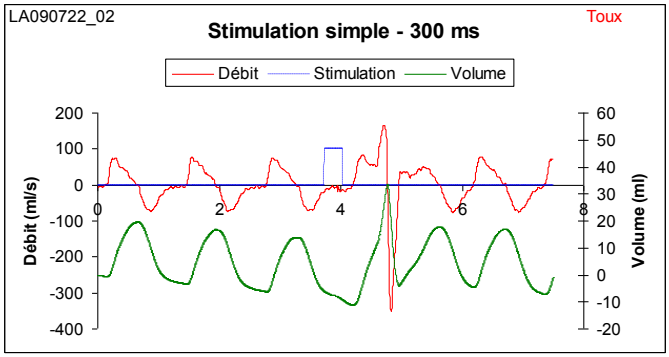


Figure 1. Représentation des phases de la toux avec la variation du débit respiratoire dans chaque phase (Brooks, 2011). Par ordre chronologique : fermeture de la glotte puis ouverture de la glotte avec expiration expulsive

Dans la **figure 2**, on peut visualiser le RT et le RE (comme décrit par Widdicombe) chez deux animaux (lapins) enregistrés dans notre laboratoire, en réponse à une stimulation mécanique trachéale. Dans la **figure 2A**, lors d'une stimulation mécanique trachéale de 300 ms on observe une augmentation

concomitante du volume courant et du débit ventilé, correspondant à un réflexe de toux (RT). Dans la **figure 2B**, lors d'une stimulation mécanique trachéale similaire, il existe seulement une augmentation du débit ventilé, non précédée de l'augmentation du volume courant et correspondant donc à la définition du réflexe expiratoire (RE).

A



B

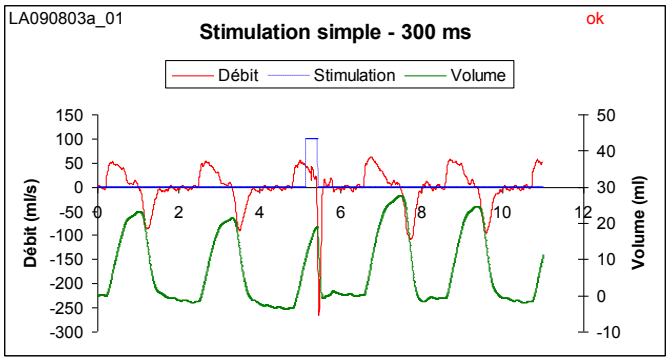


Figure 2 : Réponses ventilatoires à une stimulation trachéale mécanique d'une durée de 300 ms (images personnelles enregistrées par Dr. Poussel)

A : Réflexe de toux (RT) caractérisé par une augmentation concomitante du volume courant et du débit ventilé.

B : Réflexe expiratoire (RE) caractérisé par une augmentation du débit ventilé, non précédée d'une augmentation du volume courant.

Les deux réponses défensives sont différentes pas seulement en terme de description de la mécanique respiratoire, mais aussi du point de vue des mécanismes physiologiques mis en jeu. Il est connu que la fonction de ces 2 réflexes est différente. En effet, la phase inspiratoire du RT permet l'entrée d'une quantité importante d'air dans les poumons qui va augmenter encore un peu plus la force de la phase expulsive, afin de l'optimiser (Widdicombe and Fontana, 2006).

La fonction première de ce RT est donc le drainage trachéo-bronchique, en assurant la clairance du mucus et des particules déposées dans l'arbre trachéo-bronchique. Pour le RE, du fait de l'absence de phase inspiratoire, la finalité est plutôt la prophylaxie de l'entrée de corps étrangers et de particules dans l'arbre trachéo-bronchique (Widdicombe and Fontana, 2006).

A l'heure actuelle, il y a aussi des arguments en faveur d'une probable modulation physiologique différente pour les deux réflexes Du point de vue développemental, chez le nouveau-né, le RE apparaît plus tôt que le RT (Korpas and Kalocsayova, 1973). L'activation du réflexe de Hering-Breuer (mis en jeu lors de l'inflation pulmonaire) favorise la survenue du RE alors qu'il n'a pas ou que très peu d'effet sur le RT (Hanacek et al., 2006) ; un niveau élevé de pression partielle de CO_2 dans le sang artériel inhibe le RT mais n'affecte pas le RE (Tatar et al., 1986) ; les agents anesthésiques inhibent plus fortement le RE que le RT (Nishino et al., 1996) ; des agents pharmacologiques comme la codéine qui inhibe le RT n'a aucun effet sur le RE aux posologies usuelles pour l'effet antitussif (Korpas, 1972).

2. Mécanique du réflexe de toux

Chez l'homme, ce réflexe est décrit en trois phases :

- **Phase inspiratoire**

La phase inspiratoire commence par une contraction des muscles abducteurs du cartilage aryténoïde entraînant une ouverture complète de la glotte et facilitant l'inhalation d'air (Sant'Ambrogio et al., 1997). Selon les données actuelles de la littérature, il semblerait qu'il existe une relation proportionnelle directe entre le volume inspiré et la force de contraction musculaire entraînant l'expiration forcée : une quantité d'air inspiré plus importante va entraîner une augmentation de la force musculaire développée à la phase explosive, à l'origine d'une plus grande efficacité de la toux. De plus, la distension pulmonaire entraîne l'activation de certains récepteurs pulmonaires, pouvant faciliter la toux via des mécanismes centraux (Brooks, 2011; Hanacek et al., 1984).

La durée moyenne de la phase inspiratoire est de 0,75 sec (0,45 - 1 sec) et la quantité moyenne de d'air inspiré est de 0,39L (0,09 - 0,53 L) (Yanagihara et al.,

1966). Le volume d'air inspiré peut augmenter jusqu'à 2,5L lors d'un effort volontaire de toux (Ross et al., 1955).

- **Phase compressive**

Le début de la phase compressive est marqué par la fermeture de la glotte. La contraction des muscles expiratoires contre la glotte fermée entraîne une augmentation des pressions abdominale, pleurale, alvéolaire et sous-glottique. L'augmentation de la pression pleurale est associée à une compression alvéolaire, ayant comme conséquence une diminution du volume pulmonaire (Tomori and Widdicombe, 1969) et semble déclencher un réflexe favorisant l'activité des muscles agonistes, en défaveur des antagonistes et optimisant ainsi la force musculaire nécessaire à l'effort (Von and Isshiki, 1965).

Par la fermeture de la glotte, du fait de la faible variation de volume pulmonaire, le raccourcissement des fibres musculaires expiratoires est minime, permettant de considérer la contraction des muscles expiratoires comme presque isométrique (Widdicombe, 2006).

La fermeture de la glotte est la principale différence entre la phase compressive du réflexe de toux et celle du réflexe expiratoire, car lors de ce dernier, il existe aussi une augmentation importante des pressions abdominale et intrathoracique à l'origine d'une compression du gaz alvéolaire. Mais la glotte reste partiellement ouverte en raison des propriétés résistives de l'arbre trachéo-bronchique (Widdicombe and Fontana, 2006).

La fermeture de la glotte a une durée brève d'environ 0,2 sec, mais la pression alvéolaire peut atteindre 20kPa vers la fin de la phase compressive, soit 50% à 100% de la pression enregistrée lors de la phase explosive à glotte ouverte (Arora and Gal, 1981; Lavietes et al., 1998).

- **Phase expiratoire**

Cette phase débute par une abduction rapide (20-40 msec) des cartilages aryténoïdes entraînant l'ouverture de la glotte au début de l'expiration. Lors de la phase compressive suite à la contraction des muscles expiratoires, les pressions

intra-thoraciques sont très élevées. Lors de l'ouverture de la glotte, la pression des voies aériennes proximales chute rapidement pour égaler la pression atmosphérique, alors que les pressions pleurales et alvéolaires continuent d'augmenter pour une courte durée de l'ordre de 0,5 sec. Lorsque ces pressions sont égales, les voies aériennes intra-thoraciques sont divisées en 2 segments (en série) : un en amont du point d'équilibre (i.e. jusqu'aux alvéoles pulmonaires) où la pression à l'intérieur des voies aériennes reste supérieure à la pression péri-bronchique, et les voies aériennes restent ouvertes, et un autre, en aval de ce point où la pression à l'intérieur des voies aériennes, tend à être inférieure à la pression péri-bronchique et les voies aériennes tendent alors à se collaber (Knudson et al., 1974) (**Figure 3**). L'élasticité du parenchyme pulmonaire fait que la pression alvéolaire reste toujours supérieure à la pression pleurale, alors que la pression péri-bronchique reste proche de la pression pleurale (Macklem and Wilson, 1965).

Chez un sujet sain, lors d'un effort volontaire et maximal de toux débutant à un volume pulmonaire proche de la capacité pulmonaire totale, le débit expiratoire de pointe mesuré lors d'une toux est de l'ordre de 360 à 1200 L/min (une valeur inférieure à 160 L/min est souvent associée à l'inefficacité de la toux) (Didier, 2015) et les voies aériennes proximales intra thoraciques peuvent se collaber dans cette situation. Cette compression des voies aériennes a comme conséquence un déplacement rapide de l'air (durée d'environ 30 msec) (Knudson et al., 1974) avec une diminution des débits de gaz à environ 50% du débit de pointe de la toux. Cette diminution peut persister pour une durée assez longue, pouvant aller jusqu'à la moitié de la durée de la phase expiratoire (Fontana et al., 1999; Yanagihara et al., 1966). Ensuite, les débits et les volumes pulmonaires diminuent de manière exponentielle avec une constante de temps proche de 0,5 sec. La durée totale de la phase expiratoire est située entre 0,5 et 1 sec (Fontana et al., 1999; Yanagihara et al., 1966).

Les oscillations passives du gaz exhalé ainsi que des tissus lors de la phase expiratoire donnent le son caractéristique de la toux. Cette phase de la toux entraîne le drainage efficace des voies aériennes, mais l'activité intense et brutale des muscles expiratoires peut avoir parfois des effets délétères comme des fractures costales ou de pneumothorax (Irwin et al., 1998).

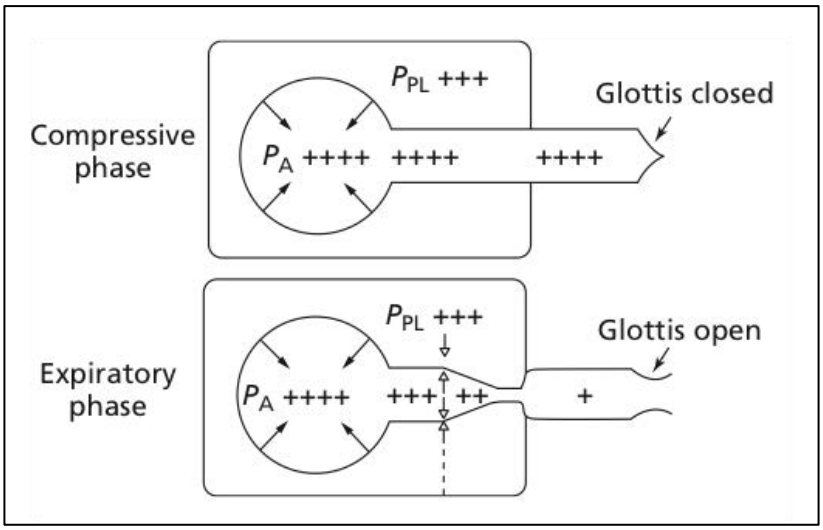


Figure 3 : **Description de la mécanique de la phase expiratoire de la toux** (Knudson et al., 1974). Pendant la phase compressive, la pression pleurale (P_{PL}) est positive, en rapport avec la contraction des muscles expiratoires et la pression alvéolaire (P_A) reste toujours supérieure à la P_{PL} du fait de l'élasticité du parenchyme pulmonaire (flèches). La pression intra-bronchique dans l'ensemble des voies aériennes est identique à la P_A, le temps que la glotte reste fermée. A l'ouverture de la glotte qui marque le début de la phase expiratoire, l'air se déplace rapidement pour tenter d'équilibrer la pression intrathoracique à la pression atmosphérique, en suivant le gradient de pression des alvéoles vers la bouche. Au moment d'égalité pressionnelle (point d'égales pressions), la pression intra-bronchique et la P_{PL} deviennent égales. En amont de ce point jusqu'aux alvéoles pulmonaires les voies aériennes restent ouvertes (pression intrabronchique supérieure à la pression peribronchique) alors qu'en aval, elles vont se collaber (pression intrabronchique inferieure à la pression peribronchique).

Si la mécanique de la toux est maintenant bien connue et depuis longtemps, les mécanismes physiologiques et physiopathologiques impliqués dans la genèse de la toux ne sont pas complètement éclaircis malgré les nombreux travaux de recherche au décours des dernières années.

3. Physiologie et physiopathologie de la toux

Comme toute activité réflexe, le mécanisme de la toux repose sur le trépied classique de l'arc réflexe avec au départ des récepteurs, un centre nerveux pour recevoir et intégrer les informations et des effecteurs (Didier, 2015). Le réflexe de toux commence par l'activation de récepteurs spécifiques localisés principalement dans les voies aériennes (larynx, carène et bronches proximales), en rapport avec

des modifications mécaniques ou inflammatoires à ce niveau, suite à l'inhalation des produits chimiques, des allergènes, des agents infectieux ou en rapport avec des variations de la température ou d'humidité (Chung and Pavord, 2008).

L'activation des récepteurs spécifiques générera des potentiels d'action qui seront véhiculés par le nerf vague, en particulier, jusqu'au noyau du tractus solitaire (NTS) dans le tronc cérébral. Celui-ci a des connexions avec les neurones des centres respiratoires et des centres coordinateurs de la toux corticaux et subcorticaux (Chung and Pavord, 2008). Une fois l'information intégrée, le signal est transmis par les voies efférentes à l'ensemble des acteurs (muscles des voies aériennes supérieures, respiratoires accessoires, muscle phrénique et muscles abdominaux) permettant l'effort moteur de toux via des motoneurones effecteurs (Chung and Pavord, 2008). La description schématique du réflexe de toux avec la localisation des récepteurs, les voies afférentes, les centres nerveux, les voies efférentes et les effecteurs est représentée dans la **figure 4**.

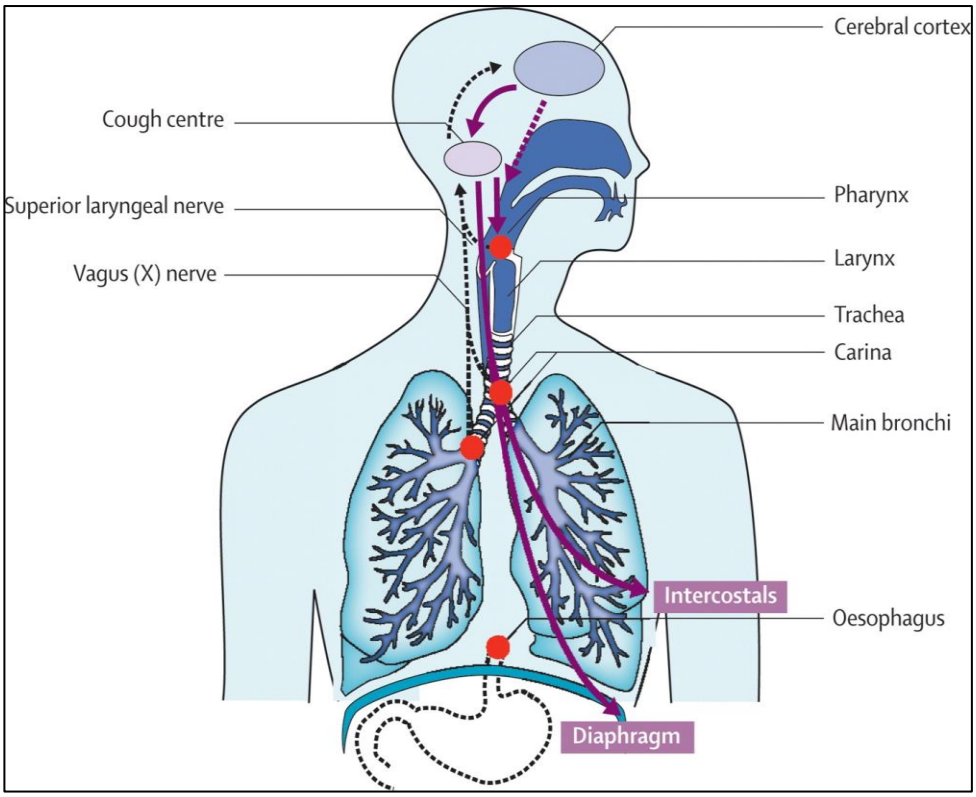


Figure 4. Représentation anatomique de l'innervation des voies aériennes (Chung and Pavord, 2008): les récepteurs de toux (rouge) localisés aux niveaux du larynx, carène, bronches, partie distale de l'œsophage ; voies afférentes : nerf vague et nerf laryngé supérieur ; centre de toux et cortex cérébral ; voies efférentes qui arrivent chez les effecteurs

La régulation de la toux (seuil et intensité) est très complexe avec l'intervention du système nerveux périphérique (où la sensibilité des récepteurs des voies aériennes joue un rôle primordial) comme du système nerveux central (sensibilité centrale) (Chung and Pavord, 2008).

3.1 Description de l'arc réflexe de toux

La toux est déclenchée par l'activation de récepteurs sensoriels spécifiques classés en trois catégories en fonction de leurs caractéristiques électro physiologiques : les récepteurs des fibres Aδ du type « Rapidly Adapting Pulmonary stretch Receptors » (RARs) ou du type « Slowly Adapting Pulmonary stretch Receptors » (SARs) et les récepteurs des fibres C (Brooks, 2011; Didier, 2015).

Les afférences vagales impliquées dans la régulation de la toux ont été décrites pour la première fois par Widdicombe en 1954 (Widdicombe, 1954a, b, c). Actuellement, on sait qu'il a au moins deux voies afférentes de la toux, dont l'histoire dans l'évolution des espèces animales est différente, comme décrit par Brooks (Brooks, 2011).

La première voie est le réflexe involontaire de toux assuré par les fibres Aδ mécano-sensibles, répondant aux fluctuations du pH et aux stimulations mécaniques. Cette voie viserait essentiellement la protection contre l'inhalation de liquide gastrique ou de corps étranger (syndrome de pénétration, donc urgence vitale). Les récepteurs de cette voie sont localisés principalement sur les voies aériennes intra pulmonaires (Brooks, 2011; Chung and Pavord, 2008).

La seconde voie réflexe est partiellement accessible au contrôle volontaire par le patient et correspond à l'activation des fibres sensorielles C par l'agression tissulaire, l'inflammation ou l'exposition à des substances comme capsaïcine, la bradykinine ou l'acide citrique (Didier A, 2015). Ces fibres C présentent divers types de récepteurs à leurs terminaisons, dont les *transient receptor potential* (TRPs) *channels*. Ces récepteurs font objet d'une partie détaillée ci-après, du fait de leur importance fonctionnelle potentielle et des multiples travaux de recherche publiés récemment dans ce domaine (Benemei et al., 2015; De Logu et al., 2016; Didier, 2015; Grace et al., 2013).

Les voies afférentes et efférentes de la toux sont représentées en détail dans la **figure 5**.

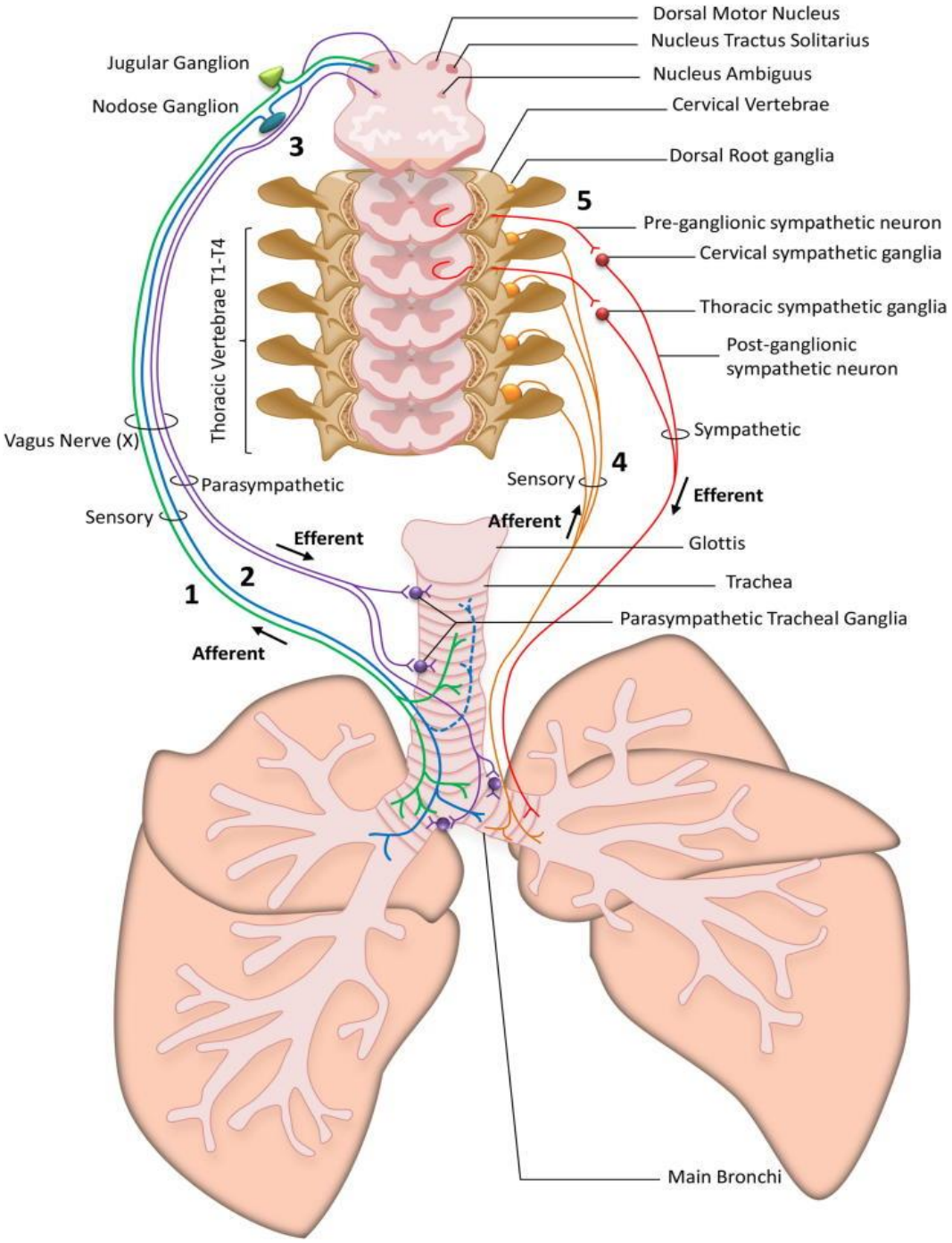


Figure 5 : Représentation détaillée des voies afférentes et efférentes de la toux

Voie afférente sensorielle prédominante (nerf vague) provenant 1 - des fibres C (en vert) innervant les voies aériennes supérieures et inférieures, faisant relais dans le ganglion jugulaire avant de se projeter au niveau du NTS, 2 – des fibres C (bleu) innervant les voies aériennes inférieurs et les bronches, faisant relais dans le ganglion nodal et des fibres A- δ (bleu ; ligne brisée) innervant les voies aériennes supérieures et se projetant également au niveau du NTS. 3- voies efférentes parasympathiques vagales (violet) : les neurones pré-ganglionnaires parasympathiques (noyau moteur dorsal et noyau ambigu) faisant relais avec les ganglions trachéaux parasympathiques (tonus bronchomoteur ; mucus) ; 4- nerfs émergents de la moelle thoracique (T1-T4) (orange) qui desservent les voies aériennes inférieures et les bronches (voies afférentes) ; 5- neurones pré-ganglionnaires et post-ganglionnaires sympathiques (rouge) intervenant dans le tonus bronchomoteur.(D'après Grace, 2013)

3.1.1 Voie sensitive

- **Les fibres Aδ**

Les fibres Aδ sont des fibres nerveuses myélinisées qui contiennent deux types de mécanorécepteurs : les RARs et les SARs. Contrairement aux SARs principalement localisés dans les régions pulmonaires distales, les RARs se trouvent essentiellement au niveau de la trachée et des bronches proximales. La distension sélective de la trachée et des grosses bronches a permis la description d'un groupe hétérogène d'afférences nerveuses (Widdicombe a, b, c).

Les SARs sont actifs pendant le cycle respiratoire et les données actuelles suggèrent qu'ils sont impliqués dans le réflexe Hering-Breuer, qui stoppe la phase inspiratoire et initie l'expiration quand les poumons sont suffisamment distendus (Schelegle and Green, 2001). L'activation de ces récepteurs a un effet inhibiteur sur la stimulation cholinergique des voies aériennes, entraînant une diminution du tonus musculaire bronchique et une diminution de l'activité du nerf phrénique (Schelegle and Green, 2001). La plupart des SARs s'adaptent lentement à la stimulation mécanique (d'où leur nom) et la vitesse de conduction dans ces afférences est comprise 15 et 32 ms^{-1}. La localisation de ces SARs se révèle être essentiellement bronchique (90% de SARs sont tracheo-bronchiques), mais on peut les retrouver aussi au niveau du parenchyme pulmonaire (SARs intrapulmonaires) (Widdicombe, 1954a). L'activité de ces récepteurs n'est pas modifiée par l'application locale de procaïne et est faiblement inhibée par la vapeur d'éther. Ils ne répondent également que faiblement à la stimulation mécanique du mucus des voies aériennes (Widdicombe, 1954a).

Le rôle de SARs dans le réflexe de toux est pour le moment mal défini. Des expérimentations réalisées chez le lapin exposé à des aérosols contenant du SO_2 (censé bloquer de manière sélective l'activité des SARs), ont retrouvé une diminution du réflexe de toux (Hanacek et al., 1984). En même temps, certaines études ont prouvé que le SO_2 a un effet stimulateur des fibres C qui ont un effet inhibiteur sur la toux (Atzori et al., 1992; Wang et al., 1996). Etant donné ces résultats, on peut conclure que les récepteurs SARs ont probablement un rôle dans la modulation de la toux.

L'autre catégorie de mécanorécepteurs est représentée par les RARs. Il s'agit des récepteurs épithéliaux des voies aériennes intra et extra-pulmonaires localisés principalement dans la trachée et la carène (90%). Ils s'adaptent très rapidement au stimulus (1-2 s), expliquant ainsi leur nom et la vitesse de conduction pour ces fibres Aδ est de 4 à 18 ms^{-1} (Brooks, 2011). Même s'il s'agit de mécanorécepteurs, ils répondent aussi au changement de pH et de l'osmolarité, surtout pour ceux localisés au niveau de la trachée et du larynx (Brooks, 2011). Ils sont activés par les modifications du volume pulmonaire (inflation ou déflation), du diamètre et des pressions pulmonaires. Leur activité est directement proportionnelle à l'augmentation de la fréquence respiratoire et du volume pulmonaire (McAlexander et al., 1999; Pack and DeLaney, 1983). Chez la plupart des modèles animaux étudiés, les RARs intra-pulmonaires sont activés lors de l'inspiration, donc par l'inflation pulmonaire. Leur activité basale est très variable selon les espèces, mais en général lors d'une ventilation spontanée de repos, les RARs sont moins actifs que les SARs et plus actifs que les fibres C (Brooks, 2011).

Les RARs peuvent aussi être activés (directement ou indirectement) par d'autres stimuli mécaniques en rapport avec l'exposition à des irritants ou à la présence d'une inflammation locale des voies aériennes. Cette affirmation peut paraître paradoxale quand on sait que, in vitro, les RARs sont insensibles aux médiateurs chimiques qui provoquent habituellement la toux : bradykinine, prostaglandine, capsaïcine, acide citrique (Armstrong and Luck, 1974; Bergren, 1997; Coleridge and Coleridge, 1984; Ho et al., 2001; Mohammed et al., 1993). L'explication pour ce paradoxe est que les RARs sont activés par les modifications mécaniques dans les voies aériennes induites par la contraction des muscles lisses, l'œdème pulmonaire, la vasodilatation, la diminution de la compliance pulmonaire. On sait actuellement que l'activation des RARs intra-pulmonaires a comme conséquence l'apparition d'un bronchospasme associé à une sécrétion de mucus via une activation parasympathique réflexe et d'une tachypnée caractérisée par une diminution de la pause post-expiratoire/pré-inspiratoire (Canning et al., 2001; Haxhiu et al., 2000; Haxhiu et al., 1997; Mills et al., 1969; Raj et al., 1995; Widdicombe et al., 1962; Yu et al., 1989).

Chez le modèle animal, la toux peut être induite par les stimuli électriques, mécaniques, chimiques, en changeant la composition ionique ou osmotique du liquide de surface de la muqueuse, en stimulant les fibres nerveuses afférentes à

des niveaux différents (Morice et al., 2007). Malheureusement, la plupart des études sont réalisées chez l'animal anesthésié et les produits d'anesthésie peuvent changer la sensibilité des récepteurs. Malgré ces limites, les données actuelles sont en faveur d'un rôle indirect des récepteurs SARs et RARs dans la modulation du réflexe de toux (Brooks, 2011; Grace et al., 2013).

- **Les fibres C**

La seconde voie réflexe de la toux correspond à l'activation des fibres sensorielles C localisées au niveau de l'épithélium des voies aériennes (Didier, 2015 ; Brooks, 2011; Grace et al., 2013). Les fibres C sont non myélinisées, relativement insensibles aux stimuli mécaniques et à l'inflation pulmonaire, mais très sensibles aux stimuli chimiques et leur réponse est variable selon la nature du stimulus et le type de fibre C (Coleridge and Coleridge, 1984; Lee and Pisarri, 2001; Ricco et al., 1996; Undem et al., 2004). Parmi les stimuli qui peuvent activer les fibres C, on note des irritants de l'environnement (ex. fumée de cigarette, pollution atmosphérique : SO_2, PM10), des extraits alimentaires (ex. moutarde, capsaïcine) et des médiateurs endogènes libérés au décours d'une agression ou inflammation tissulaire (ex. bradykinine, prostanoides, produits d'oxydation)(Grace et al., 2013).

Les fibres C, caractérisées par une vitesse de conduction lente (< 1 $m.s^{-1}$) constituent la majorité des afférences vagales à destination des voies aériennes (Grace et al., 2013). La majorité des fibres ont leur origine dans le ganglion jugulaire vagal mais certaines peuvent venir du ganglion nodal et leurs terminaisons sont au niveau de l'épithélium respiratoire. En général, les fibres jugulaires ont des terminaisons nerveuses dans les voies aériennes supérieures (« bronchiques ») et inférieures (« pulmonaires ») ; les fibres originaires du ganglion de la racine dorsale et du ganglion nodal finissent dans les voies aériennes inférieures (Grace et al., 2013;Chou et al., 2008). Les fibres C sont décrites au niveau des voies aériennes pour presque toutes les espèces. Les terminaisons des fibres C dans la trachée du cochon d'Inde et du rat peuvent être caractérisées par un marquage immunohistochimique pour les neuropeptides Calcitonine Gene-Related Peptide (CGRP), substance P et neurokinine A (Baluk et al., 1992; Hunter and Undem, 1999; Kummer et al., 1992; McDonald et al., 1988; Yamamoto et al., 2007). Des structures

comparables existent également dans les voies aériennes d'autres espèces (Dey et al., 1990; Lamb and Sparrow, 2002; Watanabe et al., 2006; Yamamoto et al., 1998).

Les fibres C jouent un rôle clé dans les réponses de défense respiratoire. Les données actuelles suggèrent que le rôle des fibres C dans la toux est diffèrent en fonction de leur localisation. La stimulation des fibres C localisées au niveau des voies aériennes supérieures semble augmenter la toux, contrairement à la stimulation des fibres C pulmonaires qui semble inhiber la toux (Grace et al., 2013). Par exemple, la stimulation des fibres C pulmonaires chez les chiens et les chats anesthésiés inhibe la toux à la stimulation mécanique laryngée ou trachéale (Tatar et al., 1994; Tatar et al., 1988). Les stimuli chimiques comme la capsaïcine, l'acide citrique, le sérum salé hypertonique ou le SO_2, déclenchent un chemoréflexe caractérisé par une apnée, une bradycardie et une hypotension en rapport avec l'activation du système nerveux parasympathique. L'apnée inhibe l'activité du centre respirateur générateur et réduit les efforts respiratoires. Pendant cette période, aucun stimulus n'est pas capable de déclencher la toux (Grace et al., 2013; Tatar et al., 1994; Tatar et al., 1988; Widdicombe, 2002).

Les stimuli chimiques les plus aptes à activer les fibres C bronchiques (incluant la capsaïcine, la bradykinine, et l'acide citrique) sont capables de déclencher une toux chez des sujets humains conscients, ainsi que chez des animaux vigiles (Dicpinigaitis, 2007; Forsberg et al., 1988; Jia et al., 2002; Karlsson and Fuller, 1999; Laude et al., 1993; Trevisani et al., 2004). Ces stimuli agissent entièrement ou partiellement via l'activation des TRPV1 et des données immunohistochimiques confirment l'expression des TRPV1 au niveau de ces fibres C (Groneberg et al., 2004; Kwong et al., 2008; Myers et al., 2002; Watanabe et al., 2006). Par ailleurs, la désensibilisation préalable à la capsaïcine permet une inhibition de la toux, habituellement observée suite à une stimulation chimique (acide citrique) chez le cochon d'Inde vigile. Il en est de même en cas d'administration d'un traitement antagoniste des récepteurs TRPV1 (Bolser et al., 1991; Forsberg et al., 1988; Gatti et al., 2006; Lalloo et al., 1995; Leung et al., 2007; Trevisani et al., 2004). L'ensemble de ces données tendent à prouver que les fibres C jouent un rôle majeur dans la toux (Canning et al., 2006b).

Il est reconnu que l'anesthésie peut modifier la modulation de la toux, donc l'interprétation des résultats des études faites sur l'animal anesthésié doit être faite avec précaution en tenant compte de la profondeur de l'anesthésie et des différents

produits utilisés. La profondeur de l'anesthésie permet de conserver les réflexes essentiels respiratoires chez le chat (Poliacek et al., 2012), le lapin (Varechova et al., 2010) et le cochon d'Inde (Plevkova et al., 2009). Chez l'animal anesthésié, la stimulation peut être appliquée aux différents étages des voies aériennes (larynx, trachée ou bronches) et en sélectionnant un moment précis du cycle respiratoire (Varechova et al., 2010). Les enregistrements de l'activité des muscles respiratoires, des nerfs, du débit aérien et de la pression pleurale ou œsophagienne donnent la possibilité de différentier le réflexe de toux du réflexe expiratoire et d'étudier avec précision les paramètres quantitatifs de la réponse tussigène (fréquence, incidence, intensité ou seuil) (Plevkova et al., 2009; Poliacek et al., 2012). Pour ces avantages, le modèle animal anesthésié est souvent utilisé pour étudier les mécanismes physiopathologiques de la toux ou pour analyser l'effet des antitussifs actifs au niveau du système nerveux central. Néanmoins, l'anesthésie générale influence considérablement la réponse aux agents tussigènes, comme c'est le cas pour les aérosols de capsaïcine ou de bradykinine (stimulant les fibres C), qui sont incapables de déclencher un réflexe de toux chez l'animal anesthésié malgré le fait que le réflexe de toux provoqué par le stimulus mécanique et l'inhalation de l'acide citrique soit entièrement préservé (Canning et al., 2006a; Coleridge and Coleridge, 1984; Tatar et al., 1988).

Ces effets d'apparence opposés à la stimulation des fibres C peuvent être expliqués si l'on regarde attentivement les différents types de fibres C décrits et leurs voies d'activation (Coleridge and Coleridge, 1984; Kollarik et al., 2003; Undem et al., 2004). En prenant l'exemple du cochon d'Inde, les fibres C des voies aériennes peuvent être différenciées selon leur origine ganglionnaire, selon leur distribution dans les voies aériennes, ainsi que selon leur réponse à l'adénosine, l'ATP ou aux agonistes des récepteurs 5-HT3 (Chuaychoo et al., 2006; Chuaychoo et al., 2005b; Undem et al., 2004). L'habilité de l'activation des fibres C à déclencher une toux chez le cochon d'Inde vigile ne fait plus de doute, de même que le rôle facilitateur de l'activation de ces mêmes fibres sur la toux (Canning et al., 2006b; Mazzone et al., 2005). Comme démontré dans ces dernières études, l'application locale de capsaïcine et de bradykinine sur la muqueuse trachéale a augmenté la sensibilité de la toux. Par la suite, ces travaux ont montré que l'activation des fibres C provenant du ganglion jugulaire est capable de déclencher une toux.

A l'inverse, l'activation des fibres C provenant du ganglion nodal entraîne une inhibition de la toux. En effet, l'activation sélective des fibres C nodales par l'adénosine ou la 2 – méthyl – 5 – hydroxytriptamine n'est pas capable de provoquer une toux et diminue fortement l'habilité de l'acide citrique à déclencher une toux chez l'animal anesthésié (Canning et al., 2006b; Mazzone et al., 2005).

D'autres études conduites chez d'autres espèces animales retrouvent également des effets opposés sur la toux en fonction de la stimulation des différents types de fibres C (Belvisi and Bolser, 2002; Lee and Pisarri, 2001; Ohi et al., 2004; Tatar et al., 1994; Tatar et al., 1988) qui sont finalement rapportés aux origines et à la localisation de ces fibres avec des effets stimulateurs sur la toux des fibres C trachéobronchiques et inhibiteurs sur la toux pour les fibres C pulmonaires (Grace et al., 2013).

La plupart des fibres C localisées dans les poumons et les voies aériennes expriment les récepteurs TRPV 1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) (Caterina et al., 1997) et les récepteurs TRPA 1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) connus par leur effet stimulateur de la toux (Bautista et al., 2006; Birrell et al., 2009; Taylor-Clark et al., 2009).

Ces deux types de récepteurs font partie d'une grande famille TRPs comportant 28 récepteurs ionotropiques sensibles aux stimuli mécaniques, thermiques (chaud et froid) et à certaines substances chimiques (ex. menthol) (Belvisi et al., 2011; Didier, 2015) **(Figure 6)**.

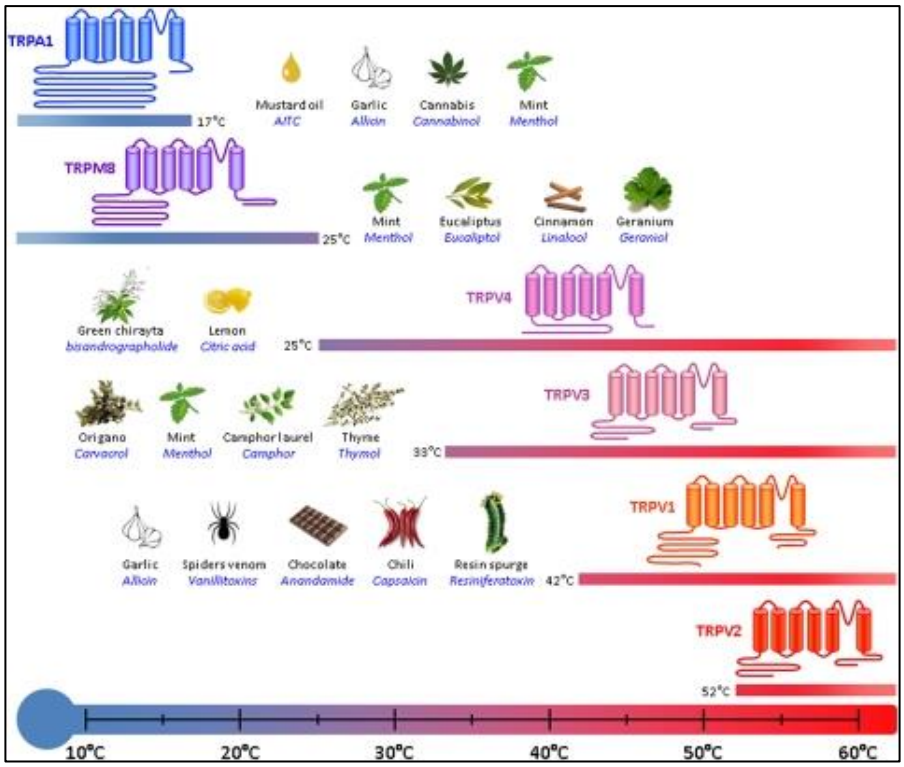


Figure 6. Représentation des stimuli capables d'activer les récepteurs TRPs (Belvisi et al., 2011)

Les TRPs sont classés en six groupes chez les mammifères : TRPA, TRPC, TRPM, TRPML, TRPP et TRPV. Les récepteurs TRPA1 et TRPV1 sont localisés notamment dans les muqueuses de la trachée et des bronches, au niveau des muscles lisses et des vaisseaux mais aussi au niveau des terminaisons des fibres nerveuses sensitives dans la peau, la vessie, le tube digestif (Brito et al., 2014). Ces récepteurs sont exprimés à la fois sur les cellules épithéliales des voies respiratoires mais ils peuvent aussi être retrouvés au niveau de cellules inflammatoires telles que les macrophages (Preti et al., 2012).

Les TRPV 1 sont des récepteurs de type canaux cations non sélectifs, qui permettent, en réponse à un stimulus, l'entrée des ions de calcium mais aussi d'autres ions selon le gradient d'affinité (calcium>magnésium>sodium>potassium). L'entrée de ces ions provoque une dépolarisation de la terminaison nerveuse et la genèse d'un signal nociceptif (Brito et al., 2014; Didier, 2015) **(Figure 7)**.

Les TRPV1 sont activés par une température >44°C, un pH <5,9, les métabolites d'acides linoléiques oxydés, synthétisés lors de brûlures et d'autres substances appartenant à la famille des vanilloïdes (dont la capsaïcine présente dans le piment) ou une toxine de venin d'une araignée (*Psalmopoeus cambridgei*) (Didier, 2015; Preti et al., 2012). Ces récepteurs peuvent être aussi activés par des

substances endogènes comme des endocannabinoïdes (anandamine, n-arachidonoyldopamine) synthétisés dans le système nerveux central et des médiateurs de l'inflammation comme la bradykinine ou la prostaglandine E2 (Pg E2) (Grace et al., 2012).Le seuil d'activation des récepteurs TRPV1 à la chaleur peut s'abaisser à 34°C dans un contexte inflammatoire, en cas d'acidose, synthèse locale de bradykinine, de Pg E2, de métabolites de l'acide arachidonique par les voies de lipoxygénase, d'adénosine triphosphate (ATP) ou de facteur de croissance neurale (*Nerve growth factor* (NGF) (Grace et al., 2012; Preti et al., 2012).

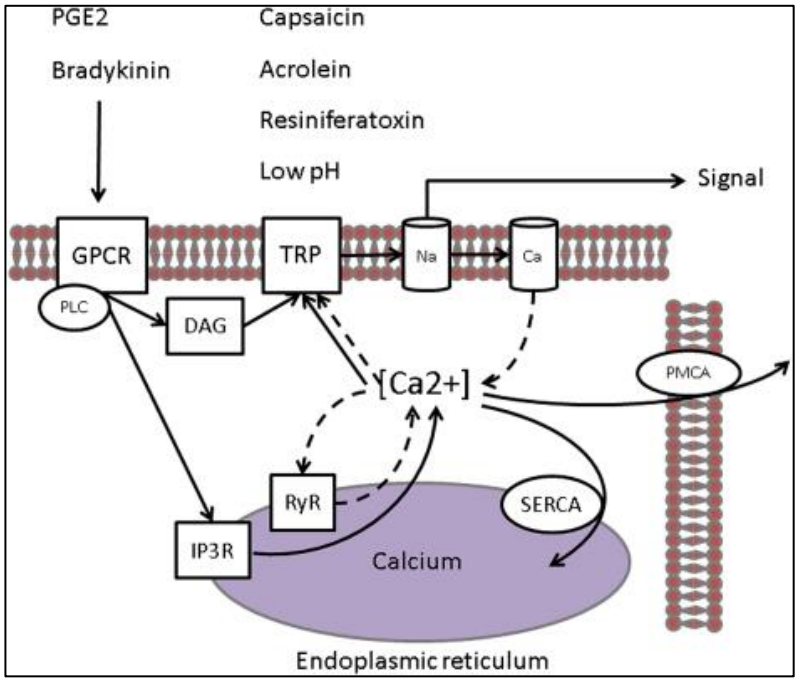


Figure 7. L'activation des récepteurs cellulaires TRPV1 et TRPA1 par l'entrée des ions de calcium directement par la capsaïcine (V1), acroleine (A1), resiniferatoxine (V1) ou le pH bas (V1) ou indirectement par la protéine G couplée au récepteur (GPCR) comme la PGE_2 ou la bradykinine (Belvisi et al., 2011)

(Ca = voltage-gated calcium channel; DAG = diacylglycerol; GPCR = G protein-coupled receptor; IP3R =1,4,5-triphosphate receptor; Na = voltage-gated sodium channels; PGE2 = prostaglandin E_2; PLC = phospholipase C; PMCA = plasma membrane calcium ATPase; RyR = ryanodine receptor; SERCA = endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase)

Les TRPA1 sont aussi des récepteurs ionotropiques non spécifiques pour le calcium, activés directement par les produits naturels comme l'isothiocyanate d'allyle ou l'allicine contenus dans la moutarde et l'ail, par des irritants de l'environnement (acroléine ou crotonaldéhyde de la fumée de cigarette), par des produits d'origine bactérienne ou virale et par le froid (Bautista et al., 2006; Didier, 2015).

Comme les TRPV1, les TRPA1 peuvent être activés aussi par voie indirecte par des substances endogènes libérées au décours d'une réaction inflammatoire (bradykinine et Pg E2 via l'activation de la protéine G couplée aux récepteurs GPCR) et lors d'un stress oxydatif (4-hydroxi-nonenal, 4-oxynonenal) (Grace et al., 2013). Par exemple, lors d'une inflammation des voies aériennes, la production de Pg E2 et de bradykinine augmente la réponse tussigène aux stimuli chez l'homme et chez l'animal vigile (Maher et al., 2009; Taylor-Clark et al., 2009).La Pg E2 et la bradykinine se lient à la protéine G liée au récepteur entraîne l'activation des canaux TRP via la production de diacylglycerol (DAG) et l'activation de la protéine kinase C (PKC) par la phospholipase C (PLC) (comme représenté dans la **figure 6**). La dépolarisation de la membrane commence avec l'ouverture des canaux Na^+ voltage-dépendants (suite à l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libéré par le réticulum endoplasmique) générant le potentiel d'action qui sera conduit par les fibres nerveuses vagales jusqu'au niveau du noyau du tractus solitaire (Grace et al., 2013). La voie de la toux après les synapses réalisées au niveau du tractus solitaire est moins bien connue.

3.1.2 Centres de la toux

Beaucoup de travaux de recherche ont été faits les dernières années dans le domaine de la neurobiologie de la toux (Haji et al., 2013). La plupart d'entre eux ont étudié les projections centrales de ces différentes afférences nerveuses des voies aériennes, en particulier chez le chat et le rat. Les fibres C bronchopulmonaires et les RARs se projettent essentiellement au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) et plus particulièrement en ses régions médiale et commissurale (Bonham and Joad, 1991; Davies and Kubin, 1986; Ezure et al., 1991; Kubin et al., 2006; Kubin et al., 1991; Lipski et al., 1991; Mazzone and Canning, 2002). Les SARs se projettent du même côté que leur origine vagale dans les noyaux latéral et interstitiel (Bonham and McCrimmon, 1990; Davies et al., 1987; Ezure et al., 2002; Kalia and Richter, 1985a, b; Kubin et al., 2006). Malheureusement, il n'existe pas actuellement d'étude permettant de clarifier plus avant les éventuelles interactions entre ces différents sites, en particulier du fait d'une méthodologie extrêmement contraignante pour mener de telles études physiologiques.

On sait actuellement qu'il existe au niveau du NTS du tronc cérébral des neurones relais recevant l'information tussigène périphérique et que ces neurones vont « converger » vers des neurones portails (gating-neurons) de la toux intégrant les informations des neurones relais et codant l'intensité et la fréquence des quintes de toux. Le centre coordinateur de la toux génère alors le schéma de la toux qui est transmis par des neurones spécifiques (neurones bulbospinaux) aux voies effectrices motrices respiratoires, ayant comme résultat la genèse de la toux (Haji et al., 2013). Dans la **figure 8,** il y a la représentation des régions du tronc cérébral intervenant dans la genèse du réflexe de toux. Bien évidemment, il s'agit d'une description très simple des mécanismes extrêmement complexes au niveau du système nerveux central.

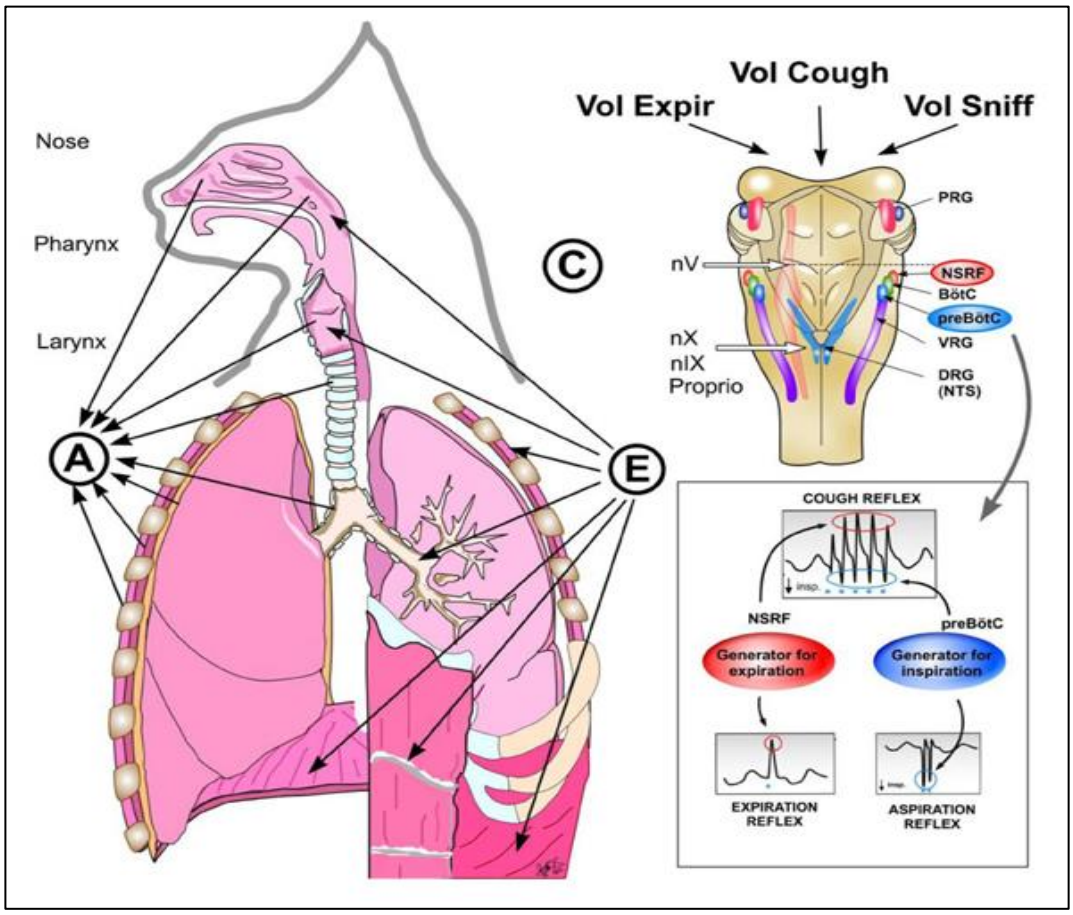


Figure 8. Représentation des centres générateurs de la toux du tronc cérébral avec les afférences et efférentes (Tomori et al., 2012)

NSRF= nucleus subretrofacialis ; preBötC=preBötzinger complex

Une multitude de messages est intégrée au niveau cortical suite aux informations arrivées via les voies afférentes. Les centres respiratoires pontins, les noyaux du raphé et les complexes Bötzinger et pré-Bötzinger interviennent dans la modulation de la toux (Baekey et al., 2003; Bongianni et al., 1998; Shannon et al., 1998). Le complexe pré-Bötzinger intervient dans la genèse du rythme respiratoire dans la phase inspiratoire, comme les groupes des neurones respiratoires du noyau sub-retrofacial jouent un rôle décisif dans le rythme expiratoire (Brooks, 2011). Les neurones expiratoires du complexe Bötzinger et pré-Bötzinger peuvent stimuler et inhiber les neurones prémoteurs du muscle laryngé adducteur (Bongianni et al., 1998; Jiang and Lipski, 1990; Ono et al., 2006). Selon les données actuelles, les neurones localisés au niveau de la région respiratoire ventro-caudale jouent un rôle sur la modulation du réflexe de toux avec un rôle de neurones portails (Bolser et al., 2006; Canning and Widdicombe, 2001; Poliacek et al., 2007). Les études chez l'animal ont trouvé des interactions entre le noyau du tractus solitaire et le noyau ambigu pendant la toux (Ambalavanar et al., 2004; Gestreau et al., 2005), comme il existe des preuves en faveur des connexions entre le noyau du tractus solitaire et la formation réticulée au décours de la toux (Ambalavanar et al., 2004).

D'autres régions semblent aussi impliquées dans la modulation de la toux comme démontré par les études d'IRM fonctionnelle avec réalisation d'un test à la capsaïcine. Parmi ces régions, on note le cortex insulaire, la région cingulaire, des régions cérébelleuses et du cortex sensitif primitif (Chung and Pavord, 2008).

Contrairement aux animaux, l'homme peut contrôler volontairement la toux. Des études d'imagerie fonctionnelle ont permis la mise en évidence des régions cérébrales activées lors de la toux volontaire. Elles sont surtout localisées dans la partie ventro-latérale du cortex sensitivo-moteur dans les aires aussi responsables du chant, de la parole et des mouvements de la langue (Brooks, 2011). Le schéma d'intégration de l'information et contrôle de la toux au niveau du système nerveux central est représenté dans la **figure 9**.

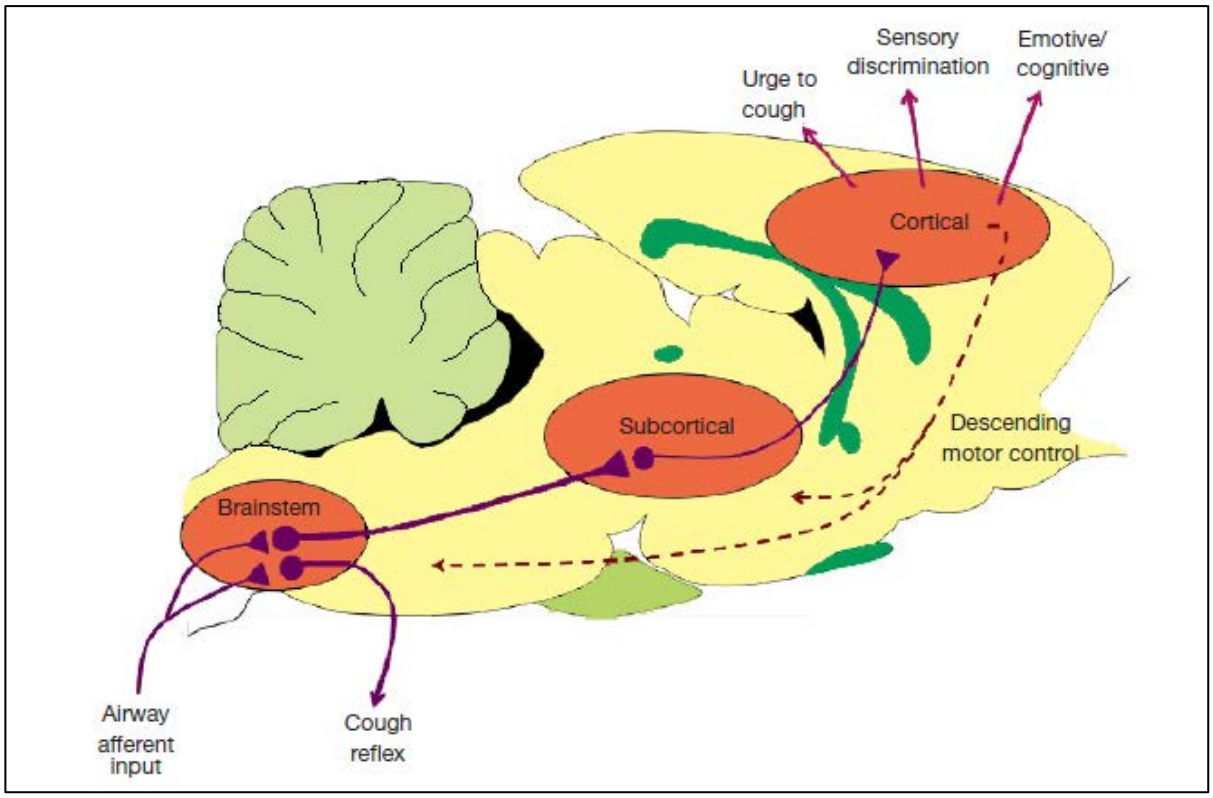


Figure 9. Représentation schématique des centres nerveux localisés au niveau du système nerveux central intervenant dans le contrôle de la toux

Les voies afférentes finissent au niveau du tronc cérébral et la toux peut être déclenchée à ce moment, mais les informations peuvent être transmises au niveau subcortical et cortical où il y a une procession de l'information. Les réponses envoyées peuvent ensuite modifier la toux (l'aggraver ou la supprimer) (Narula et al., 2014)

Malgré ces avancées, les mécanismes centraux de modulation de la toux ne sont pas entièrement connus. Les recherches dans le domaine de la neurobiologie sont de plus en plus nombreuses afin de mieux comprendre les interactions neuronales et de développer des nouvelles approches thérapeutiques de la toux chronique qui pourront cibler les récepteurs périphériques (type TRPs) et/ou la neurotransmission centrale (Haji et al., 2013).

3.1.3 Voie motrice

Les informations venant des neurones localisés dans la région caudale du groupe ventral respiratoire (incluant ceux du complexe Bötzinger et pré-Bötzinger) sont transmises d'abord aux neurones prémoteurs bulbo-spinaux inspiratoires et expiratoires, qui vont projeter l'information aux motoneurones phréniques,

intercostaux et abdominaux. Pour les muscles des voies aériennes supérieures, les informations sont transmises aux motoneurones vagaux et glossopharyngiens (Morris et al., 2003; Shannon et al., 1998; Widdicombe, 1954a). Les neurones localisés dans la partie ventro-latérale médullaire intervient aussi dans la modulation de la toux comme dans la régulation du régime respiratoire. Ces neurones ont des connexions avec les neurones du noyau du raphé, de la formation réticulaire, du groupe respiratoire du pont et des régions cérébelleuses (Bongianni et al., 1998; Shannon et al., 2000; Shannon et al., 1998).

Pendant la phase inspiratoire de la toux, les motoneurones glottiques, des muscles intercostaux et du diaphragme ont reçu des informations du noyau ambigu via les nerfs vagal et laryngé et les muscles glottiques sont en abduction (Suarez et al., 2002). Les motoneurones des voies aériennes supérieures sont localisés au niveau cérébral, les motoneurones phréniques qui contrôlent le diaphragme dans la moelle cervicale et de la cage thoracique et des muscles abdominaux dans la moelle thoracolombaire (Brooks, 2011; Hilaire and Duron, 1999). Le centre inspiratoire commande les motoneurones de manière séquentielle, d'abord ceux des voies aériennes supérieures, puis ceux du diaphragme et de la cage thoracique. Suite à la contraction du diaphragme et à la chute de la pression trachéale la glotte s'ouvre (Hilaire and Duron, 1999). Les voies respiratoires supérieures sont ouvertes, les muscles intercostaux et le diaphragme contractés pour permettre une expansion maximale de la cage thoracique (Dozier et al., 2006; Pickering and Jones, 2002).

Dans la phase compressive, les motoneurones laryngés sont hyperpolarisés pendant la phase de transition de la phase inspiratoire à la phase expiratoire, puis ils sont dépolarisés dans la phase compressive (Brooks, 2011). Les muscles laryngés adducteurs se contractent rapidement en même temps que les abducteurs se relaxent pour réaliser une fermeture complète de la glotte. En même temps, le diaphragme et les muscles abdominaux sont contractés de manière isométrique (Brooks, 2011).

Dans la phase expulsive, les muscles adducteurs laryngés se contractent avant la relaxation du diaphragme et des muscles abdominaux (Poliacek et al., 2003). L'inhibition des motoneurones laryngés adducteurs est très importante pour la phase expiratoire (Shiba et al., 2007). Le muscle crico-aryténoïde postérieur se contracte rapidement secondairement à la pression positive pleurale. La contraction du muscle cricothyroïde contribue à une meilleure ouverture de la glotte. A la fin de la phase

expulsive, le diaphragme commence à se relaxer (Poliacek et al., 2003; Shiba et al., 2007).

Les réponses motrices dans la toux sont ainsi très complexes et l'intervention du système nerveux est essentielle pour la coordination des divers muscles intervenants dans la toux (le diaphragme, les muscles thoracique et abdominaux et la glotte).

3.2 Mécanismes de passage à la chronicité

La toux aiguë est une toux durant moins de 3 semaines et qui est habituellement due à une infection respiratoire, souvent virale, des voies aériennes supérieures. Une toux persistant plus de 8 semaines est qualifiée de « chronique » : elle est souvent négligée depuis assez longtemps par le patient avant qu'il ne consulte son médecin. La toux chronique peut durer plusieurs mois, voire plusieurs années et sa prise en charge est difficile du fait d'une connaissance incomplète des mécanismes du passage à la chronicité et également du fait du manque de traitements antitussifs efficaces. Toutefois, il y a eu de récents progrès ces dernières années, à la fois dans l'approche diagnostique et la connaissance globale du processus de la toux chronique, avec en perspective de nouveaux antitussifs plus efficaces (Chung and Pavord, 2008; Didier, 2015; Narula et al., 2014).

L'évolution majeure des dernières années concernant les concepts de la toux consiste en l'intégration des mécanismes de toux aiguë et chronique dans un schéma physiopathologique commun selon un modèle neurophysiologique **(figure 10)** (Chung et al., 2013; Didier 2015). Ainsi les causes de la toux, comme la rhinorrhée postérieure, le reflux gastro-œsophagien et l'hyperréactivité bronchique isolée, sont vues comme des déclencheurs de toux chronique ayant comme substratum physiopathologique commun une augmentation du réflexe de toux (Chung et al., 2013).

Selon ce modèle, la sommation spatiotemporelle d'informations excitatrices (PPSE) ou inhibitrices (PPSI) va générer ou non un potentiel d'action si un stimulus atteint le seuil liminaire. La toux aiguë (situation 1 dans la figure) est le résultat d'informations excitatrices afférentes aboutissant systématiquement à un potentiel d'action de toux lorsque les fibres Aδ mécanosensibles sont activées (qui ont un rôle de protection vitale) ou à un potentiel d'action de toux si la voie des fibres C est

suffisamment stimulée : le réflexe de toux est normal dans cette situation (Didier, 2015).

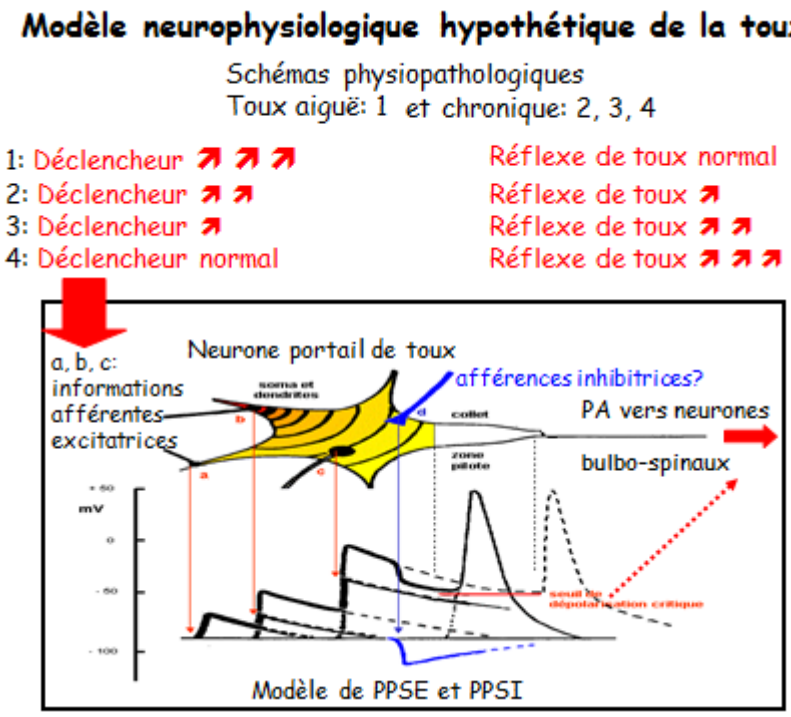


Figure 10 : Modélisation de la toux (D'après Didier A, 2015)
PPSE, potentiel post-synaptique excitateur ; PPSI, potentiel post-synaptique inhibiteur

Dans la toux chronique (situations 2, 3 et 4 dans la figure 10) il existe une augmentation du réflexe de toux, qui peut être plus ou moins importante (situation 4>3>2). Initialement, les patients décrivent des périodes transitoires et répétées de toux, puis dans l'évolution celle-ci devient constante. Dans la situation 2, de « chronicité initiale » le traitement du facteur déclenchant de toux est habituellement efficace ; dans la situation 3, de « chronicité aggravée » le traitement du facteur déclenchant de la toux devient moins efficace et dans la situation 4, « allotussia » la toux apparaît même pour des stimuli habituellement non tussigènes. Les situations 3 et 4 font partie du syndrome d'hypersensibilité de la toux (CSH). On pense que l'hypersensibilité du réflexe de toux est probablement déjà présente dans la situation 2 et que l'évolution va en s'aggravant (Chung et al., 2013; Didier, 2015).

Les mécanismes de passage à la chronicité de la toux (l'apparition de la sensibilité à la toux) peuvent être classés en périphériques et centraux (Bonham et al., 2006; Carr and Lee, 2006; Chung et al., 2013).

Des mécanismes de plasticité périphérique ont été décrits avec l'hypothèse d'une hypersensibilité ou d'une hyperexpression des récepteurs de la toux (Carr and Lee, 2006; Chung et al., 2013). Les nerfs sensitifs afférents peuvent être sensibilisés par des molécules neuroactives comme le nerve growth factor (NGF) via une modification des profils d'activation des nerfs afférents de la toux et une facilitation des signaux d'encodage afférents en réponse aux stimuli irritants (Carr and Lee, 2006; Chuaychoo et al., 2005a; Myers et al., 2002) **(figure 11).**La sensibilité de la toux peut aussi être liée à une modification de l'expression des canaux ioniques et d'autres récepteurs, dont les TRPV1, qui régulent l'excitabilité des nerfs afférents à des nombreux stimuli chimiques comme décrit dans l'étude publiée par Groneberg où il y avait une surexpression de ces canaux, chez les patients ayant une toux chronique (Groneberg et al., 2004). Malgré ces données, l'utilisation dans un essai thérapeutique récent d'un inhibiteur de ces récepteurs n'a pas démontré d'effet clinique sur la toux chronique en dépit d'une amélioration du test à la capsaïcine (Khalid et al., 2014) démontrant ainsi que ces mécanismes n'interviennent pas dans la modulation de la toux.

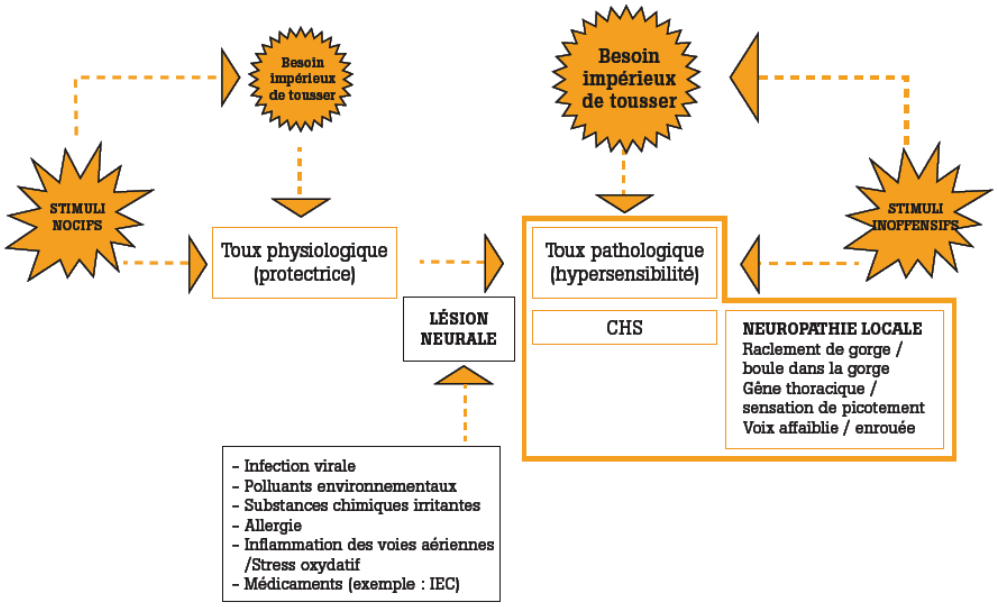


Figure 11: Schéma reliant les lésions neuropathiques des nerfs sensitifs au CHS (cough hypersensitivity syndrome) entraînant une toux pathologique (Didier, 2015)

Les mécanismes centraux interviennent aussi dans l'hypersensibilité de la toux. Pour preuve, l'imagerie cérébrale fonctionnelle a montré des nombreuses voies d'activation neuronales (avec des centres stimulateurs et inhibiteurs) pendant la toux volontaire et le besoin de tousser (Mazzone et al., 2011a; Mazzone et al., 2007). L'hypersensibilité de la toux peut être la conséquence de l'amplification au niveau central des signaux afférents normaux via une interaction entre différents sous-groupes de neurones afférents dans le tronc cérébral (Mazzone et al., 2005 ; Didier, 2015). Un neuropeptide exprimé dans les nocicepteurs et mécanorécepteurs des voies aériennes peut entraîner une baisse du seuil du réflexe de la toux via la convergence vers des neurones du tronc cérébral (Mazzone and Canning, 2002). Ce processus peut entraîner l'amplification des signaux entrants reçus par le « réseau de la toux » au niveau du tronc cérébral. Par exemple, chez le primate, une exposition à la fumée de cigarette entraîne une augmentation de l'excitabilité des neurones localisés dans le tronc cérébral, neurones qui reçoivent les afférences provenant des voies aériennes ; cet effet peut être prévenu par l'inhibition du neuropeptide, la substance P (Sekizawa et al., 2011). Après l'induction de l'expression de ce neuropeptide par les mécanorécepteurs des voies aériennes après une exposition à un antigène ou un virus (Chuaychoo et al., 2005a; Myers et al., 2002), les influx afférents ne sont plus nécessaires pour causer une sensibilisation au niveau central. Les neurones de la moelle qui reçoivent les afférences des voies aériennes ont aussi des projections vers de nombreux noyaux sous-corticaux dans le pont, le thalamus, l'hypothalamus, le mésencéphale et les amygdales comme démontré dans les études d'imagerie cérébrale fonctionnelle (Mazzone et al., 2011a; Mazzone et al., 2007).

La plasticité centrale peut affecter les neurones afférents, modifier la libération de neurotransmetteurs ou neuromodulateurs, agir via des médiateurs circulants jusqu'au NTS ou encore être associée à des modifications intrinsèques des différents récepteurs impliqués dans le réflexe de toux (Bonham et al., 2006). A l'heure actuelle, il existe des arguments expérimentaux démontrant une plasticité des neurones du NTS, ce qui en fait une cible thérapeutique majeure. Depuis l'acceptation du concept de toux chronique comme véritable « neuropathie » des nouvelles thérapies comme la gabapentine et l'amitriptyline (utilisées habituellement dans le traitement de la douleur neuropathe) sont développées dans cette pathologie avec des résultats qui semblent intéressants (Chung et al., 2013;

Mazzone et al., 2011b; Ryan et al., 2012) et beaucoup d'autres molécules ciblant ces voies sont en cours d'étude comme représenté dans la **figure 12**.

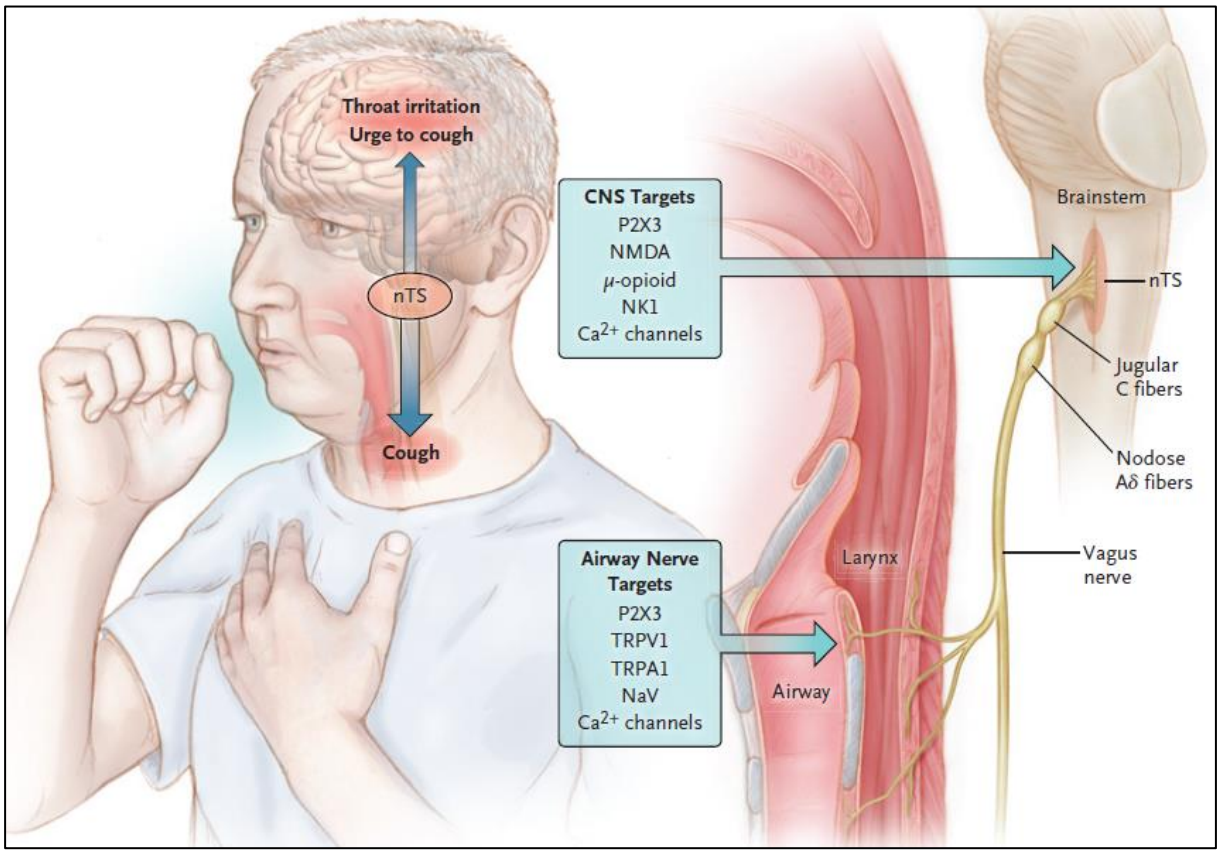


Figure 12. Cibles thérapeutiques des voies neurologiques intervenant dans le contrôle de la toux (Smith and Woodcock, 2016)

Les fibres C, avec les corps neuronaux dans le ganglion vagal supérieur (jugulaire) et les fibres Aδ dans le ganglion vagal inférieur (nodal) sont les principales voies afférentes vagales intervenant dans la toux. Leurs récepteurs et les canaux ioniques sont représentés. Les récepteurs purinergiques P2X3 peuvent être retrouvés à la fois dans les terminaisons nerveuses périphériques, comme dans le NTS au niveau du système nerveux central. Les récepteurs TRPA1 et TRPV1 localisés au niveau des terminaisons nerveuses périphériques sont capables d'initier le potentiel d'action et les canaux de Na voltages dépendants sont responsables de la transmission du potentiel d'action.

Dans le système nerveux central, le dextrométhorphane réagit sur les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). La morphine a un effet antitussif par l'action sur les recepteurs μ-opioides, la gabapentine et la prégabaline modulent l'activation des canaux de Ca dans le système nerveux central et périphérique. Le récepteur de la néurokinine 1 (NK1) du NTS est ciblé par l'aprépitant, un traitement antiémétique utilisé dans la prophylaxie de vomissements chimio-induites qui pourrait avoir aussi un effet antitussif (Smith JA, 2016).

II. TOUX, ASTHME, ALLERGIE

Dans les pathologies allergiques respiratoires et l'asthme, la toux, est un symptôme fréquent qu'elle soit aiguë ou chronique évoquant en général un contrôle insuffisant de la maladie sous-jacente nécessitant souvent un renforcement thérapeutique. En absence de réponse de la toux au traitement spécifique de l'atteinte respiratoire, la recherche de comorbidités (ex reflux gastro-oesophagien, rhinosinusite) comme causes potentielles de la toux doit être systématique.

Pour le clinicien, une toux d'apparence isolée peut poser des vrais problèmes diagnostiques d'où la nécessité d'une démarche diagnostique rationnelle. L'asthme et les allergies respiratoires en général sont des causes à évoquer de manière systématique dans ce contexte.

1. Toux - Asthme

Selon la définition du Global Initiative for Asthma (GINA), l'asthme est une maladie inflammatoire chronique de voies aériennes, hétérogène, responsable de symptômes de type dyspnée sifflante, oppression thoracique et toux, variables dans le temps, en fréquence et en intensité. Ces symptômes sont habituellement associés sur le plan fonctionnel respiratoire à une obstruction bronchique d'intensité variable, réversible au moins partiellement, spontanément ou sous traitement bronchodilatateur, et à la présence d'une hyperréactivité bronchique en réponse à différents stimuli physiques ou pharmacologiques (GINA 2016). L'asthme est l'une des maladies respiratoires chroniques parmi les plus fréquentes chez l'enfant et l'adulte avec une prévalence estimée en France à 10% chez l'enfant et 6-7% chez l'adulte (Delmas et al., 2010).

En général, dans l'asthme, la toux est rarement isolée et elle est souvent associée à d'autres symptômes respiratoires de type oppression thoracique ou dyspnée sifflante mais il existe des formes particulières d'asthme qui peuvent se manifester principalement sous la forme d'une toux chronique, volontiers nocturne ; le diagnostic est confirmé par la présence d'une hyperréactivité bronchique (Niimi, 2013). A l'interrogatoire, on identifie assez souvent les facteurs déclenchants

classiques : exposition aux allergènes, au froid/brouillard ou à des irritants, effort ou émotions. A l'auscultation pulmonaire on peut mettre en évidence des râles sibilants, témoins du bronchospasme au décours de la crise. A l'interrogatoire, en dehors de symptômes respiratoires évocateurs d'asthme, 70-80% des sujets jeunes ont un terrain atopique (Migueres et al., 2011). La recherche d'un terrain atopique est recommandée de manière systématique en cas de toux lorsqu'un asthme est suspecté (Tillie-Leblond and Godard, 2007).

Chez les patients ayant un asthme, on retrouve souvent au niveau de la paroi bronchique un infiltrat important de cellules inflammatoires comme des éosinophiles, lymphocytes, mastocytes, parfois des neutrophiles (Beasley et al., 1989; Robinson et al., 1992). Les anomalies histologiques souvent retrouvées chez l'asthmatique sont : l'hypersécrétion de mucus, l'épaississement de la membrane basale et une hypertrophie du muscle lisse de la paroi bronchique (Adamko et al., 2003).

L'exploration fonctionnelle respiratoire peut confirmer la présence d'un trouble ventilatoire obstructif (VEMS/CVF<0,7) avec amélioration d'au moins 12% et 200 ml du VEMS (volume expiratoire maximal à la première seconde) après l'inhalation d'un béta-2-mimétique de courte durée d'action (GINA, 2016). En cas d'exploration fonctionnelle respiratoire normale à l'état basal, l'hyperréactivité bronchique est recherchée. Celle-ci est définie par une bronchoconstriction et une chute du VEMS après l'administration de divers stimuli comme la méthacholine, l'histamine, le mannitol, le sérum salé hypertonique ou encore par l'hyperventilation isocapnique ou l'exercice. En France, on utilise en général, le test à la méthacholine qui est considéré positif si l'on enregistre une chute d'au moins 20% du VEMS après l'inhalation d'une dose inférieure à 2000 microg de méthacholine (GINA, 2016).

La mesure du NO exhalé semble intéressante pour le dépistage de l'asthme au cabinet avec une valeur prédictive positive pour diagnostiquer l'asthme comparable à celle des tests de provocation bronchique sans risque d'obstruction bronchique (Berkman et al., 2005). Concernant l'intérêt de la mesure du NO exhalée dans la toux chronique isolée, dans deux études publiées (Chatkin et al., 1999; Kowal et al., 2009) la valeur prédictive positive du test est estimée à 63%, respectivement 70% et la valeur prédictive négative est de 93% qui renforce l'intérêt de cet examen non invasif (Didier, 2015). La limite la plus importante de ce test est qu'il ne permet pas le diagnostic différentiel asthme/bronchite à éosinophiles (Oh et al., 2008).

La toux équivalente d'asthme est une forme atypique d'asthme caractérisée par une toux sèche, à prédominance nocturne, sans autre symptôme d'asthme avec une hyperréactivité bronchique et une inflammation à éosinophiles retrouvée dans l'expectoration, le liquide de LBA ou la sous-muqueuse des voies aériennes (Niimi et al., 1998). La prévalence de la toux équivalente d'asthme est estimée à 13% chez les patients qui consultent pour un problème de toux chronique (Brightling and Pavord, 2000). Les biomarqueurs des expectorations sont similaires dans la toux équivalent d'asthme comme dans l'asthme et l'administration précoce des corticoïdes par voie inhalée prévient la progression vers un asthme classique (Niimi, 2011b).

L'asthme induit par l'exercice est une autre forme particulière d'asthme. La prévalence de l'asthme induit par l'exercice dans la population d'asthmatiques peut aller jusqu'à 40% selon les diverses études (Del Giacco et al., 2015). Il s'agit d'une bronchoconstriction qui apparaît 2 à 10 minutes après la pratique du sport et 75-80% d'asthmatiques n'ayant pas un traitement de fond de l'asthme peuvent décrire des gènes respiratoires à l'effort (Del Giacco et al., 2015). Le mécanisme exact de la bronchoconstriction à l'exercice n'est pas complètement élucidé. Anderson suggère que l'hyperventilation induite par l'exercice augmente l'osmolarité du liquide dans les voies respiratoires avec la libération des médiateurs et bronchoconstriction (la théorie osmolaire avec sècheresse de voies aériennes) (Anderson et al., 1982) et McFadden soutient que le changement rapide de température au niveau des voies aériennes au décours de l'exercice entraîne une hyperémie et un œdème de la muqueuse avec diminution secondaire du calibre bronchique (la théorie vasculaire) (McFadden et al., 1986). La bronchoconstriction induite par l'exercice peut être prévenue par l'administration de béta-2-agonistes, 15 minutes avant la pratique du sport. Dans certains cas particuliers, cela peut poser des problèmes de dopage pour les athlètes, mais le traitement de fond est essentiel dans l'asthme d'effort (Del Giacco et al., 2015).

Malgré le fait que dans les recommandations internationales, la toux ne fasse pas vraiment partie des critères de contrôle de l'asthme, la prise en charge débute en général par la corticothérapie inhalée à dose faible ou moyenne (Delmas et al., 2010). La mesure du NO exhalé peut être utilisée dans la pratique courante afin d'adapter au mieux la traitement en sachant que ce marqueur paraît bien corrélé à la réponse à la corticothérapie inhalée (Smith et al., 2005). En absence d'une réponse

satisfaisante à la corticothérapie inhalée, un traitement par antileucotriènes peut être proposé aux patients ayant une toux équivalente d'asthme (Morice et al., 2006; Niimi, 2011a; Spector and Tan, 2004). Leur mécanisme d'action et les effets thérapeutiques sont représentés dans la **figure 13**. La toux est souvent le symptôme le plus rapporté par les patients ayant un asthme, alors que leur asthme est bien contrôlé par les corticostéroïdes inhalés (Didier, 2015).

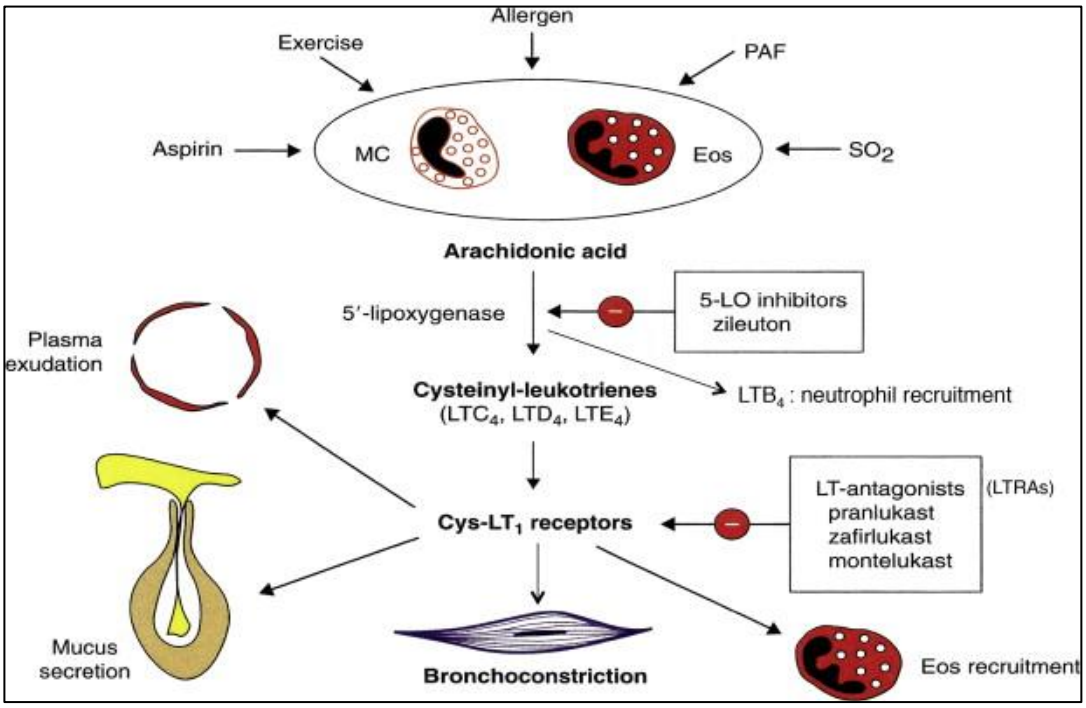


Figure 13 : Effets des cystéinil leucotrienes et leurs antagonistes dans l'asthme (Niimi, 2013)

PAF : Platelet-activating factor ; MC : mastocyte ; Eos : eosinophil ; 5-LO : 5-lipoxygenase ; Cys— LT1 receptors: cysteinyl-leukotrienes receptors type 1

2. Toux- Allergie respiratoire

La toux atopique (dans la littérature anglo-saxonne « atopic cough ») est une entité très controversée (Gibson et al., 1989). Elle est définie par une toux chronique isolée chez un sujet atopique (éosinophilie sanguine, élévation des Ig E totales > 200 UI/ml, tests cutanés aux pneumallergènes positifs avec élévation des Ig E spécifiques pour ces mêmes pneumallergènes), avec une éosinophilie dans les expectorations, une hypersensibilité du réflexe de toux, une fonction respiratoire

normale et l'absence d'hyperréactivité bronchique associée ou d'atteinte ORL (Fujimura et al., 2003).

La sensibilité à la capsaïcine chez les patients asthmatiques allergiques au pollen de bouleau augmente pendant la saison pollinique de celui-ci démontrant ainsi que l'inflammation allergique peut déclencher une sensibilité accrue du réflexe de toux (Weinfeld et al., 2002).

La prise en charge de celle-ci correspond en général à la prise en charge de l'allergie avec éviction allergénique, traitement symptomatique (antihistaminique) voire anti-inflammatoire (corticoïdes inhalés ou antileucotriène) (Niimi, 2013).

3. Toux - Bronchite à éosinophiles

Sa prévalence est estimée, selon les diverses séries entre 10 et 15% des toux chroniques (Ayik et al., 2003; Brightling et al., 1999). La bronchite à éosinophiles est caractérisée sur le plan clinique par une toux gênante sans autres symptômes respiratoires, sans terrain atopique, ni hyperréactivité bronchique, mais avec un taux élevé d'éosinophiles dans l'expectoration (>3% des cellules non squameuses) (Brightling et al., 2000a; Gibson et al., 1989). Comme dans l'asthme, sur le plan histologique, on peut retrouver un épaississement de la paroi bronchique et de la membrane basale sous-épithéliale, avec infiltration d'éosinophiles. Contrairement à l'asthme, les mastocytes peuvent persister dans les structures superficielles de la bronche sans infiltration dans la couche musculaire (Brightling, 2011; Brightling et al., 2002b).

L'étape clé du diagnostic repose sur la mise en évidence de l'éosinophilie bronchique, ce qui nécessite la réalisation d'une expectoration induite. L'équipe du CHU de Toulouse propose une approche diagnostique simplifiée reposant sur l'association suivante : absence de trouble ventilatoire obstructif, absence d'hyperréactivité bronchique et augmentation du NO exhalé (Didier, 2015).

La toux éosinophilique est bien contrôlée en général par les corticoïdes inhalés, impliquant un rôle majeur de l'inflammation. L'implication des cellules inflammatoires telles que les éosinophiles est prouvée par le fait que les corticostéroïdes réduisent l'inflammation éosinophilique et inhibent la toux (Niimi, 2011b).

4. Rôle de l'inflammation bronchique à éosinophilies dans la modulation de la toux

Les pathologies chroniques à éosinophiles telles que l'asthme et la bronchite à éosinophiles se traduisent souvent par une toux chronique ; la suppression de l'inflammation éosinophilique améliore la toux, ce qui indique que les éosinophiles ont un rôle dans la pathogénie de la toux (Didier, 2015; Doherty et al., 2000).Un argument de plus en faveur de l'implication directe des éosinophiles dans le réflexe de toux est l'amélioration de la toux rapportée dans un cas de syndrome hyperéosinophilique (maladie génétique impliquant la partie α des récepteurs FIP1-like-platelet-derived growth factor, liée à la tyrosine-kinase) par l'administration d'un inhibiteur de tyrosine-kinase, imatinib (Chung et al., 2006).

- **Mécanismes moléculaires impliqués dans l'inflammation bronchique à éosinophiles**

Les éosinophiles sont des granulocytes bilobés, facile à reconnaitre en raison de la présence des granules acidophiles au niveau du cytoplasme et qui représentent 1-4% des cellules sanguines circulantes (George and Brightling, 2016). La différenciation des éosinophiles dans la moelle a lieu sous l'influence du granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) et de l'IL 5. Les éosinophiles matures sont libérés dans la circulation, arrivent au niveau de l'endothélium vasculaire des voies aériennes et migrent dans le tissu grâce aux molécules d'adhésion (George and Brightling, 2016) **(Figure 14)**.

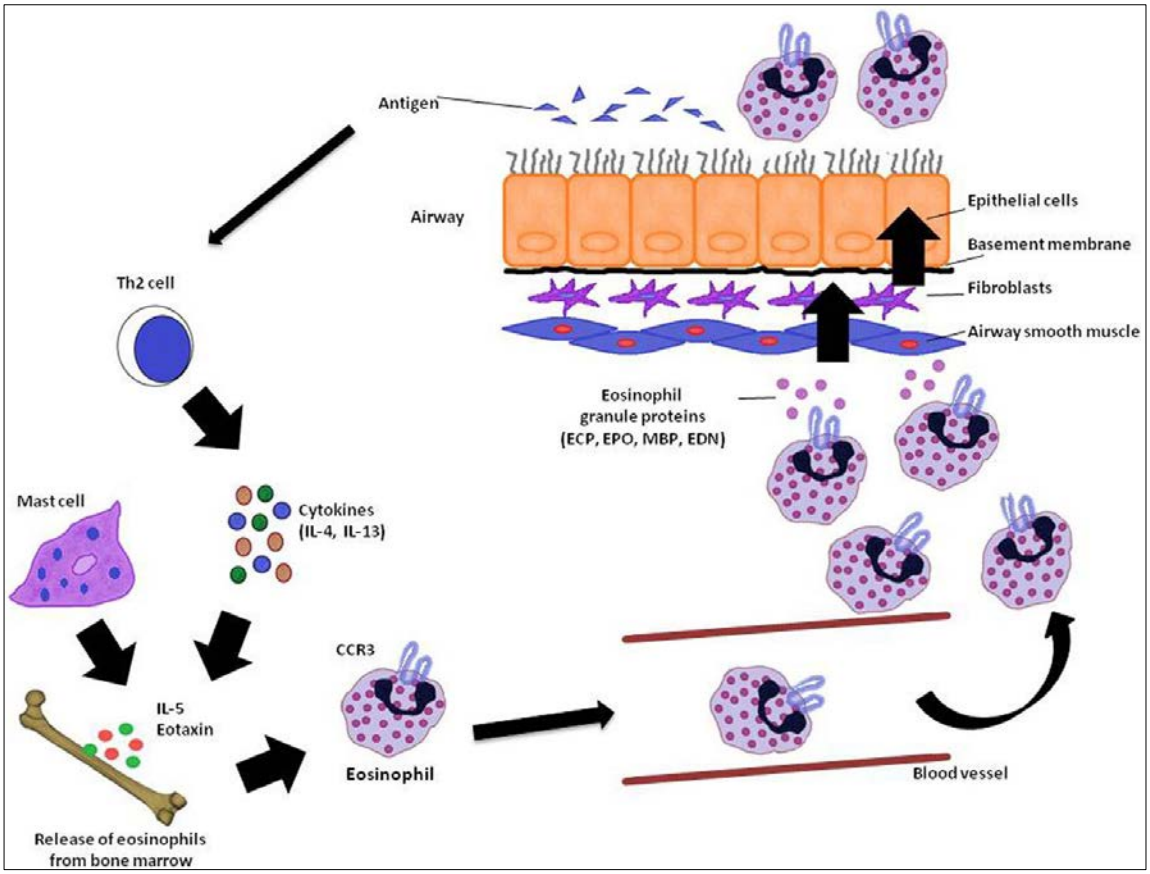


Figure 14 : Recrutement des éosinophiles dans l'asthme (Ghosh et al., 2013)
ECP: eosinophil cationic protein; EPO, eosinophil peroxidase; MBP, major basic protein; EDN : eosinophil-derived neurotoxin.

Les éosinophiles jouent un rôle majeur dans l'asthme qu'il soit allergique ou non allergique (de Groot et al., 2015). Chez les patients allergiques, l'exposition à l'allergène provoque une augmentation du nombre d'éosinophiles dans l'expectoration (Pin et al., 1992). La réponse allergique est biphasique avec une phase initiale de dégranulation mastocytaire (Durham et al., 1988), suivie d'une phase tardive liée à l'infiltration cellulaire dans les voies aériennes quand les éosinophiles jouent un rôle majeur (Aalbers et al., 1993) **(Figure 15)**.

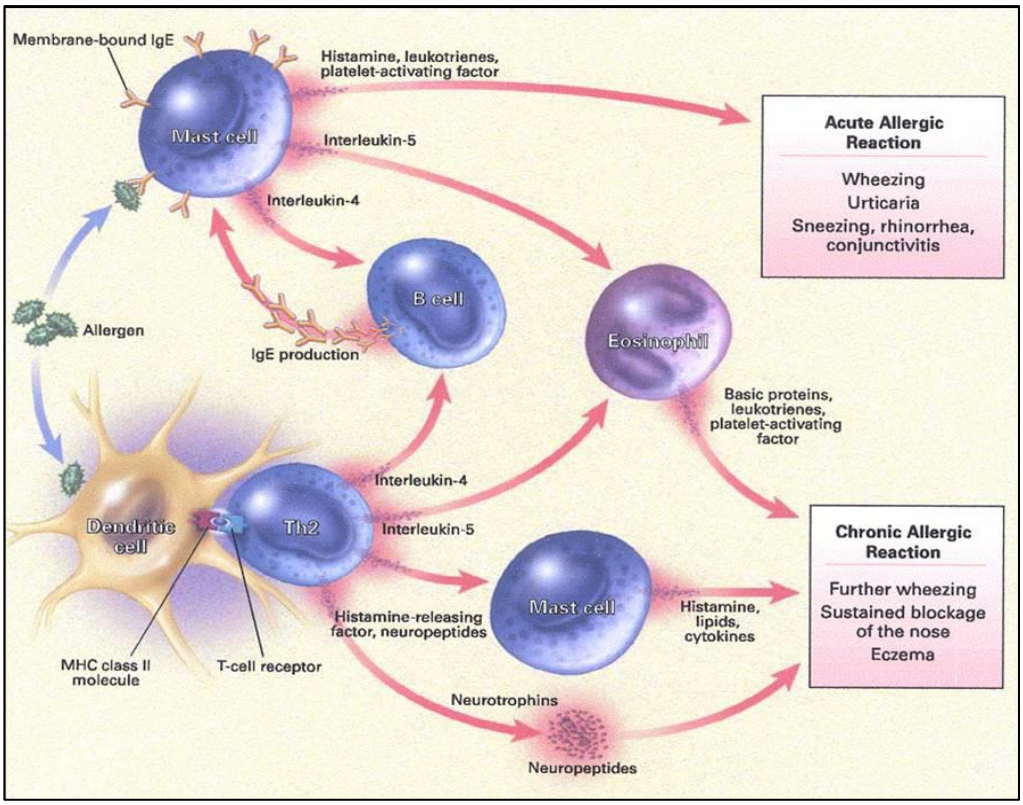


Figure 15. Rôle de l'éosinophile dans la réaction allergique (Kay, 2001)

Les éosinophiles migrent comme les autres cellules inflammatoires et ils libèrent des produits cytotoxiques pendant la phase de dégranulation: la protéine basique majeure (MBP), la protéine cationique de l'éosinophile (ECP), la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN) et la peroxydase de l'éosinophile (EPO) (de Groot et al., 2015). Ils libèrent aussi des chémokines qui peuvent endommager l'épithélium, favoriser l'apparition de l'œdème, la production excessive de mucus et l'hyperréactivité bronchique (AHR) et avoir un rôle dans le remodelage bronchique (Eum et al., 2005) comme représenté dans la **figure 16**.

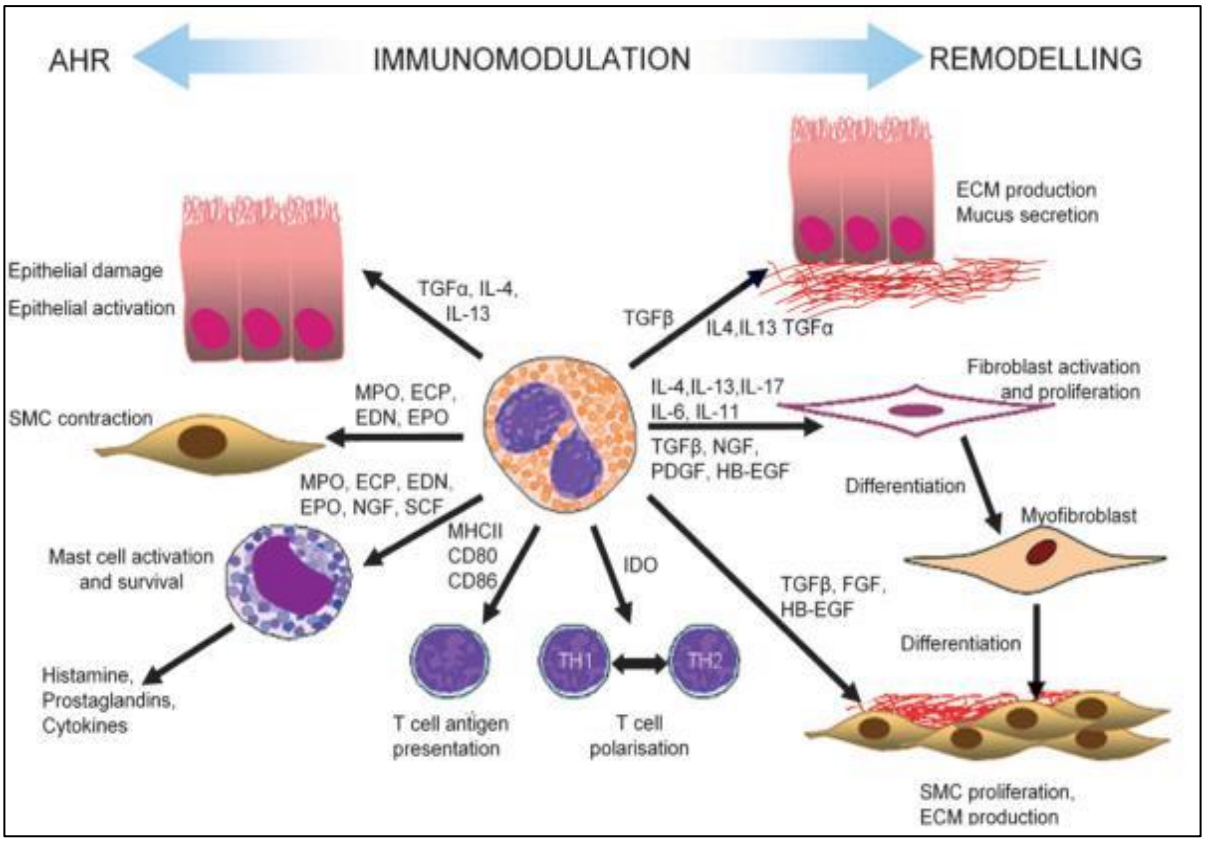


Figure 16. Mécanismes moléculaires pouvant expliquer l'implication de l'éosinophile dans l'hyperréactivité bronchique, le remodelage bronchique et la modulation de la réponse immune (Trivedi and Lloyd, 2007)

ECM: extracellular matrix; FGF: fibroblast growth factor; HB-EGF: heparin-binding epidermal growth factor ; IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase ; NGF : nerve growth factor ; SCF : stem cell factor ; TGF-β, TGF-α: transforming growth factor; VEGF: vascular endothelial factor

Dans l'asthme allergique, le lymphocyte Th2 est le « chef d'orchestre » de la réaction immunitaire avec une expression importante des cytokines de type IL 4, IL 5 et IL 13 (Barrett and Austen, 2009). IL 4 initie l'activation d'autres Ly Th2 ainsi que la production d'anticorps Ig E par les Ly B et modifie la production de chémokynes au niveau de l'épithélium (Li-Weber and Krammer, 2003). IL 5 joue un rôle important dans la maturation, la migration et la survie de l'éosinophile et IL 13 a un rôle proinflammatoire, augmente la sécrétion de mucus, favorise l'apparition de la fibrose subépithéliale et la production de l'éotaxine (Zhu et al., 1999). IL 13 augmente aussi l'hyperréactivité bronchique (Eum et al., 2005).

Dans l'inflammation bronchique éosinophilique non-allergique, des données récentes suggèrent l'implication importante des cellules lymphoïdes innées (ILCs) (Brusselle et al., 2013; Lambrecht and Hammad, 2015; Yu et al., 2014). ILCs sont

activées par IL 25, IL 33 et la lymphoprotéine stromale thymique (Walker et al., 2013) et sont présentes au niveau de l'épithélium lors de l'exposition aux virus, aux allergènes fongiques et aux polluants atmosphériques. La production des cytokines par ces cellules est aussi stimulée par la prostaglandine D2 via l'activation du récepteur chémoattractant homologue exprimé sur le Ly Th2 (Xue et al., 2014). Comme lors de l'activation de Ly Th2, les ILCs activés produisent des IL 5 et IL 13 capables d'induire une inflammation à éosinophiles des voies aériennes indépendamment de Ly T (de Groot et al., 2015) (**figure 17**).

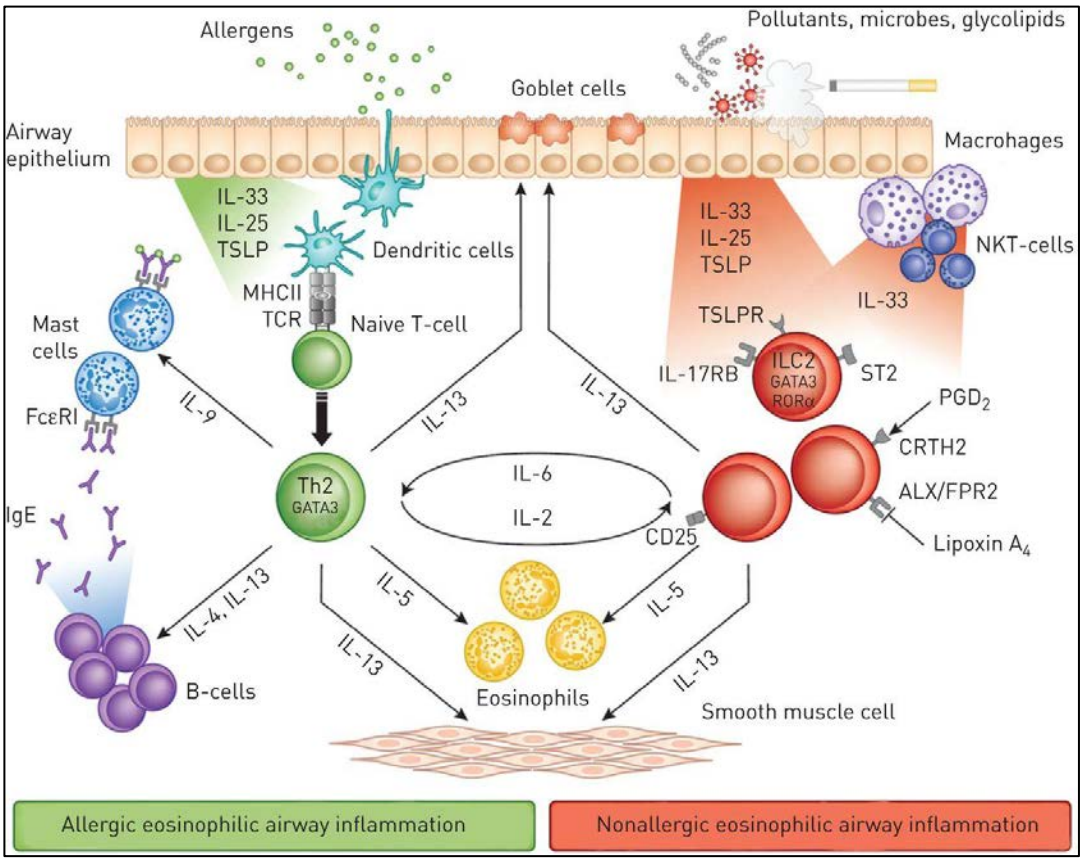


Figure 17: Deux différentes voies expliquant l'inflammation éosinophilique dans l'asthme (Brusselle et al., 2013)

TSL: thymic stromal lymphopoietin; ILCs: innate lymphoid cells; TSLPR, IL-17RB, ST2 receptors on ILCs; CRTH2: chemoattractant receptor homologous molecule expressed on Th2 cells; ALX/FPR2: receptor for lipoxin A4; FcεRI: high-afinity receptor for Ig E; GATA3: GATA-binding protein 3; PG; prostaglandin; ROR: retinoic acid receptor-related orphan receptor; NK: natural killer; MHC: major histocompatibility complex; TCR: T-cell receptor.

De plus, les ILCs ont un rôle essentiel dans la persistance de l'asthme (Christianson et al., 2015). Dans l'asthme, les deux voies Th2 et ILCs augmentent la production de IL 5 qui peut induire une inflammation éosinophilique des voies aériennes (de Groot et al., 2015).

- **Mécanismes pouvant expliquer le rôle de l'éosinophile dans la pathogenèse de la toux**

L'éosinophile est une source importante de médiateurs inflammatoires comme la prostaglandine E2, F2α, thromboxane A2, et des neuropeptides comme la substance P (SP) qui jouent un rôle potentiel dans la toux et/ou la bronchoconstriction (Niimi et al., 2014).

Les éosinophiles sont localisés au même endroit que les nerfs sensitifs des voies aériennes (Costello et al., 1997) et la libération de médiateurs comme l'éosinophile peroxydase et les cysteinyl leucotrienes entraînent une stimulation du système nerveux parasympathique avec un effet bronchoconstricteur. (Kingham et al., 2002). En même temps la libération des médiateurs des granules des éosinophiles entraîne aussi des altérations au niveau de l'épithélium bronchique exposant mieux les récepteurs de la toux aux agressions extérieures. Ces modifications ont comme résultats une hyperréactivité bronchique chez les patients asthmatiques (Beasley et al., 1989) et une hypersensibilité du réflex de toux chez les tousseurs chroniques non-asthmatiques (Niimi et al., 2005). En plus, la toux elle-même peut entraîner des altérations au niveau de l'épithélium respiratoire entretenant ainsi l'hypersensibilité à la toux (Niimi, 2011b).

Les effets neuro-inflammatoires de ces médiateurs dérivés des éosinophiles pourraient représenter un mécanisme expliquant la persistance de l'hypersensibilité de réflexe de la toux dans l'inflammation des voies aériennes (Gu et al., 2008). Par exemple, la libération de MBP stimule les fibres C vagales de manière directe (Lee et al., 2001) via la substance P qui peut entraîner la toux (Garland et al., 1997). MPB active les cellules mastocytes qui libèrent des médiateurs protussigènes comme l'histamine et la prostaglandine D2 qui réagissent aussi via la substance P en stimulant les récepteurs de la toux (Piliponsky et al., 2003).

L'activation neuronale des voies aériennes est devenue une certitude chez les asthmatiques tousseurs comme démontrée par les taux élevés de substance P et

neurokinine A dans l'expectoration induite dans l'étude de Patterson (Patterson et al., 2007). Dans le même sens, chez les enfants ayant une toux chronique avec une sensibilité prouvée par le test à la capsaïcine on retrouve des taux élevés de neuropeptide CGRP (*calcitonine gene-related peptide*) dans l'aspiration bronchique (Chang et al., 2007). De plus, dans une étude publiée par O'Connell, des anomalies intraépithéliales des nerfs ont été décrites avec une augmentation de l'expression du CGRP dans les nerfs des voies aériennes de patients ayant une toux chronique (O'Connell et al., 1995).

Le NGF (*nerve growth factor)* est libéré par une multitude de cellules des voies aériennes, incluant les cellules de l'épithélium bronchique avec des conséquences neuro-inflammatoires importantes qui peuvent avoir un rôle dans la toux chronique. Le NGF semble agir sur les nerfs sensitifs des voies aériennes via les récepteurs TRPV1 (Didier, 2015). Dans les neurones de ganglion spinal de rat en culture, le NGF augmente l'expression de base et celle induite par la capsaïcine, de la substance P et de TRPV1 suggérant l'existence d'un mécanisme de sensibilisation nerveuse chronique (Yang et al., 2007). Dans une étude réalisée chez les patients ayant une hyperréactivité sensitive avec une toux induite par l'exposition aux parfums et aux substances chimiques, le taux de NGF au niveau de secrétions nasales était nettement augmenté par rapport aux témoins sains après la réalisation du test à la capsaïcine (Millqvist et al., 2005).

L'inhalation de certains médiateurs de l'inflammation comme la bradykinine et la prostaglandine E2 (PGE2) chez les sujets sains entraîne une augmentation de la réponse de la toux à la capsaïcine (Choudry et al., 1989).Les deux médiateurs sont capables d'induire une sensibilisation indirecte des réponses neuronales des voies aériennes à la capsaïcine, probablement par activation du canal TRPV1 par des voies intracellulaires (protéine kinase)(Kwong and Lee, 2005; Belvisi et al., 2016). Chez les patients ayant une toux chronique, dans l'air expiré il existe une augmentation des ions H^+. L'association de celle-ci avec l'expression des récepteurs TRPV1 dans les nerfs épithéliaux de ces patients pourrait constituer un bon fondement pour la majoration de la toux (Groneberg et al., 2004; Niimi et al., 2004) (**Figure 18**)

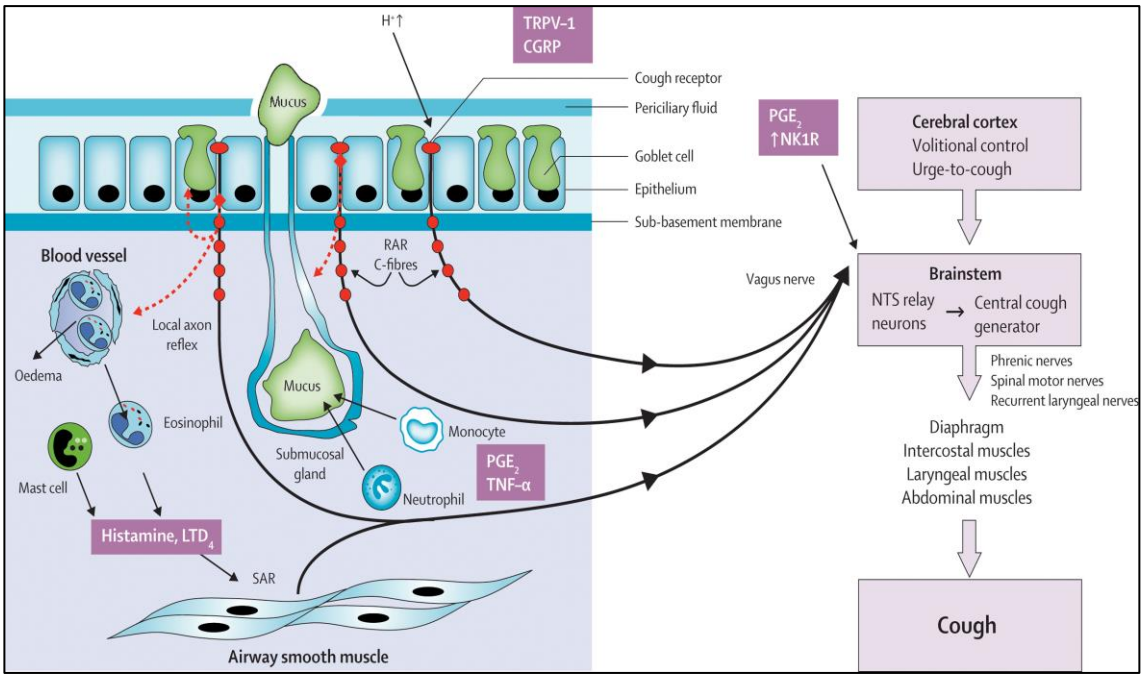


Figure 18. Mécanismes moléculaires et cellulaires intervenant dans le réflexe de toux (Chung and Pavord, 2008)

Les récepteurs laryngés et pulmonaires, comme RARs, SARs et les fibres C transmettent les informations aux neurones localisés au niveau du NTS qui coordonnent les muscles intervenant à l'effort de toux. Le cortex cérébral peut contrôler la toux volontaire ou la toux s'intégrant dans le syndrome d'hypersensibilité de la toux (CHS). Les facteurs locaux des voies aériennes qui peuvent influencer la toux sont illustrés. CGRP=calcitonin gene-related peptide; LTD4=leukotriene D4 ; PGE2=prostaglandin E ; NK1=neurokinin-1 ; TRPV=transient receptor potential vanilloid. TNF=tumour necrosis factor

Les données actuelles sur le modèle animal ne retrouvent qu'une faible corrélation entre la susceptibilité d'un stimulus à provoquer une toux et l'existence d'un bronchospasme. Par exemple, les substances connues pour leur effet bronchoconstricteur comme la substance P ou l'histamine et les agents tussigènes comme l'acide citrique ne sont pas capables de déclencher un réflexe de toux chez le cochon d'Inde (El-Hashim and Amine, 2005). Par contre, chez le chien si l'histamine n'est pas capable de déclencher une toux, elle est capable d'augmenter la toux faisant suite à une stimulation mécanique des voies aériennes (House et al., 2004). L'ensemble de ces données, difficile à interpréter en raison des résultats qui paraissent parfois contradictoires et les différences interespèces, souligne l'influence des modifications des variables respiratoires et gazométriques de la bronchoconstriction à moduler la toux (Cohn et al., 1978; Coleridge et al., 1982; Green et al., 1986; Lin et al., 2005; Olgiati et al., 1981). L'histamine est également

capable d'activer ou de moduler l'activité de certaines fibres C (Coleridge and Coleridge, 1984; Lee and Morton, 1993).

Même chez l'homme, jusqu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de preuve en faveur d'une franche corrélation entre la fonction pulmonaire et la réponse à un agent tussigène. Par exemple, chez l'asthmatique, la réponse à un test de provocation de la toux (seuil, intensité) est similaire à celle d'un sujet non asthmatique (Dicpinigaitis, 2007). En plus, l'administration d'une substance bronchodilatatrice ou bronchoconstrictrice n'a pas d'effet sur la toux alors que ces traitements modifient fortement le tonus musculaire lisse des voies aériennes ainsi que l'activité des RARs (Fujimura et al., 1993; Fujimura et al., 1992). Chez les patients allergiques asthmatiques, l'inhalation d'allergène provoque une inflammation à éosinophiles et une hyperréactivité bronchique mais n'augmente pas la réponse à la capsaïcine (Minoguchi et al., 2003).

Malgré les multiples recherches dans la pathogenèse de la toux en rapport avec l'inflammation bronchique à éosinophiles, les mécanismes impliqués sont loin d'être identifiés et les résultats des diverses études paraissent parfois contradictoires ; des études supplémentaires sont nécessaires afin d'éclaircir à l'avenir ces mécanismes complexes.

III. TOUX ET EXERCICE

1. Données cliniques et épidémiologiques

La toux est un symptôme fréquemment décrit à l'exercice, à la fois par les athlètes, comme par les non athlètes (Couillard et al., 2014; Langdeau et al., 2000).

Malheureusement, il n'y a pas d'étude de prévalence dans ce contexte dans la population générale mais chez les sportifs, sa prévalence est différente entre les sportifs ayant ou non un asthme. Selon l'étude de Turcotte (Turcotte et al., 2003) la prévalence de la toux chez les athlètes n'ayant pas d'asthme est de 6% et de 20% chez les athlètes asthmatiques. La prévalence de la toux semble aussi plus élevée chez les athlètes exerçant dans un environnement froid (Levesque et al., 2006), ainsi que chez les sportifs qui pratiquent les sports d'endurance par rapport à ceux qui pratiquent des sports de vitesse ou de puissance (Helenius et al., 1997).

La toux peut être isolée ou associée à d'autres symptômes respiratoires comme oppression thoracique, dyspnée sifflante, rhinorrhée ou obstruction nasale ; elle peut apparaître pendant l'exercice ou après l'exercice contrairement au bronchospasme induit par l'exercice qui apparaît classiquement 5-8 minutes après la fin de l'exercice (Didier, 2015). Selon une étude publiée en 2014 chez les athlètes, la perception de la toux était significativement plus importante chez les athlètes femmes versus hommes après le test de provocation d'hyperréactivité bronchique à la métacholine comme au test d'hyperventilation isocapnique ($p<0,05$) pouvant suggérer une influence des hormones œstrogènes et progestérone dans la modulation de la toux (Couillard et al., 2014). Les facteurs environnementaux (tabagisme passif, pollution atmosphérique, conditions météorologiques) jouent beaucoup sur la toux apparue au décours des efforts physiques. Des études récentes ont demontré une prévalence plus élevée de la toux chez les athlètes au decours de l'exercice pendant l'hiver vs l'été (18% *vs* 9%, $p=0,04$) probablèment favorisée par l'air sec et froid (Turmel et al., 2012).

2. Physiopathologie de la toux à l'exercice

A l'heure actuelle, les mécanismes qui interviennent ne sont pas encore complètement élucidés. Les rares données disponibles plaident en faveur d'une diminution de la réponse tussigène pendant l'exercice. Toutefois, ni la fréquence, ni l'intensité, ni la sensibilité aux agents tussigènes n'ont été évaluées de manière objective pendant l'exercice chez les sportifs ou chez les gens pratiquant des activités sportives (Didier, 2015).

Une étude pédiatrique réalisée en France a retrouvé une diminution du nombre de réflexes de toux pendant le test d'exercice réalisé sur un tapis roulant par rapport au repos après l'inhalation de l'aérosol de capsaïcine (Varechova, 2014). Une autre étude réalisée sur une population adulte retrouve des résultats similaires avec une baisse significative de la sensibilité de la toux induite par l'inhalation d'eau distillée pulsée par nébuliseur ultrasonique pendant le test d'effort réalisés sur bicyclette ergométrique comme pendant le test d'hyperventilation isocapnique (Lavorini et al., 2010). Ces éléments sont en faveur d'une modulation de la toux par l'exercice par des mécanismes complexes qui ne sont pas complètement éclaircis, mais il semblerait qu'il s'agisse d'interactions au niveau des centres de contrôle de la toux (Lavorini et al., 2010).

L'hyperpnée induite par l'exercice va activer les afférences proprioceptives en provenance des muscles de la cage thoracique pouvant induire un effet suppresseur sur le réflexe de toux (Didier, 2015). Cette hypothèse semble pertinente car dans une étude réalisée sur de sujets normaux, la stimulation des mêmes afférences par des vibrations au niveau de la cage thoracique entraîne une diminution de la sensibilité tussigène à l'acide citrique (Kondo et al., 1998). D'autres voies de modulation de la toux pendant l'exercice sont possibles comme, par exemple, l'activation des fibres C pulmonaires par l'augmentation du débit cardiaque ayant un effet suppresseur sur la toux (Didier, 2015; Paintal, 1969; Tatar et al., 1988). Dans le même sens, deux études sur un modèle de lapin démontrent une désensibilisation à la toux provoquée par la stimulation mécanique laryngée ou trachéale par l'hyperventilation induite, soit par l'hyperthermie (Javorka et al., 1994), soit par l'exercice (Poussel et al., 2014). Il semblerait que l'inhibition du réflexe de toux par l'exercice soit en partie liée à l'hyperventilation qu'il induit.

Pourtant, plusieurs phénomènes qui surviennent au cours de l'hyperpnée due à l'exercice physique pourraient être à l'origine d'une toux (**figure 19**). Par exemple, les manoeuvres forcées (comme celles au décours de l'effort physique) peuvent entraîner une déformation des récepteurs des voies aériennes et une libération des prostaglandines qui peuvent déclencher une toux via la stimulation des fibres C (Coleridge et al., 1976; Piper and Vane, 1971). Au décours de l'exercice, en respirant plus par la bouche et en shuntant le nez, les voies aériennes inferieures sont plus impliquées dans l'humidification et dans le réchauffement de l'air inspiré (Didier, 2015). L'hyperhémie présente au décours du réchauffement des voies aériennes peut activer de manière directe les récepteurs de toux par déformation des fibres nerveuses (Banner et al., 1985).

1. Déshydratation de l'épithélium des voies aériennes → stimulus hyperosmolaire

   a. stimulation directe des récepteurs de la toux
   b. production accrue de mucus
   c. perte de l'intégrité de la barrière épithéliale / desquamation de l'épithélium bronchique
      - libération des médiateurs inflammatoires
      - exposition directe des terminaisons nerveuses à la lumière des voies aériennes

2. Effet thermique de l'exercice dans l'environnement froid

   a. hyperhémie réactive / œdème de la paroi des voies aériennes
      - stimulation mécanique des récepteurs de la toux

3. Débits ventilatoires élevés

   a. exposition de l'épithélium bronchique à la contrainte de cisaillement
      - altérations de l'intégrité de la barrière épithéliale *(voir 1.c)*

   b. expirations forcées
      - facilitation du RGO
      - effet mécanique de la déformation des voies aériennes

   c. augmentation de l'exposition aux facteurs environnementaux
      - stimulation mécanique ou chimique des récepteurs de la toux
      - hyperréactivité tussigène
      - altérations de l'intégrité de la barrière épithéliale

Figure 19: Mécanismes physiopathologiques potentiels à l'origine d'une toux induite par l'hyperpnée à l'exercice (Didier, 2015)

Il est connu que plus l'air inspiré est sec et froid, plus grande est la fréquence respiratoire et plus grand est le nombre de voies aériennes recrutées pour le réchauffement (Anderson and Holzer, 2000; Didier, 2015). La conséquence de ce processus est la déshydratation de l'épithélium des voies aériennes et l'augmentation de l'osmolarité du liquide du revêtement de surface.

Une des premières études à avoir attirer l'attention sur la capacité du stimulus hyperosmolaire à provoquer un réflexe de toux, a été celle de Banner (Banner et al., 1984). Cette étude a démontré que la fréquence de la toux augmente de façon linéaire avec l'augmentation de la perte d'eau par le système respiratoire : la réalisation d'une hyperpnée d'air saturé à 37°C ne provoque pas de toux alors qu'une hyperpnée d'air sec à la même température provoque une grande réponse tussive (Didier, 2015). Des travaux ultérieurs ont démontré que la sensibilité de la toux par l'inhalation des substances hyperosmolaires, comme le mannitol ou le sérum salé hypertonique, est augmenté chez les sujets asthmatiques (Koskela et al., 2008) comme chez les sujets ayant une toux chronique non asthmatique (Singapuri et al., 2008) par rapport aux sujets normaux. Les mécanismes possibles pouvant expliquer l'apparition de la toux suite à l'exposition au stimulus hyperosmolaire sont la stimulation directe des récepteurs Aδ et celle des fibres C de la toux (Pedersen et al., 1998). Elles ont été démontrées dans une étude sur le cochon d'Inde où après l'inhalation du sérum salé hypertonique (Pedersen et al., 1998) il y a eu une production accrue de mucus par augmentation de la sécrétion des glycoconjugués à partir des glandes acineuses (Dwyer and Farley, 1997). Mais on peut aussi discuter la perte de l'intégrité de la barrière épithéliale avec desquamation de l'épithélium bronchique entraînant une exposition directe des terminaisons nerveuses à la lumière des voies aériennes et la libération des médiateurs inflammatoires (Bonsignore et al., 2003; Chimenti et al., 2010; Pliss et al., 1990).

En dehors du stimulus hyperosmolaire, comme mécanisme potentiel à l'origine d'une toux induite par l'hyperpnée à l'exercice, on peut évoquer l'effet thermique de l'exercice dans l'environnement froid. Alors, le refroidissement des voies aériennes pendant l'exercice est suivi par leur rapide réchauffement après l'arrêt de l'exercice, entraînant une hyperthermie réactive et un œdème de la paroi des voies aériennes pouvant stimuler directement les mécanorécepteurs de la toux (Didier, 2015). Ce mécanisme physiopathologique est soutenu par les résultats de l'étude de Cho (Cho et al., 2003) qui retrouve que l'hyperpnée d'air froid provoque

une augmentation de la toux chez les patients ayant une hyperréactivité tussigène prouvée par le test à la capsaïcine, comparés aux sujets avec une réactivité tussigène normale au même test. Xing et ses collaborateurs (Xing et al., 2008) ont montré que les récepteurs TRPM8 sont stimulés par l'exposition à l'air froid. La température au niveau du larynx peut descendre jusqu'à 25°C stimulant ainsi ces récepteurs qui sont localisés surtout au niveau des voies aériennes supérieures et déclenchant un réflexe de toux. Malheureusement, le mécanisme exact d'apparition de la toux sans bronchoconstriction à l'inhalation d'air froid n'est pas clairement identifié (Turmel et al., 2012).

La respiration à des débits ventilatoires élevés peut déclencher la toux par plusieurs mécanismes : l'altération de l'intégrité de la barrière épithéliale exposant l'épithelium bronchique à des contraintes de cisaillement (Morici et al., 2004) , le rôle mécanique des expirations forcées sur les voies aériennes comme celui de facilitateur du reflux gastro-oesophagien par l'augmentation de la pression intra abdominale et transdiaphragmatique (Lavorini et al., 2011) ainsi que l'augmentation de l'exposition aux facteurs environnementaux (stimulation mécanique ou chimique des récepteurs de la toux, hyperréactivité tussigène) (Didier, 2015).

Etant donné l'augmentation de la ventilation minute au décours de l'exercice, associée à la respiration buccale qui contourne les mécanismes nasaux de filtration des particules de grande taille et des vapeurs solubles, la quantité de polluants inhalés augmente de manière proportionnelle avec une déposition plus profonde des polluants dans le poumon (Didier, 2015). Dans ce contexte, les personnes pratiquant un sport exposent plus leurs voies aériennes aux allergènes (pollens, acariens, épithèlia d'animaux), aux polluants de l'environnement extérieur (ozone, dioxyde de souffre, dioxyde d'azote et monoxyde de carbone) ou de l'environnement intérieur, comme à la piscine (chlore) (Bougault et al., 2009) ou à la patinoire (produits de combustion des machines d'entretien) (Kahan et al., 2007).

D'après les études épidémiologiques, l'exposition aux PM10 (particules de diamètre inférieur à 10 µm) et à l'ozone, est très fortement associée à la toux, contrairement aux oxydes d'azote qui sont plutôt associés à la respiration sifflante (Didier, 2015; Joad et al., 2007) . Dans une étude expérimentale chez le lapin et le cochon d'Inde, l'exposition à l'ozone a augmenté la toux (fréquence et sensibilité) induite par l'acide citrique avec une meilleure réponse chez le cochon d'Inde que chez le lapin (Clay et al., 2016). Selon cette étude, le mécanisme expliquant

l'aggravation de la toux par l'ozone n'implique pas l'inflammation induite par cette exposition, ni l'activation des récepteurs de type TRPA1, mais plutôt une activation des récepteurs TRPV1. Dans la **figure 20** sont représentés les divers stimuli pouvant activer les chémorécepteurs liés aux canaux ioniques certains pouvant être plus impliqués dans l'apparition de la toux à l'exercice, soit par action directe (TRPV1, TRPA1, TRPM8 sensibles à la variation de température, TRPV4 aux stimuli mécaniques-osmotiques), soit par voie indirecte via les modulateurs.

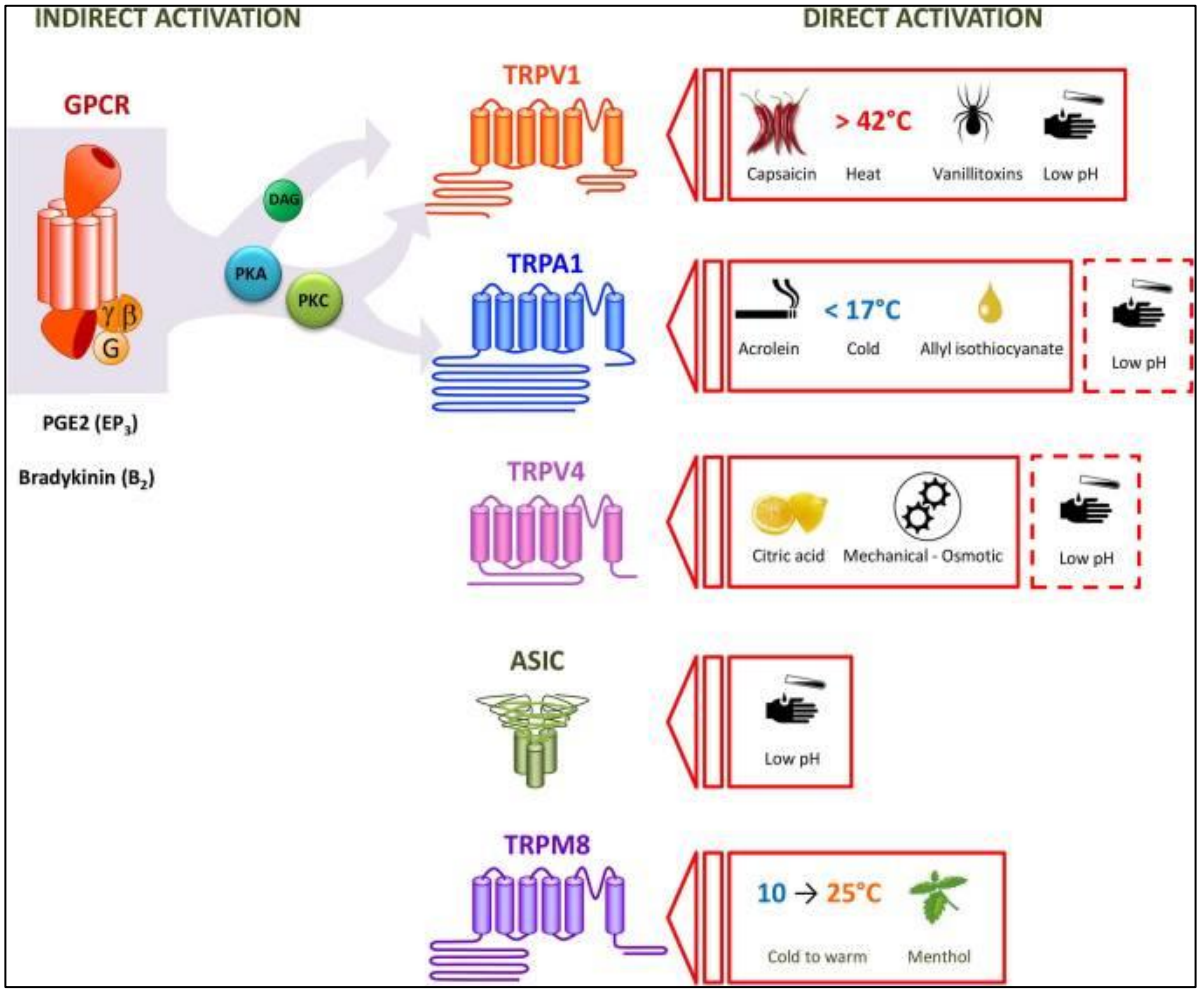


Figure 20 : Représentation des chémorécepteurs liés aux canaux ioniques certains pouvant être impliqués plus dans l'apparition de la toux induite par l'exercice comme le TRPA1, TRPM8 (air froid) et TRPV4 (stimuli mécaniques-osmotiques) (Grace et al., 2013)

De manière similaire, de nombreuses études ont démontré que l'exposition au tabagisme environnemental s'associe à une augmentation de la toux (Joad et al., 2007). Le mécanisme qui semble impliqué dans ce processus est l'activation des récepteurs périphériques ainsi que des neurones situés dans le NTS avec l'influence de la substance P dans la modulation du réflexe, impliquant donc plutôt la neuroplasticité centrale que périphérique (Sekizawa et al., 2008).

L'exposition au chlore et ses dérivés volatils (nitrogène trichloride) et non volatils (acide chlorhydrique), présents dans l'eau ou dans l'air ambiant des piscines, peuvent déclencher une toux en générant des lésions de l'épithélium bronchique par la génération de radicaux libres d'oxygène ou par l'irritation directe comme prouvée par une étude sur les nageurs, avec une prévalence de la toux de 28% lors de l'effort de natation, améliorée par la suite par la sortie de l'environnement (Didier, 2015).

Les interrelations entre l'exercice et la toux impliquent des mécanismes complexes qui ne sont pas complètement élucidés malgré les multiples travaux de recherche sur le sujet. L'impression générale est qu'en cas d'une stimulation tussigène imposée pendant l'exercice, les centres respiratoires privilégient l'adaptation aux besoins métaboliques imposés par l'exercice avec augmentation de la ventilation en diminuant la sensibilité à la stimulation tussigène (Didier, 2015), donc la plasticité du système nerveux central semble très importante dans la modulation de la toux par l'exercice. Si déjà ces mécanismes ne sont pas très bien définis, l'interaction entre l'exposition allergénique-toux-exercice est encore moins connue et nécessite des travaux de recherche complexes qui permettront à l'avenir de mieux comprendre ce domaine de la physiopathologie respiratoire.

C. ETUDE

I. INTRODUCTION

La toux est un réflexe de défense respiratoire visant à protéger les voies aériennes (Widdicombe, 1954a, c). Lorsqu'elle devient chronique (durée supérieure à 8 semaines), elle peut avoir un impact sur la qualité de vie du patient (Chung and Pavord, 2008; Chung and Widdicombe, 2009). La prévalence de la toux est estimée entre 9-33% aux Etats-Unis (Chung and Pavord, 2008). La prévalence de la toux chez les fumeurs est trois fois plus élevée que les non-fumeurs ou les anciens fumeurs. L'exposition à d'autres polluants atmosphériques comme le dioxyde nitrique ou les particules PM10 sont des facteurs qui entraînent une augmentation de la prévalence de la toux dans la population générale (Chung and Pavord, 2008). Avec l'augmentation de la pollution atmosphérique, le tabagisme et la prévalence croissante des maladies respiratoires allergiques on peut s'attendre à une augmentation encore plus importante de la prévalence de la toux chronique à l'avenir.

La toux chronique est un symptôme fréquent chez le patient asthmatique, souvent mis en rapport avec un contrôle insuffisant de la maladie (même si la toux ne fait pas partie des critères standards du contrôle de l'asthme selon les recommandations internationales actuelles). La sensibilité à la capsaïcine est augmentée chez les patients asthmatiques allergiques aux pollens de bouleau en saison pollinique, pouvant suggérer que l'inflammation d'origine allergique peut constituer un trigger de la toux (Weinfeld et al., 2002). La toux peut être stimulée par certains mécanismes impliqués dans le processus inflammatoire. Les récepteurs de la toux dans l'asthme peuvent être activés par la bronchoconstriction via la libération de l'histamine et de leucotriènes. La toux chez l'asthmatique répond en général bien au traitement par le beta-2 agonistes de courte durée d'action (Chung and Pavord, 2008). Les médiateurs inflammatoires comme la bradykinine, tachykinine et les prostaglandines peuvent aussi stimuler les récepteurs de voies aériennes.(Choudry et al., 1989; Fox et al., 1996; Katsumata et al., 1989).

La toux associée à une inflammation des voies aériennes à éosinophiles peut être en général contrôlée par la corticothérapie par voie inhalée, un argument de plus en faveur du rôle potentiel des facteurs inflammatoires dans la toux (Chung and

Pavord, 2008). Les patients asthmatiques n'ont pas forcément une augmentation de la sensibilité à la toux, mais cela peut être le cas pour les formes de toux équivalente d'asthme, toux atopique ou bronchite à éosinophiles (Doherty et al., 2000). Malheureusement, malgré les nombreuses hypothèses possibles et une recherche active, les mécanismes physiopathologiques précis, impliqués dans la modulation de la toux par l'éosinophilie ne sont pas complètement identifiés.

L'autre domaine assez mal connu est la modulation de la toux en fonction des divers stimuli et les interactions possibles au niveau du système nerveux central et périphérique. Ces limites sont probablement à l'origine de l'efficacité très incomplète des traitements antitussifs actuels, en rapport avec une connaissance partielle de la régulation du réflexe de toux (Belvisi and Geppetti, 2004; Mutolo et al., 2016b).

Les données de la littérature sur la modulation de la toux par l'activité physique sont peu nombreuses (Widdicombe et al., 2009) mais il est connu que l'adaptation cardio-respiratoire à l'effort peut influencer le réflexe de toux (« cough reflex » CR)(Turner, 1991). Il existe des arguments en faveur d'un phénomène de "down-regulation" de la toux au décours de l'exercice chez l'homme sain (Coutier et al., 2014; Lavorini et al., 2010) comme chez certains modèles animaux (Poussel et al., 2014; Tatar et al., 1988). Par contre, la toux induite par l'exercice est fréquemment décrite chez les patients ayant un asthme (Boulet and O'Byrne, 2015) ou chez les athlètes ayant une broncho-constriction induite par l'exercice avec inflammation des voies aériennes, en général neutrophilique plutôt qu'éosinophilique, comme dans l'asthme (Anderson and Daviskas, 2000; Anderson and Holzer, 2000), pouvant suggérer le rôle potentiel de l'exercice dans la modulation du réflexe de toux. Malheureusement, les données actuelles de la littérature sont limitées, et parfois contradictoires.

Il semble, en effet, que les mécanismes supposés être impliqués dans la régulation de la toux pendant l'exercice sont en grande partie liés à l'augmentation de la ventilation. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'hyperventilation spontanée isocapnique isolée, a le potentiel d'augmenter le seuil de déclenchement de la toux en face d'agents tussigènes (Didier, 2015). La toux, ainsi que la respiration, sont générées par le même réseau neuronal au niveau du tronc cérébral et mises en œuvre par les mêmes muscles respiratoires (Bolser et al., 2006; Shannon et al., 1996). Dans le cas d'une stimulation tussigène imposée pendant l'exercice, les centres respiratoires sont obligés de donner une certaine priorité pour

le comportement respiratoire et s'adapter aux besoins métaboliques (Bolser et al., 2006). On peut alors supposer que ces derniers, pendant l'exercice, peuvent indiquer au générateur du rythme respiratoire d'augmenter la ventilation tout en diminuant la sensibilité à la stimulation tussigène. En conséquence, la même stimulation qui provoque la toux dans les conditions de repos n'est plus aussi efficace pendant l'exercice. De plus, la libération d'endorphines pendant l'activité physique, pourrait elle aussi avoir un effet suppresseur sur la toux (Didier, 2015).

Les mécanismes de diminution physiologique de la toux pendant l'exercice semblent être altérés dans certaines conditions : la toux déclenchée pendant l'exercice est souvent signalée chez les sujets souffrant d'infections respiratoires ou d'asthme (Coyle et al., 2005; Morice et al., 1992). De même, quelques études réalisées chez les sportifs de haut niveau, ont montré une plus grande prévalence de la toux au cours d'un exercice prolongé ou réalisé dans des conditions environnementales spécifiques, souvent jugées hostiles (Boulet and O'Byrne, 2015; Didier, 2015).

Dans une étude précédente réalisée dans notre laboratoire, nous avons observé ce phénomène de "down-regulation" du réflexe de toux, défini par la diminution de la sensibilité à la toux à la stimulation trachéale mécanique pendant l'exercice, chez un modèle animal de lapin anesthésié (Poussel et al., 2014). L'administration de stimulations trachéales séquentielles au décours des contractions musculaires électriques des pattes postérieures, simulant ainsi l'exercice, a produit chez l'animal une diminution significative de l'incidence du réflexe de toux ($p<0,0001$) avec augmentation du seuil de la toux par rapport au repos ($p<0,02$)(Poussel et al., 2014). Etant donné la présence des similitudes entre la physiologie respiratoire humaine et celle de ce modèle animal (Keir and Page, 2008) nous avons envisagé d'étudier la modulation du réflexe de toux par l'exercice et la stimulation trachéale chez le lapin sensibilisé à l'ovalbumine (OVA) afin de mieux comprendre, par extension, le mécanisme de la toux chez les patients ayant une inflammation des voies aériennes de type allergique. Notre hypothèse était qu'il existe un phénomène de « up-regulation » de la toux induite par l'exercice et la stimulation trachéale ou, au moins, l'absence du « down-regulation » chez les lapins sensibilisés à l'ovalbumine *vs* les lapins contrôles.

II. MATERIEL ET METHODES

Vingt lapins adultes de type Néo-Zélandais ont été préparés pour l'étude, répartis de façon équitable entre un groupe sensibilisé à l'ovalbumine et un groupe contrôle. Tous les lapins ont subi une anesthésie et une trachéotomie, mais l'analyse statistique n'a pu être réalisée que sur dix-huit lapins : 10 lapins sensibilisés à l'ovalbumine (OVA) (poids moyen 3.06 ± 0.32 kg) et 8 lapins contrôles (poids moyen 3.09 ± 0.28 kg). En effet, un lapin contrôle est décédé au décours de l'anesthésie et un autre a été exclu après avoir retrouvé dans le lavage broncho-alvéolaire la présence d'un taux très élevé d'éosinophiles (73%), probablement en rapport avec une maladie à éosinophiles, ne permettant ainsi pas de dire qu'il rentrait dans le groupe contrôle.

1. Considérations éthiques

Toutes les procédures réalisées sur les animaux ont été approuvées par le Comité de l'Université de Lorraine sur l'usage des animaux dans les laboratoires de recherche, en respectant les directives européennes (Council Directive 86-609 EEC), celles du "Ministère de l'Agriculture et de la Pêche" et du "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" (A5418-03409) et sous la surveillance des "Services Vétérinaires Départementaux de Meurthe et Moselle".

2. Protocole de sensibilisation à l'ovalbumine (OVA)

Les lapins du groupe OVA ont reçu des injections intra-péritonéales (i.p.) de 0,1 mg OVA, avec comme adjuvant 10 mg $Al(OH)_3$ en solution dans 1 ml du sérum physiologique 0,9% : le premier jour (J1) et à J14 selon des protocoles validés antérieurement (Ali et al., 1996; Petak et al., 2006). A J26, les lapins sensibilisés ont été exposés à des aérosols d'OVA (2,5 mg/ml ; 50 mg OVA dissolus dans 20 ml du sérum physiologique 0,9%) pendant 3 jours pendant 15-20 min/jour. L'expérimentation aiguë a été réalisée à J28.

Les aérosols ont été administrés dans une boite fermée en Plexiglas® construite par nos soins (**Figure 1**), avec un nébuliseur ultrasonique (SYST'AM®, LS290). Les lapins contrôles ont reçu exactement le même protocole injectable et d'aérosols mais cette fois-ci avec du simple sérum physiologique à 0,9%.

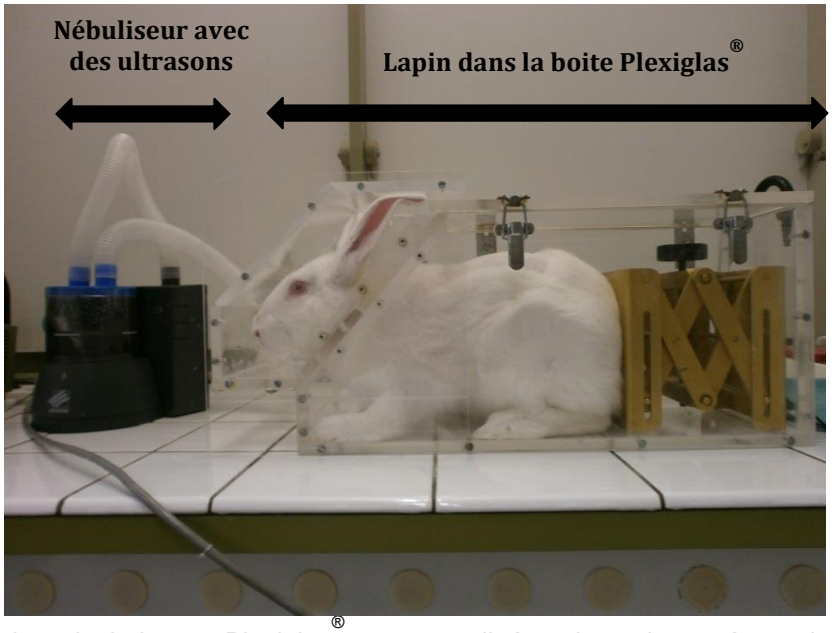


Figure 1 : Lapin dans la boite en Plexiglas®, recevant l'aérosol par le système ultrasonique de nébulisation (SYST'AM®, LS290). La boite a été adaptée avec un système qui garde la tête du lapin immobilisée pour recevoir les aérosols directement vers le nez et la bouche.

3. Evaluation de la présence de la sensibilisation

3.1 Tests cutanés intradermiques

Nous avons testé la présence de la sensibilisation par des tests cutanés intradermiques 7 jours avant l'expérimentation (J 21). Nous avons utilisé 200 µg/mL solution d'OVA et du sérum physiologique NaCl 0,9% (pour les contrôles). Cent microlitres de solution (OVA et NaCl 0,9%) ont été injectés par voie sous-cutanée de manière symétrique dans la peau de la région dorsale de l'animal (préalablement rasée) avec une seringue de 1 mL et une aiguille de 25G. L'intensité de la réaction cutanée (l'induration) a été mesurée à 1 heure par une règle (2 mesures perpendiculaires afin de mesurer la surface en mm^2) selon une méthode déjà validée (Chambers et al., 2000).

3.2 Lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Le LBA a été réalisé à la fin de chaque expérimentation aiguë après la mise à mort de l'animal. Un cathéter de polyéthylène-190 a été positionné via la canule endotrachéale dans la trachée, puis avancé doucement jusqu'au niveau des bronches. Nous avons injecté à 3 reprises 5 ml de solution HEPES (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 MgCl2, 10mM glucose, et 10 mM HEPES ; pH 7.4), suivis chaque fois d'une aspiration douce de la solution (quantité totale de liquide injecté = 15ml). Le LBA a été collecté dans un tube placé dans la glace et filtré avec un tissu en nylon perforé d'orifices de 60 µm pour enlever le mucus. Un échantillon du liquide a été placé en centrifugeuse pendant 10 minutes, à la vitesse de 600 tours par minute et le matériel cytologique obtenu a été coloré au May-Grünwald-Giemsa.

3.3 Analyse en microscopie optique et comptage cellulaire du LBA :

Les images ont été étudiées avec un microscope Olympus, muni d'un objectif x40 et enregistrées par une caméra Olympus CDD en format de 1360 x 1024 pixels. Sur chaque lame, au moins 100 cellules ont été comptées et différenciées en fonction des caractéristiques morphologiques en : macrophages, lymphocytes, neutrophiles, éosinophiles, basophiles et monocytes, après avoir éliminé les cellules épithéliales et les cellules non identifiables. La lecture des lames a été réalisée par deux personnes différentes et en cas de discussion, l'avis d'un professeur d'histologie a été pris pour les cellules qui posaient des problèmes d'identification.

4. Anesthésie et préparation chirurgicale

4.1 Protocole d'anesthésie

L'induction de l'anesthésie a été réalisée par voie intraveineuse (voie veineuse posée au niveau de l'oreille) avec une dose initiale de pentobarbital (0.30 $ml.kg^{-1}$) et par voie intramusculaire par une injection de kétamine (0,1 $ml.kg^{-1}$) après désinfection locale. L'anesthésie a été maintenue par la perfusion continue de pentobarbital au débit de base de 0,6 $ml.h^{-1}$. Après asepsie rigoureuse du site de

ponction, l'injection intra-veineuse a été effectuée à l'aide d'un cathéter placé dans la veine auriculaire marginale. La profondeur de l'anesthésie était vérifiée toutes les 30 minutes en s'assurant de l'absence de réponses au réflexe cornéen et au pincement de l'oreille, témoins d'une anesthésie de profondeur moyenne. En cas d'anesthésie légère, en tout cas insuffisante (i.e, réflexe cornéen, retrait de la patte pincée modification notable du rythme ventilatoire), des doses supplémentaires ont été administrées sous la forme de bolus intraveineux de 0,03 $ml.kg^{-1}$ de pentobarbital associés à des bolus intramusculaires de 0,01 $ml.kg^{-1}$ de kétamine. A la fin de l'expérimentation aiguë, la mise à mort de l'animal a été obtenue par une dose létale de Doléthal (bolus de 5 ml, Vétoquinol SA, Lure, France).

4.2 Préparation chirurgicale

Après le rasage de la fourrure en région cervicale antérieure, l'incision sagittale médiane des tissus cutanés a été suivie par la dissection minutieuse des tissus sous-cutanés et musculaires (afin de respecter les nerfs vagues à proximité immédiate), la trachée a été partiellement sectionnée transversalement sur les ¾ de sa section et chaque lapin a été ensuite trachéotomisé (au niveau de la partie caudale de la trachée) et intubé à l'aide d'une canule de trachéotomie en acier, adaptée à la taille de la trachée (**Figure 2-A, B**).

.

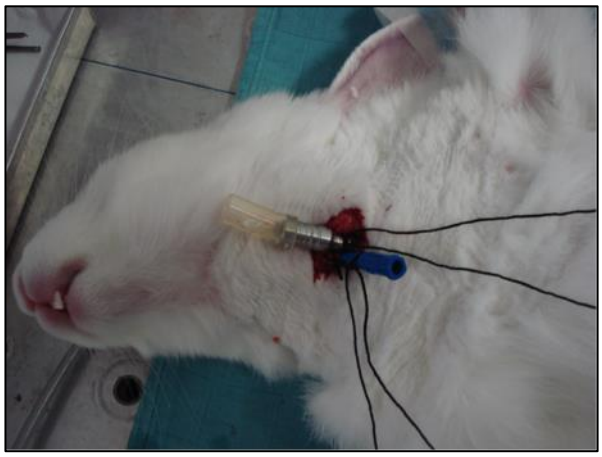
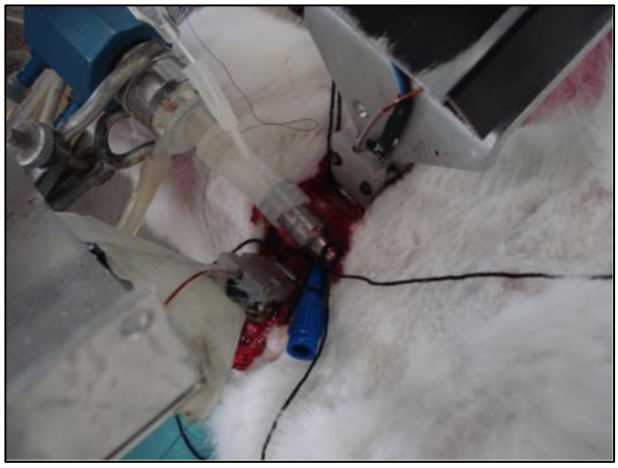


Figure 2-A : Mise en place d'une canule de trachéotomie chez le lapin anesthésié et immobilisé.

Figure 2-B : Système de connexion de la canule de trachéotomie au pneumotachographe pour l'enregistrement des variables fonctionnelles respiratoires et au moteur rotatif pour effectuer la stimulation mécanique trachéale



La partie proximale de la trachée a été ligaturée. Une aspiration trachéo-bronchique était réalisée de manière systématique afin d'évacuer les voies aériennes de la présence éventuelle de sang, lié au temps chirurgical (section trachéale essentiellement) ou à des secrétions. Cette préparation chirurgicale sous anesthésie conduite de cette façon permet une expérimentation en ventilation spontanée pendant toute sa durée.

Comme l'hypothermie peut augmenter la profondeur de l'anesthésie durant la procédure chirurgicale, la température corporelle a été enregistrée en continu avec un thermomètre électronique (Physiotemp Instruments, YSI 402 Clifton, NJ, USA) par voie intrarectale, une fois le lapin immobilisé en position dorsale. La température a de plus été maintenue au-dessus de 38 °C, par l'utilisation de bouillottes chauffantes si besoin.

Des électrodes (3) ont été placées sur l'animal pour enregistrer l'électrocardiogramme, afin de disposer de l'activité cardiaque en continu (signal d'électrocardiogramme provenant d'un cardioscope à 3 dérivations).

5. Acquisition des signaux

L'acquisition des signaux analogiques a été réalisée par un système PowerLab 30 series (ADInstruments, ML880 PowerLab 16/30) avec une fréquence d'acquisition de 200 Hz et une résolution d'échantillonnage de 16 bits. Les données, une fois numérisées, ont été stockées sur un disque dur puis analysées ultérieurement à l'aide du logiciel LabChart7-Pro (ADInstruments, v 7.1).

6. Variables ventilatoires

La préparation chirurgicale a permis l'expérimentation entière en ventilation spontanée. Le débit ventilé a été mesuré au niveau de la canule de trachéotomie par un pneumotachographe de Fleisch # 0 (Metabo, Hepalinges, Switzerland), puis intégré pour obtenir le volume. Le signal du flux aérien a été enregistré à 200 Hz et a été intégré en volume. Le volume courant (V_T) et le flux respiratoire ont été enregistrés en continu au décours de l'expérimentation. La résistance des voies respiratoires (Rrs) a été mesurée par une adaptation à la technique d'oscillations forcées pour évaluer la bronchodilatation induite par l'exercice dans les deux groupes (selon la technique décrite par Schweitzer et al., 2006 et Ioan et al.,2014).

7. Stimulation électrique rythmique entraînant des contractions musculaires (EMC) au niveau de la cuisse

Nous avons utilisé la technique d'électrostimulation musculaire validée par Cross et al. (Cross et al., 1982) pour obtenir des contractions musculaires similaires à celles observées au décours de l'exercice physique. Sur les membres postérieurs des lapins anesthésiés, après épilation soigneuse des faces internes des deux cuisses, des électrodes de surface ont été placées sur la peau (Dura-Stick Premium, REF 42205, DJO, USA) pour effectuer la stimulation. Ces électrodes ont été connectées à un stimulateur électrique (Neuro Trac Rehab, Verity Medical LTD, UK). Les contractions musculaires ont été déclenchées par une stimulation électrique de 2 s avec un intervalle libre de 4 s. L'intensité du courant a varié entre 10 et 30 mA avec des temps de croissance et décroissance de 0.5 s.

Après l'obtention des contractions musculaires rythmiques, la stimulation a été maintenue pendant 3 ou 4 min, période au décours de laquelle l'intensité du courant a été augmentée progressivement de 10 à 30 mA, afin de maintenir un métabolisme suffisamment élevé associé à une hyperpnée adéquate (une augmentation d'au moins 30% de la ventilation minute), similaires au comportement physiologique à l'exercice modéré (Cross et al., 1982; Haouzi and Chenuel, 2005; Poussel et al., 2014).

8. Stimulation trachéale et analyse de la réponse respiratoire

Un cathéter semi-rigide silastic® (0,7 mm, OD Metric) a été introduit dans la canule de trachéotomie et descendu le long de la paroi afin de déclencher une quinte de toux, en général après l'avoir inséré de 3 à 4 cm par rapport à l'extrémité céphalique de la canule, correspondant à une position en regard du tiers inférieur de la trachée (Varechova et al., 2011; Varechova et al., 2010). La preuve de cette position est vérifiée après chaque expérimentation au décours de l'autopsie par des lésions macro et microscopiques de la muqueuse trachéale.

L'extrémité supérieure du cathéter est reliée à un moteur électrique rotatif (low voltage DC motors 719RE280, MFA/Comodrills, UK) avec une vitesse de rotation d'environ 60 tours.min^{-1}. Quand le moteur est mis en fonction, il entraîne une rotation du cathéter dont l'extrémité libre provoque alors une stimulation mécanique trachéale (**Figure 3**).

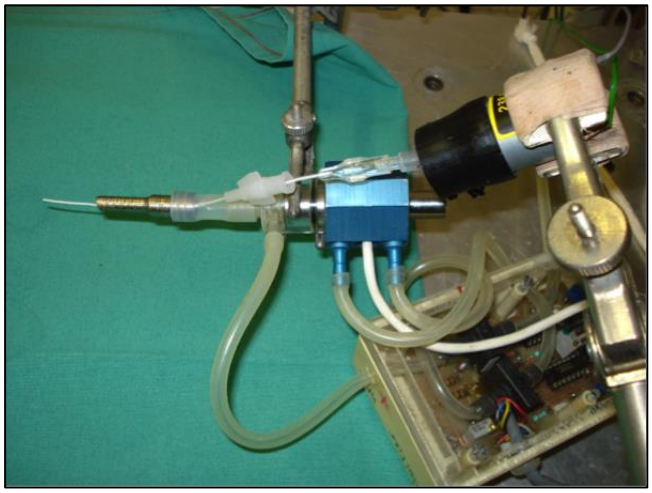


Figure 3 : Cathéter relié à un moteur rotatif permettant la stimulation trachéale mécanique.

Le temps de démarrage (temps de montée) et d'arrêt (temps de descente) sont très courts, presque immédiats, autorisant un signal de stimulation mécanique considéré comme rectangulaire et ainsi de sélectionner précisément la durée de stimulation souhaitée. La durée de stimulation a varié entre 50 ms (correspondant à une seule rotation) et 1000 ms. Les stimulations trachéales ont été réalisées soit entièrement, soit débutées durant le temps inspiratoire (TI) alors que l'animal respire calmement et de façon régulière depuis au moins 1 min. Environ 20 stimulations ont été réalisées sur chaque animal.

Un signal électrique du moteur rotatif a été transmis à l'ordinateur de façon concomitante aux signaux respiratoires, permettant une identification précise du moment du cycle respiratoire durant lequel la stimulation a été réalisée.

Avant la stimulation trachéale, les valeurs de référence (de repos et d'effort) ont été enregistrées en notant la moyenne des données respiratoires (V_T, $\dot{V}_{E\,max}$ = pic de débit expiré) sur 3 cycles respiratoires consécutifs. La réponse à la stimulation trachéale a été évaluée en fonction des modifications du V_T et du $\dot{V}_{E_{max}}$ par rapport aux valeurs de référence. Pour chacun des paramètres l'écart-type (ET) a également été calculé, permettant de renseigner la variabilité des ces paramètres au cours de la ventilation spontanée. Ainsi, une réponse défensive significative à la stimulation trachéale mécanique a été définie par une réponse dont les paramètres ventilatoires considérés sont en dehors du 99ème percentile, c'est à dire supérieure à la moyenne + 3 fois ET. Ce cycle de référence est calculé en conditions basales avant chaque stimulation trachéale afin de permettre la comparaison entre les paramètres ventilatoires faisant immédiatement suite à la stimulation trachéale et ceux calculés avant celle-ci.

Trois types de réponses à une stimulation ont pu être observés. Le réflexe de toux (RT) a été défini par une augmentation significative du volume courant (V_T) et du pic de débit expiré ($\dot{V}_{E_{max}}$). Le réflexe expiratoire (RE) a été défini par une augmentation isolée du pic de débit expiré ($\dot{V}_{E_{max}}$), non précédée d'une augmentation du volume courant (V_T). L'absence de réponse (AR) à une stimulation trachéale mécanique a été caractérisée par l'absence de modification du volume courant (V_T) et du pic de débit expiré ($\dot{V}_{E_{max}}$) par rapport au cycle de référence précédent (**Figure 4**). Le stimulus le plus faible déclenchant un réflexe de toux a été nommé "Cough threshold" (CT) (seuil de toux).

➢ RT :	$\mathbf{V_T > V_{T_{référence}} + 3\ ET}$ $\mathbf{\dot{V}_{E_{max}} > \dot{V}_{E_{max\ référence}} + 3\ ET}$
➢ RE :	$\mathbf{V_T < V_{T_{référence}} + 3\ ET}$ $\mathbf{\dot{V}_{E_{max}} > \dot{V}_{E_{max\ référence}} + 3\ ET}$
➢ AR :	$\mathbf{V_{T_{référence}} - 3\ ET < V_T < V_{T_{référence}} + 3\ ET}$ $\mathbf{\dot{V}_{E_{max\ référence}} - 3\ ET < \dot{V}_{E_{max}} < \dot{V}_{E_{max\ référence}} + 3\ ET}$

Figure 4 : Définition de la réponse ventilatoire à la stimulation

9. Electromyographie des muscles abdominaux

Une électromyographie des muscles abdominaux a été réalisée avec des électrodes bipolaires (A-M Systems, INC, Carlsborg, WA 98,324) insérées au niveau soit des muscles transverses de l'abdomen, soit des muscles obliques externes afin de confirmer objectivement un mouvement respiratoire associé à la réponse à la stimulation trachéale.

10. Protocole

Les variables respiratoires ont été enregistrées à l'état de base au repos, puis au décours des contractions musculaires induites par l'électrostimulation musculaire (similaires à celles réalisées pendant un exercice physique modéré). Sur chaque lapin on a réalisé 2 à 3 séquences de stimulations musculaires séparées par au moins 10 minutes de repos, sans aucune stimulation (stimulations trachéales inclues). Les stimulations trachéales ont été réalisées après au moins 1 minute de respiration de repos, avec des durées variables (50 ms, 150 ms, 300 ms, 600 ms, 1000 ms). Toutes les stimulations ont été délivrées pendant l'inspiration (vers la moitié du temps inspiratoire pour les stimulations de 50 ms à 300 ms ou au début de l'inspiration pour les stimulations de 600 ms et 1000 ms). Pendant l'électrostimulation musculaire entraînant des contractions au niveau de pattes inférieures, 3 à 4 stimulations trachéales ont été réalisées avec des durées variables (entre 50 ms et 1000 ms), à intervalle de 1 min, en surveillant en continu les signes cliniques, les variables respiratoires et l'électromyogramme. La lecture et l'interprétation d'évènements respiratoires induites par la stimulation mécanique trachéale ont été réalisées pour chaque lapin au repos et à l'exercice par deux personnes différentes, puis une concertation a eu lieu pour procéder à la vérification des données enregistrées et à la révision des éventuelles discordances.

11. Analyse des données

L'analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel JMP 9.0.0 (2010 SAS Institute Inc) permettant les comparaisons des données qualitatives et quantitatives. Les paramètres respiratoires (V_T, $\dot{V}_E$, Rrs, temps inspiratoire TI, temps

expiratoire TE) étaient enregistrés en continu pendant l'expérimentation, au repos et pendant l'exercice afin de comparer les groupes.

L'incidence et l'analyse des réponses à la stimulation trachéale mécanique dans les deux conditions (repos et exercice) ont été comparées par le test Khi 2 (χ^2) ou test de Fisher, étant donné les faibles échantillons. Une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour la comparaison des variables et paramètres respiratoires (V_T, $\dot{V}_E$, Rrs). La comparaison des valeurs de CT de repos *vs* exercice a été réalisée avec le test non paramétrique de Wilcoxon. Le seuil de significativité retenu est $p < 0,05$. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ET.

III. RESULTATS

Un total de 494 stimulations trachéales a été réalisé (271 en repos ; 223 à l'exercice) et elles ont été analysées chez 18 lapins (10 sensibilisés à l'OVA et 8 contrôles).

1. Tests cutanés à l'OVA et étude cytologique du LBA

La réaction cutanée (induration) à l'injection intradermique d'OVA a été fortement positive pour les lapins sensibilisés à l'OVA, avec une surface moyenne de 630 mm^2 ± 297 mm^2 (à la lecture 1h après l'injection) *vs* les lapins contrôles (p<0,001). Les lapins sensibilisés à l'OVA ont eu une cytologie plus abondante (p=0,044) et un pourcentage d'éosinophiles significativement plus élevé (p = 0.008) dans le LBA, par rapport aux lapins contrôles (**Tableau 1**).

Tableau 1. Paramètres descriptifs (moyenne ± écart-type) des tests cutanés et de la cytologie du LBA pour les 2 groupes des lapins

Paramètres	**Surface ± DS (mm^2)**	**Nombre total de cellules dans LBA (ET)**	**Taux d'éosinophiles dans LBA (ET) (%)**
OVA (n=10)	630 (297)	161 (57)	26.3 (16) – 16
Contrôles (n=8)	0 (0)	108 (43)	2.5 (2.5) – 2.3

LBA : Lavage Bronchioloalveolaire

OVA : Lapins sensibilisés à l'Ovalbumine

La comparaison du profil cellulaire du LBA entre les deux groupes a été représenté dans la **Figure 5**, montrant des différences significatives pour le taux d'éosinophiles, plus élevé chez les lapins sensibilisés, 26,3% *vs* 2,5% (p=0,0008) et une baisse compensatrice significative (p=0,0012) des macrophages : 66,3% pour les lapins OVA *vs* 91,3% pour les lapins contrôles. Pour les autres lignées cellulaires il n'y a pas eu des différences notables entre le groupe OVA et le groupe contrôle

(basophiles 0,3% *vs* 0%, p=0,387 ; neutrophiles 1,2% *vs* 3,5%, p=0,275 ; lymphocytes 5,9% *vs* 2,7%, p=0,1).

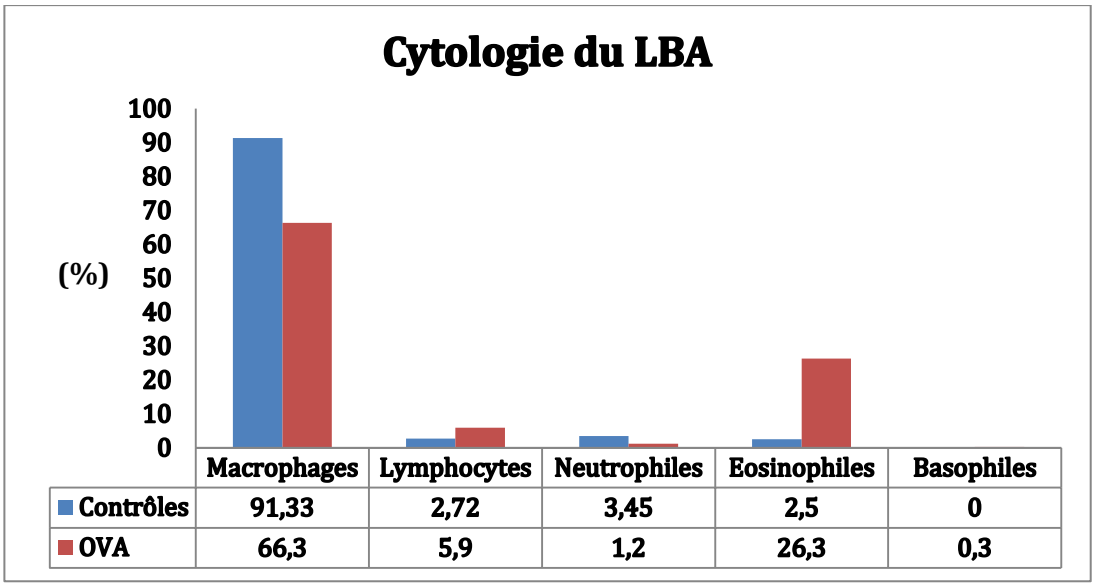


Figure 5. Représentation de la cytologie du LBA pour les deux groupes (en pourcentages)

Les **figures 6 et 7** représentent des images de cytologie du LBA en coloration May-Grünwald-Giemsa, étudiées avec le Microscope Olympus et un objectif de 40 pour un lapin contrôle et un lapin sensibilisé à l'OVA. Dans la figure 6, sur la lame réalisée pour le LBA d'un lapin contrôle, on peut identifier des cellules épithéliales bronchiques ciliées (avec des cils au pôle apical, mesurant 5-7 µm de long et 0,25 µm de diamètre) et des macrophages alvéolaires (les plus abondants, grands, avec une forme irrégulière et la présence de nombreuses invaginations, un noyau excentré et un cytoplasme abondant contenant parfois des vacuoles et vésicules de pinocytose).

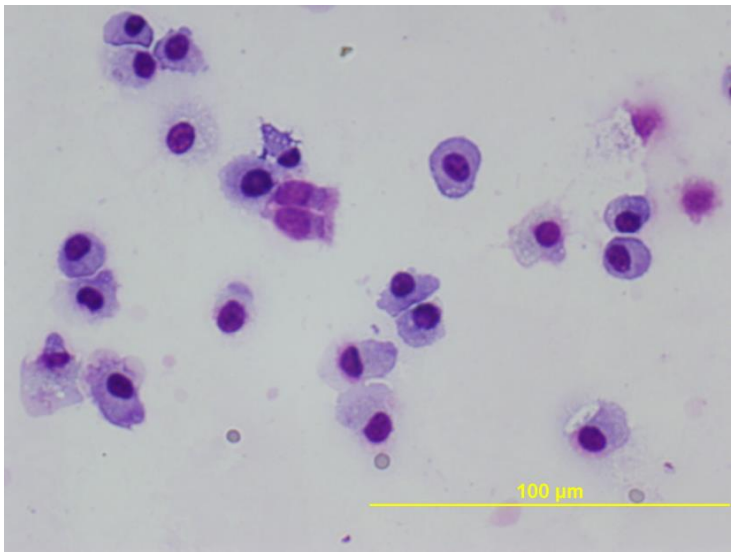


Figure 6 : Cytologie du LBA pour un lapin contrôle en coloration May-Grünwald-Giemsa (Microscope Olympus, objectif 40)

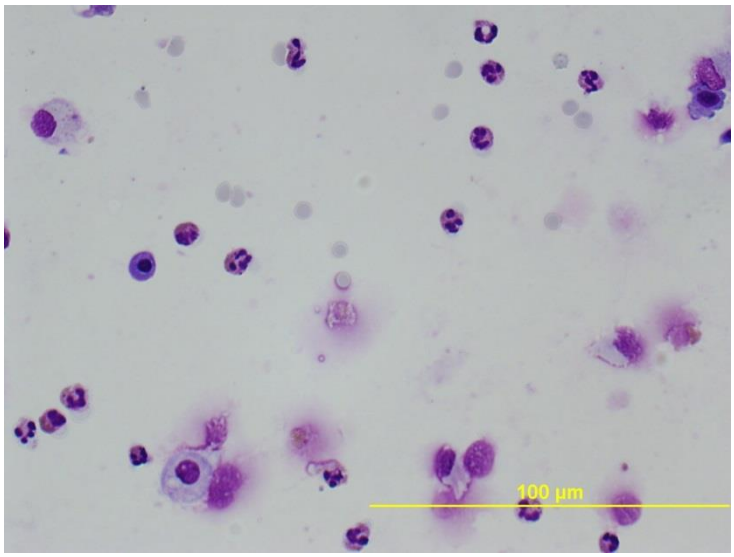


Figure 7 : Cytologie du LBA pour un lapin sensibilisé à l'OVA en coloration May-Grünwald-Giemsa (Microscope Olympus, objectif 40)

Dans la **figure 7**, représentant l'image d'une lame du LBA chez un lapin sensibilisé à l'OVA, en dehors des macrophages et des cellules épithéliales, on retrouve des nombreux éosinophiles faciles à reconnaître parmi les autres cellules par leur petite taille (12-14 µ), la coloration rouge du cytoplasme (les inclusions cytoplasmiques fixant l'éosine) et avec le noyau polylobé (en général, bilobé). Le nombre important d'éosinophiles dans la cytologie du LBA du lapin sensibilisé à l'OVA prouve bien la présence de la réaction inflammatoire allergique, induite par les injections d'OVA.

2. Analyse des variables fonctionnelles respiratoires

La ventilation minute ($\dot{V}_E$) a augmenté à l'exercice, de manière significative pour les deux groupes, par rapport au repos, de 36% pour les lapins sensibilisés à l'OVA et de 35% pour les lapins contrôles (**Table 2**).

Table 2. Evolution de la ventilation minute et de la résistance des voies aériennes au repos et à l'exercice pour le groupe OVA et le groupe contrôle

	Repos	**Exercice *(2&3min)***	***p***
	Rrs (hPa s L^{-1})		
OVA (n=10)	16.8 ± 1.9	14.9 ± 2.1	0.0003
Contrôles (n=8)	17.9 ± 1.4	15.5 ± 1.3	< 0.0001
	$\dot{V}_E$ (mL min^{-1})		
OVA (n=10)	984 ± 232	1338 ± 229	< 0.0001
Contrôles (n=8)	794 ± 122	1075 ± 216	0.0008

OVA : Lapins sensibilisés à l'Ovalbumine
$\dot{V}_E$: ventilation minute
Rrs : résistance des voies aériennes par oscillations forcées

En même temps, la résistance des voies aériennes a diminué de manière significative pour les deux groupes à l'exercice, de 11% dans le groupe OVA et de 13% dans le groupe contrôle (**Table 2, Figure 8**).

Il n'y a pas eu de différences significatives entre les deux groupes par rapport à l'évolution des variables respiratoires au repos et à l'effort avec augmentation similaire de la ventilation minute $\dot{V}_E$ (36% *vs* 35% ; p = NS) et diminution de la résistance des voies aériennes Rrs (11% *vs* 13%; p = NS).

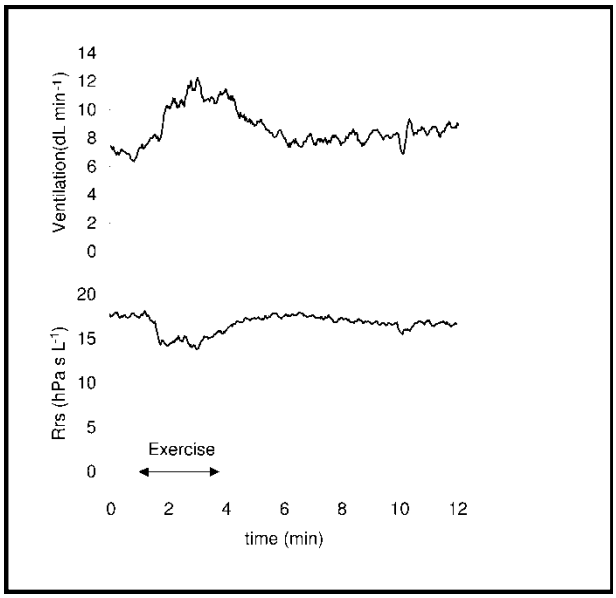


Figure 8. Evolution des variables respiratoires chez un lapin sensibilisé à l'OVA, au repos puis à l'effort. Au décours de l'exercice induit par la stimulation musculaire électrique, la ventilation minute a augmenté et la résistance des voies respiratoires a diminué, témoignant ainsi d'une bronchodilation.

3. Réponses ventilatoires à la stimulation trachéale

Suite à la stimulation trachéale mécanique, 3 types de réponses ont été retrouvées :

- Le réflexe de toux (RT)
- Le réflexe expiratoire (RE)
- Absence de réponse (AR)

Le réflexe de toux (RT) est défini par une augmentation significative du volume courant (V_T) et du pic de débit expiré ($\dot{V}_{Emax}$) (un exemple est donné en **Figure 9**). Le réflexe expiratoire (RE) est caractérisé par une augmentation isolée du pic de débit expiré ($\dot{V}_{Emax}$), non précédée d'une augmentation du volume courant (V_T) (exemple en Figure 10). L'absence de réponse (AR) à une stimulation trachéale mécanique est caractérisée par l'absence de modification du volume courant (V_T) et du pic de débit expiré ($\dot{V}_{Emax}$).

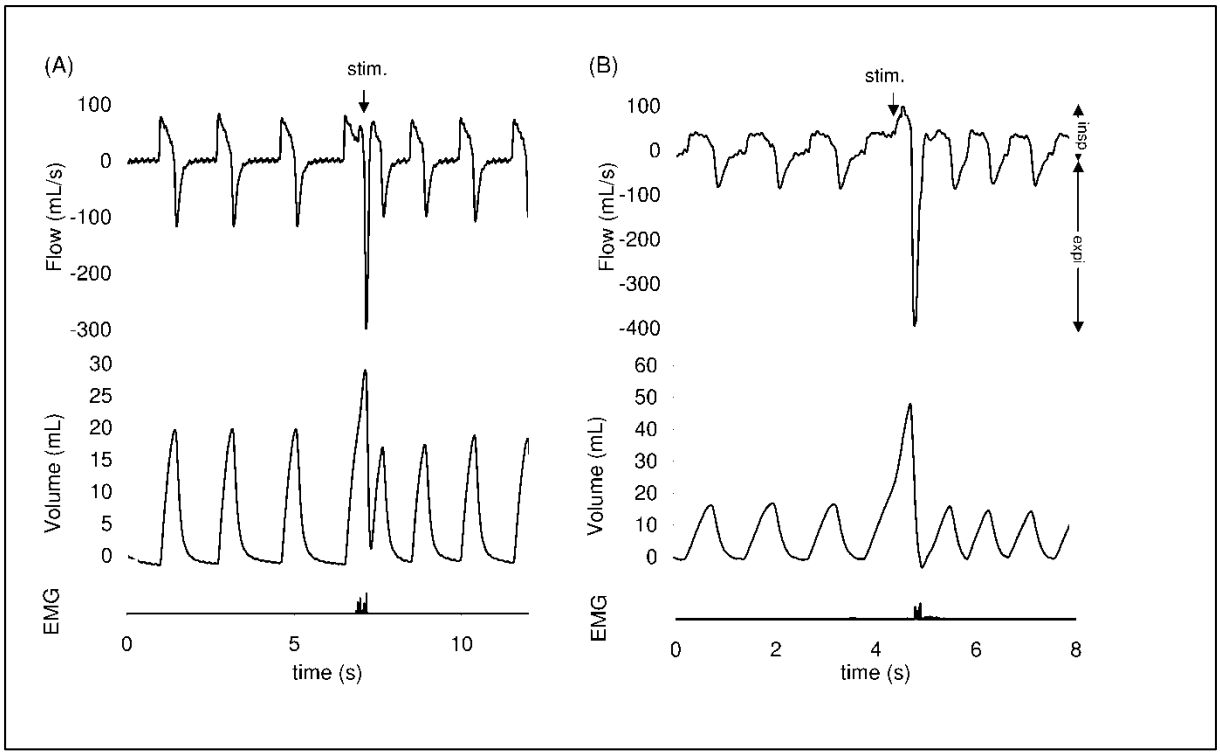


Figure 9, A-B. La représentation graphique du réflexe de toux (RT) en repos (A) et à l'exercice (B) caractérisé par l'augmentation du VT et du $\dot{V}$ E. L'électromyogramme des muscles abdominaux (EMG) enregistre aussi l'activité de stimulation respiratoire. Les flèches indiquent la stimulation trachéale. La partie positive de la courbe représente l'inspiration et la partie négative l'expiration.

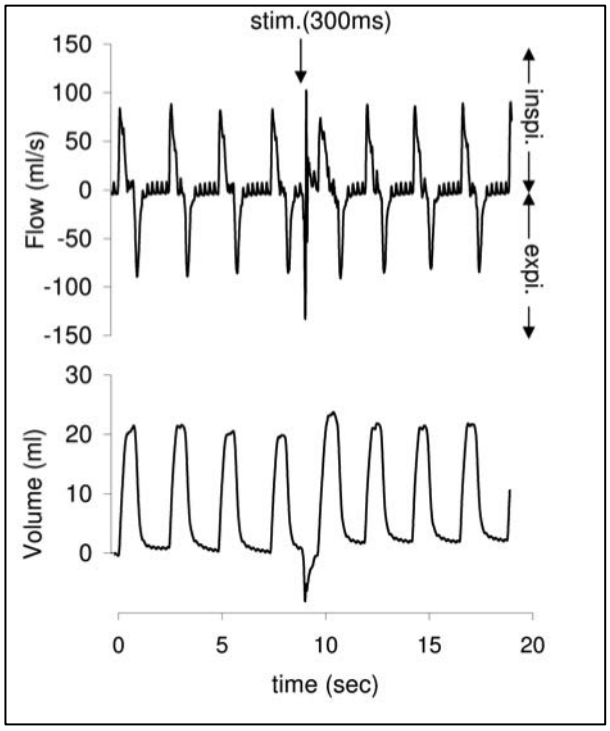


Figure 10 : Réflexe expiratoire (RE) caractérisé par une augmentation significative du pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) non précédée d'une augmentation du volume courant (VT). La flèche indique le début de la stimulation trachéale.

La répartition des stimulations était similaire dans les deux groupes au repos et à l'effort, comme représenté dans le **tableau 3**.

Tableau 3. Répartition des stimulations réalisées au repos et à l'exercice pour le groupe OVA et le groupe contrôle (exprimée en valeurs absolue et relative (pourcentage))

	OVA (n=10)	**Contrôles (n=8)**
Nombre total de stimulation	**261 (53%)**	**233 (47%)**
Stimulations en repos	**141/261 (54%)**	**130/233 (56%)**
Stimulations à l'exercice	**120/261 (46%)**	**103/233 (44%)**

OVA : lapins sensibilisés à l'Ovalbumine

L'incidence des événements respiratoires au repos après stimulation trachéale a été comparable (p=NS) pour les deux groupes (**Figure 11**) avec une incidence supérieure à 60% pour le réflexe de toux (RT), inférieure à 10% pour le réflexe respiratoire (RE) et entre 20 et 30% pour l'absence de réponse (AR).

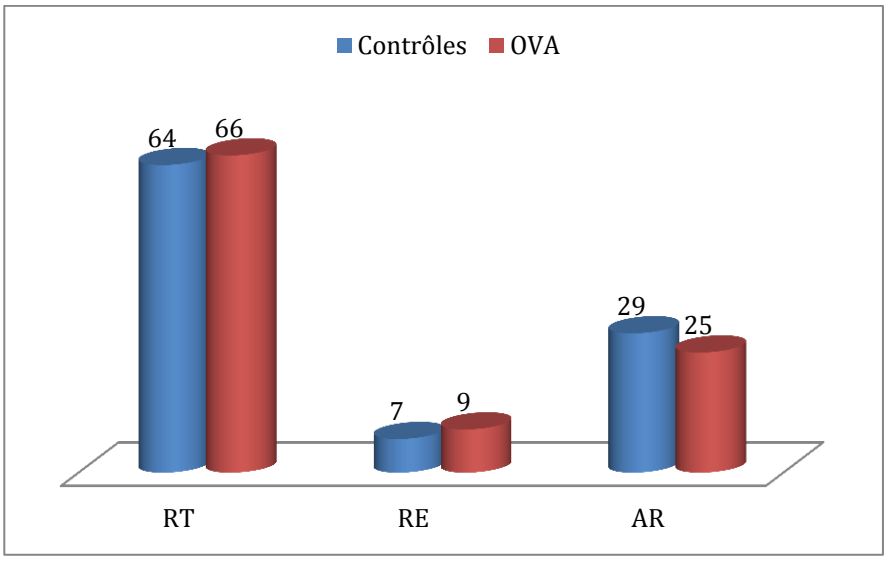


Figure 11. Incidence des événements respiratoires en repos après stimulation trachéale (%)

A l'exercice, on note une diminution de l'incidence du réflexe de toux (valeurs entre 45 et 60%), une augmentation de l'incidence du réflexe expiratoire (entre 10 et 17%) et une augmentation de l'incidence de l'absence de réponse (entre 30 et 36%) sans différences significatives entre les groupes (p=NS) (**Figure 12**).

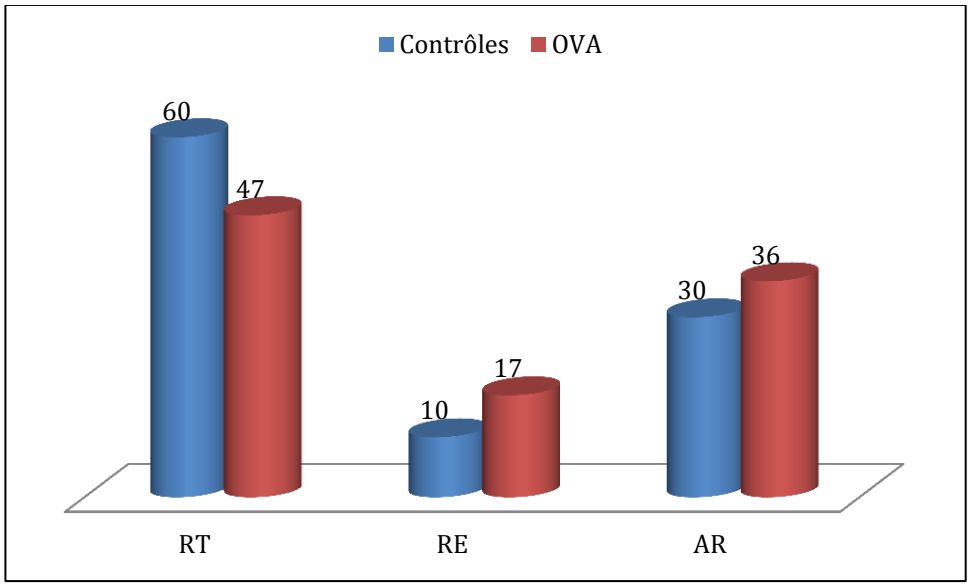


Figure 12. Incidence des événements respiratoires à l'exercice après stimulation trachéale (%)

Pendant l'exercice, dans le groupe OVA, le seuil de toux (CT) est resté inchangé pour 5 lapins, a diminué pour 4 lapins et a augmenté chez un lapin. Donc pour l'ensemble de lapins il n'y a pas eu des modifications de la sensibilité au réflexe de toux, à l'effort par rapport au repos (pas de différence significative p = NS).

Pour le groupe contrôle, le seuil de toux pendant l'exercice a augmenté pour 4 lapins et est resté inchangé pour 4 lapins, avec une différence significative entre le repos et l'exercice (p = 0.0313), évoquant une diminution nette de la sensibilité du réflexe de toux à l'exercice *vs* repos. Ces données sont représentées dans le **tableau 4**.

Table 4. La représentation du **«** Cough threshold « (CT) au repos et à l'exercice chez les lapins sensibilisés et contrôles (ms ± DS).

	OVA (n =10)	**Contrôles (n=8)**	**p**
CT au repos (ms ± DS)	230 ± 294	62 ± 35	NS (0.1304)
CT à l'exercice (ms ± DS)	190 ± 184	125 ± 46	NS (0.3463)

CT: Cough threshold (seuil de toux)

IV. DISCUSSION

A notre connaissance, ce travail est le premier à étudier le réflexe de toux après stimulation trachéale mécanique pendant l'exercice, chez des lapins sensibilisés à l'OVA. Le résultat le plus intéressant obtenu dans notre étude est que l'inflammation allergique des voies aériennes a empêché l'apparition de l'effet physiologique de « down regulation » de la toux à l'exercice, comme précédemment démontré dans une étude antérieure de notre laboratoire (Poussel et al., 2014).

La toux est un symptôme clinique commun et fréquent en pathologie humaine, pouvant être en rapport avec des pathologies respiratoires et extra respiratoires. Malgré les nombreux travaux de recherche réalisés dans le domaine au cours des vingt dernières années, la toux reste un problème difficile pour les cliniciens, devant des mécanismes physiopathologiques incomplètement élucidés. La clarification des mécanismes physiologiques et physiopathologiques de la toux et le développement de nouvelles thérapies antitussives sont les deux principaux buts de l'utilisation d'un modèle animal dans le domaine de la recherche sur la toux. La plupart des connaissances actuelles sur les récepteurs, les fibres afférentes, l'intégration des messages au niveau du tronc cérébral, des voies efférentes et des effecteurs sont obtenues à partir des modèles animaux. De nombreuses espèces ont été utilisées pour explorer la genèse d'une toux (Duz et al., 2010; Jackson, 1988; Kamaruzaman et al., 2013; Liu et al., 2001; Schelegle et al., 2001b) mais les modèles animaux qui paraissent les plus intéressants sont le cochon d'Inde, le lapin et le chat. Leur utilisation est très vaste et les expériences peuvent être conduites en état vigile ou anesthésié, en réalisant diverses stimulations et en mesurant les signaux qui dépassent les limites de la recherche clinique (Didier, 2015). Pour déclencher la toux sur modèle animal, ont été utilisés, divers stimuli : électriques, mécaniques (chez l'animal anesthésié) ou chimiques, comme les modifications de la composition ionique ou osmotique du liquide de surface de la muqueuse. Dans beaucoup de ces modèles, la toux était souvent provoquée par l'exposition à des produits irritants comme l'acide citrique et la capsaïcine (Clay et al., 2016). D'autres études sont réalisées en stimulant le système nerveux central, mais la modulation de la toux au niveau de celui-ci semble plus complexe chez l'homme que chez l'animal. Cela en partie par la présence d'un contrôle volontaire mais aussi par l'existence du

syndrome d'hypersensibilité à la toux (CHS) (Chung and Pavord, 2008; Morice et al., 2007). Pour cette raison, les études d'imagerie fonctionnelle sont très intéressantes chez l'homme et ont permis déjà l'identification de plusieurs régions cérébrales intervenant dans le contrôle et la modulation de la toux (Chung and Pavord, 2008; Mazzone et al., 2011a; Mazzone et al., 2011b; Mazzone et al., 2005).

- **Modèle animal de lapin anesthésié sensibilisé à l'Ovalbumine**

Chez le lapin, les réponses inflammatoires allergiques des voies aériennes, pouvant rentrer dans le cadre de la maladie asthmatique, sont comparables à celles rencontrées chez l'être humain. Les lapins immunisés dans la période néonatale présentent un comportement similaire à ce que l'on observe dans l'asthme chez l'homme, en ce qui concerne : l'hyperréactivité bronchique consécutive à l'exposition aux allergènes aéroportés (Bloom et al., 1988; Herd et al., 1994; Herd et al., 1995), la présence de la réaction biphasique d'obstruction bronchique (immédiate et tardive) suite à l'exposition allergénique (Shampain et al., 1982), le profil cytologique inflammatoire au niveau des voies aériennes avec le recrutement d'éosinophiles et de lymphocytes (Herd et al., 1994; Marsh et al., 1985), comme la production d'immunoglobulines E en réponse à l'exposition allergénique (Ig E) (Minshall et al., 1993; Shampain et al., 1982).

Le premier modèle de lapin sensibilisé par voie injectable intrapéritonéale décrit par Pinckard (Pinkard, 1977) a été modifié par la suite et de nombreux allergènes ont été utilisés, ovalbumine inclue (OVA) (Keir and Page, 2008). Le modèle d'inflammation des voies aériennes induite par l'OVA est caractérisé par des taux élevés d'Ig E spécifiques pour l'OVA, des éosinophiles et des lymphocytes T au niveau de la muqueuse bronchique et l'apparition d'une hyperréactivité bronchique (HRB) comme chez l'homme (Kamaruzaman et al., 2013).

Le modèle animal de lapin est particulièrement intéressant pour les études fonctionnelles respiratoires car avec un protocole d'anesthésie approprié, il est possible de conserver une respiration spontanée pendant toute l'expérimentation aiguë, ce qui est préférable à la ventilation mécanique, nécessaire pour beaucoup d'autres modèles animaux de plus petite taille. Par ailleurs, l'utilisation de tubes endotrachéaux et de ballons endo-œsophagiens sont possibles chez le lapin pour des mesures spécifiques. Par conséquent, le même animal peut être son propre

contrôle, ce qui n'est pas souvent le cas pour les animaux de petite taille comme la souris, le cochon d'Inde ou le cobaye, chez lesquels une chirurgie est souvent nécessaire pour la mesure des paramètres fonctionnels respiratoires (Keir and Page, 2008).

La réponse bronchique des lapins sensibilisés à l'exposition à des stimuli non spécifiques comme l'histamine, l'adénosine 5'-monophosphate, comme à l'exposition à des stimuli spécifiques de type allergène, est comparable à celle des patients asthmatiques (Coyle et al., 1989; Kamaruzaman et al., 2013; Keir and Page, 2008).

Les traitements antiasthmatiques (béta-2-agonistes, corticoïdes, inhibiteurs des récepteurs aux leucotriènes et théophylline) ont une efficacité similaire chez le modèle de lapin sensibilisé et chez l'homme (Keir and Page, 2008). Etant donné les nombreuses similitudes concernant la physiopathologie respiratoire entre le modèle de lapin sensibilisé et l'être humain, nous l'avons choisi pour nos travaux.

Le réflexe de toux a été plus souvent étudié chez le cochon d'Inde que chez le lapin (Brozmanova et al., 2006; Liu et al., 2001). L'inflammation à éosinophiles des voies aériennes induite par l'exposition allergénique est associée pour les deux modèles animaux à une augmentation de la toux, en réponse à l'inhalation d'acide citrique et de capsaïcine (Brozmanova et al., 2006; Clay et al., 2016; Liu et al., 2001). Par contre, la réponse au traitement préventif de la toux (bronchodilatateurs par exemple), pour les deux espèces, n'est pas semblable, évoquant des mécanismes différents pour la toux (Clay et al., 2016; Spina et al., 1998).

De plus, des études fonctionnelles sur les voies respiratoires ont retrouvé que le lapin est moins répondeur à la capsaïcine que l'être humain (Fuller et al., 1985; Karlsson and Fuller, 1999; Karlsson and Persson, 1989; Spina et al., 1998) et que l'absence d'une sensibilité fonctionnelle à la capsaïcine n'est pas associée à une diminution du neuropeptide sensoriel, comme décrit chez le rat et le cochon d'Inde (Keir and Page, 2008). Ces observations suggèrent que le mécanisme d'action de la capsaïcine chez le lapin n'est pas en rapport avec la déplétion du neuropeptide sensoriel et cette découverte est intéressante car le lapin a une répartition similaire à l'homme des nerfs sensitifs dans le poumon (Cho et al., 2002; Spina et al., 1998).

- **Rôle de l'anesthésie**

Il est connu que l'anesthésie générale influence considérablement la réponse aux agents tussigènes. Par exemple, l'administration d'agents tussigènes comme la capsaïcine ou la bradykinine (stimulant les fibres C) ne parvient pas à provoquer la toux chez l'animal anesthésié, même si le réflexe de toux provoqué par le stimulus mécanique et l'inhalation de l'acide citrique est entièrement préservé (Morice et al., 2007). Afin d'éviter les problèmes d'interprétation des résultats par rapport à l'anesthésie, nous avons réalisé les expérimentations aussi sur un groupe de lapins contrôles plutôt que de faire une comparaison par rapport à la littérature.

- **Exercice et bronchoconstriction induite par l'exercice**

Il est classique que l'exercice soit un facteur déclenchant des manifestations respiratoires, facile à quantifier et reproductible. Il représente donc un bon moyen d'étudier le comportement d'un système biologique face à un stress (Hoffman-Goetz and Pedersen, 1994). Les mécanismes sont complexes impliquant une modification de l'activité endocrine, du système cardio-respiratoire, du système nerveux et du système immunitaire (mécanismes psycho-neuro-immuno-endocrinnes) (Verratti, 2009).

La bronchoconstriction induite par l'exercice est décrite couramment mais les mécanismes exacts impliqués dans sa pathogenèse ne sont pas complètement élucidés (Kodesh et al., 2011a). Le mécanisme de l'asthme/bronchoconstriction induite par l'exercice est décrit classiquement par les modifications osmolaires (la sècheresse des voies aériennes) et vasculaires (théorie thermale) au niveau des voies aériennes, en plus de la stimulation du système nerveux parasympathique par l'exposition directe au froid (Del Giacco et al., 2015). Les deux hypothèses sont basées sur le fait qu'au décours de l'activité physique il existe une augmentation franche de la ventilation avec des pertes d'eau et de la chaleur par voie respiratoire (dessiccation de la muqueuse bronchique). La perte d'eau augmente l'osmolarité du liquide extracellulaire dans la muqueuse bronchique, ayant comme conséquence l'extravasion extracellulaire de l'eau via les canaux d'eau (aquaporines), le rétrécissement des cellules bronchiques avec l'augmentation intracellulaire de la concentration des ions (Anderson and Daviskas, 2000) et la libération de médiateurs inflammatoires par les mastocytes, les éosinophiles, les neutrophiles et les autres

cellules avec les eicosanoïdes nouvellement formés (Hallstrand and Henderson, 2009; Hallstrand et al., 2005).

L'épithélium joue le rôle clé de régulateur dans la balance des eicosanoïdes dans les voies aériennes avec l'augmentation de la production des eicosanoïdes bronchoconstricteurs et l'altération de la production de prostaglandines E2 qui joue un rôle protecteur (Hallstrand, 2012).

- **Toux induite par l'exercice**

La toux induite par l'exercice est fréquemment décrite chez les asthmatiques (Boulet and O'Byrne, 2015) et chaque fois que les athlètes développent une inflammation des voies aériennes avec une pratique sportive intensive dans des conditions hostiles (Kennedy MD, 2015). On peut donc supposer que l'exercice a un rôle potentiel de trigger de la toux. En général, il est nécessaire de pratiquer l'effort physique à une intensité élevée pendant au moins 5-8 minutes pour développer une bronchoconstriction. Classiquement, celle-ci survient 2 à 10 minutes après l'exercice, en dehors de la période d'intensité maximale (Del Giacco et al., 2015). Les résultats de notre étude réalisée sur un modèle animal expérimental validé d'asthme allergique (Franova et al., 2013) ne retrouvent pas de changement de la sensibilité à la toux (CT similaire), pendant l'exercice par rapport au repos, chez les lapins sensibilisés à l'OVA, contrairement aux lapins contrôles. Ces derniers présentent un phénomène de « down regulation » de la toux à l'effort par rapport au repos. Notre travail actuel vient ainsi confirmer les résultats d'une étude réalisée précédemment dans notre laboratoire, avec un effet de « down regulation » de la toux à l'effort par rapport au repos, chez les lapins anesthésiés (augmentation du seuil de la toux) (Poussel et al., 2014).

Dans l'étude de Lavorini, réalisée chez des sujets sains, la pratique de l'exercice et l'hyperpnée volontaire a entraîné une augmentation du seuil de la toux (CT) à l'administration des aérosols d'eau distillée par rapport au repos (Lavorini et al., 2010). Sur ces données, on peut conclure à la présence d'un effet de « down regulation » de la toux dans les conditions d'augmentation de la ventilation.

- **Bronchodilatation « physiologique » à l'exercice**

La modulation de la toux par l'exercice est en rapport avec la contraction/relaxation des muscles des voies aériennes, conséquence des nombreuses réponses adaptatives générées par l'activité physique. En effet, l'exercice est associé à une augmentation de l'activité sympathique avec un taux élevé de catécholamines plasmatiques, en même temps que la libération des neuromédiateurs nonépinéphrinergiques -noncholinergiques, entraînant une bronchodilatation (Fontana et al., 2002b; Marchal et al., 2008b). En plus, l'augmentation de la ventilation par l'exercice a un impact direct sur le régime respiratoire par l'activation des capteurs localisés au niveau des voies aériennes, des poumons et de la paroi thoracique, entraînant une bronchodilatation.

La bronchodilatation induite par l'exercice est le résultat d'une association des mécanismes neurologiques et mécaniques, même si la participation de chaque partie n'est pas complétement éclaircie (Marchal et al., 2008a). Comme la bronchoconstriction est capable d'induire la toux par la stimulation mécanique des voies aériennes (Widdicombe, 2001), on peut supposer que la bronchodilatation peut aussi moduler la toux.

En effet, pour les deux groupes (OVA et Contrôle) nous avons pu constater une bronchodilatation à l'exercice comme démontrée par la baisse significative de la résistance des voies aériennes (Rrs) (Table 2). Le comportement à l'exercice des lapins sensibilisés à l'OVA était similaire à celui des lapins contrôles, avec une augmentation du $\dot{V}_E$ et une diminution de la Rrs (pas de différence significative entre les deux groupes). Malgré le fait que l'hyperventilation et la bronchodilatation induites par l'exercice étaient comparables pour les deux groupes, la modulation de la toux semble différente avec l'absence du phénomène de « down regulation » pour le groupe OVA alors qu'il est présent de dans le groupe contrôle. Il est peu probable que cette différence puisse être expliquée uniquement par la bronchodilation induite par l'exercice. Une étude chez l'homme, a démontré que l'exercice peut augmenter le seuil de toux (CT) même en absence d'une bronchodilatation importante (Lavorini et al., 2010) quand antérieurement, une autre a pu montrer que la bronchodilatation ne modifie pas toujours la sensibilité de la toux (Fujimura et al., 1992).

- **Rôle des récepteurs de la toux**

Dernièrement, la recherche a trouvé un intérêt croissant pour le rôle du système nerveux dans la pathogenèse de l'asthme (Spina, 2002). La toux est déclenchée par l'activation de récepteurs spécifiques classés en trois catégories en fonction de leurs caractéristiques électrophysiologiques : *rapidly adapting stretch receptors* (RARs), *slowly adapting receptors* (SARs) dans le muscle des voies aériennes et les récepteurs - fibres C localisées dans l'épithélium (Brooks, 2011). Les voies nerveuses afférentes dans les voies aériennes sont myélinisées (Aδ et Aβ) et non-myélinisées (C), activées par les mécanorécepteurs (Brooks, 2011; Sant'Ambrogio, 1987a, b, c). La stimulation de ces récepteurs des voies aériennes a comme conséquence l'apparition d'une bronchoconstriction, d'une toux et de la sécrétion de mucus (Karlsson et al., 1988).

Des études ont démontré que les patients ayant un asthme toussent et déclenchent une bronchoconstriction en réponse à des stimuli qui entraînent de faibles effets chez les sujets sains : bradykinine, dioxyde de soufre, eau distillée, AMP et capsaïcine (Keir and Page, 2008). Ces stimuli exercent leur effet par l'activation des voies nerveuses localisées dans les voies aériennes (Pauwels et al., 1985). Dans la toux chronique, il est connu que l'air frais a une action directe sur les canaux ioniques TRP (transient receptor potential) liées aux fibres C occasionnant l'apparition d'une toux et l'augmentation de la sensibilité à l'inhalation de la capsaïcine. Les dernières découvertes sur le potentiel de certains canaux ioniques TRP des voies aériennes à être sensibles et de réagir aux variations de la température ambiante, ouvrent des nouvelles portes pour la compréhension de la pathogenèse de certaines réactions des voies respiratoires (Millqvist, 2015; Millqvist et al., 2013).

Les récepteurs RARs des poumons sont en général stimulés par la diminution de la compliance pulmonaire. Chez les lapins, la modification de la compliance pulmonaire entraîne une augmentation de l'activité des récepteurs RARs et des fibres C, surtout en rapport avec la présence du liquide extravasculaire dans les voies aériennes (Ma et al., 2003). Wolf a démontré que l'exercice et l'hyperpnée isocapnique peuvent augmenter le clairance muco-ciliaire chez les sujets normaux, l'exercice étant même associé à un effet plus intense (Wolff et al., 1977).

L'augmentation de la clairance mucociliaire est en rapport avec l'augmentation de la vitesse du flux aérien. Cette augmentation de la vitesse peut stimuler les RARs tracheo-bronchiques déclenchant le réflexe de toux, la bronchoconstriction, la sécrétion de mucus et la vasodilatation (Widdicombe, 1995) par stimulation vagale. Le traitement anticholinergique (ex ipratropium) a démontré son bénéfice dans la toux liée à l'augmentation de la clairance mucociliaire (Bennett et al., 1993). Plus récemment, le mécanisme d'inhibition sur les fibres sensitives vagales par les anticholinegiques a été identifié par l'effet du tiotropium sur les récepteurs TRPV1 (Birrell et al., 2014).

- **Inflammation bronchique à éosinophile et toux**

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la modulation du réflexe de toux par l'exercice chez un modèle animal validé d'inflammation allergique des voies aériennes (Ali et al., 1996; Brozmanova et al., 2006; Petak et al., 2006). Il est connu que la toux est souvent présente dans les maladies respiratoires chroniques à éosinophiles (ex. asthme ou bronchite chronique à éosinophiles) (Gu et al., 2008; Kingham et al., 2002; Niimi et al., 2009) mais la relation directe entre l'éosinophile et la toux est mal connue et les opinions sont divergentes. Par exemple, Niimi est d'avis que l'éosinophile a un rôle central dans la pathogenèse de la toux dans l'asthme quand Brightling soutient que la toux dans l'asthme n'est pas liée à l'inflammation éosinophilique mais plutôt en rapport avec des mécanismes alternatives activatrices (Gu et al., 2008; Kingham et al., 2003) de mastocytes (Niimi et al., 2014).

Les arguments en faveur d'un rôle important que l'éosinophile peut jouer dans la pathogenèse de la toux sont nombreux. L'éosinophilie est une source importante de médiateurs comme PGE2, PGF2α, thromboxane A2 et neuropeptides comme la substance P (SP) qui peuvent déclencher le réflexe de toux et/ou une bronchoconstriction (Weinstock et al., 1988). L'expression de la SP est augmentée autour des terminaisons nerveuses intra-épithéliales chez les patients ayant une toux équivalente d'asthme, comparativement aux sujets contrôles ou ayant un asthme classique, sans que la toux soit le symptôme prédominant (Lee et al., 2003). Le taux de substance P est élevé au niveau sérique chez les patients tousseurs chroniques et souvent associé à une hyperréactivité bronchique chez les patients ayant un asthme (Otsuka et al., 2011).

Les patients ayant une toux équivalente d'asthme ont les mêmes modifications histologiques au niveau de la paroi bronchique comme les autres asthmatiques en rapport avec le remodelage bronchique (épaississement de la membrane basale, hyperplasie glandulaire, hypertrophie du muscle lisse) qui peuvent entraîner une hypersensibilité du réflexe de toux (Matsumoto et al., 2007; Niimi et al., 2000; Niimi et al., 2005). Quand on parle de la toux et du remodelage bronchique, on sait qu'il y a un cercle vicieux car le remodelage peut intervenir dans l'apparition de la toux et, à l'inverse, les traumatismes répétés au niveau des parois bronchiques lors de l'effort de toux peuvent induire un remodelage bronchique (Niimi, 2011b).

Les enzymes libérées lors de la degranulation des éosinophiles sont toxiques, elles peuvent altérer la barrière épithéliale en exposant ainsi directement les récepteurs des fibres nerveuses aux stimuli externes. Les conséquences sont ,chez les patients asthmatiques, l'hyperréactivité bronchique (Beasley et al., 1989) et une hypersensibilité du réflexe de toux chez les tousseurs chroniques non asthmatiques (Niimi et al., 2005).

Les interactions entre les éosinophiles et les autres cellules peuvent avoir aussi un effet sur la toux. Par exemple, dans la toux équivalent d'asthme l'inflammation de voies aériennes est mixte, comportant aussi de nombreux neutrophiles, en dehors des éosinophiles (Niimi et al., 2005). Cette inflammation mixte est en général associée à une résistance à la corticothérapie inhalée dans la toux équivalente d'asthme (Matsuoka et al., 2010).

Les mastocytes infiltrent massivement le muscle lisse bronchique dans l'asthme mais pas dans la bronchite chronique à éosinophiles (Brightling et al., 2002a), pouvant être corrélé à l'hyperréactivité et l'obstruction bronchique dans l'asthme. Par contre, les mastocytes sont nombreux dans le lavage bronchiolo-alvéolaire et la submuqueuse des patients ayant une toux chronique non asthmatique (McGarvey et al., 2009; Niimi et al., 2005). Des médiateurs comme l'histamine et PGD2, produits en grande quantité par les mastocytes, sont en général à des taux élevés chez les patients ayant une toux chronique (bronchite éosinophilique, toux équivalente d'asthme, toux non asthmatique)(Birring et al., 2004). Ces résultats suggèrent que l'activation des mastocytes localisés au niveau épithélial et submuqueux est une voie commune impliquée dans la genèse de la toux (Gibson, 2004). Les mastocytes peuvent produire le NGF (nerve growth factor)

(Skaper et al., 2001) expliquant ainsi l'augmentation de la concentration de CGRP (calcitonin gene-related peptide) au niveau des terminaisons nerveuses chez les patients ayant une toux chronique (O'Connell et al., 1995). La SP stimule aussi la libération d'histamine par les mastocytes (Repke et al., 1987). Les interactions entre les mastocytes et les nerfs peuvent expliquer leur rôle dans la pathogenèse de la toux (Gibson, 2004).

Les éosinophiles interagissent aussi avec les mastocytes et les nerfs. Chez les patients ayant un asthme fatal, les éosinophiles sont retrouvés en grande quantité sur les biopsies bronchiques autour des terminaisons nerveuses, comme chez le cochon d'Inde sensibilisé à divers allergènes (Costello et al., 1997). L'adhésion des éosinophiles aux terminaisons nerveuses est suivie par la dégranulation et la libération des enzymes contenues dans les granules (Kingham et al., 2003) comme la protéine basique majeure (MBP) qui stimule les fibres C vagales (Lee et al., 2001). Les éosinophiles activés et la MBP facilitent la libération de la SP des neurones impliqués directement dans l'apparition de la toux (Garland et al., 1997). En plus, la SP joue un rôle chémoattractant pour les éosinophiles pouvant expliquer ainsi l'effet d'entretien de la toux (Numao and Agrawal, 1992). MBP active aussi les mastocytes au niveau pulmonaire, entraînant la libération des médiateurs protussigènes comme l'histamine et la PGD2 (Piliponsky et al., 2003) et favorise la libération de la SP dans les cultures nerveuses de ganglion dorsal de rats (Garland et al., 1997). Ces deux actions sont dose-dependantes. Ces interactions complexes entre les éosinophiles, neutrophiles, mastocytes et les terminaisons nerveuses peuvent être impliquées dans la pathogènese de la toux associée à l'asthme. La bonne efficacité de la corticothérapie inhalée sur l'inflammation à éosinophiles et la toux dans l'asthme est un argument supplémentaire en faveur d'un rôle important de l'éosinophile dans la pathogenèse de la toux (Niimi et al., 2014).

Au contraire, Brightling suggère que l'inflammation à éosinophiles est suffisante mais non nécessaire pour expliquer la toux chez l'asthmatique. Selon lui, l'inflammation à éosinophiles est un épiphénomène et non la cause de la toux, le rôle principal revenant ainsi aux mastocytes (Brightling et al., 2002a; Brightling et al., 2003; Brightling et al., 2000b; Gibson et al., 1998; Niimi et al., 2014). La concentration importante des mastocytes dans le LBA et les biopsies bronchiques réalisées chez les patients ayant un asthme ou une bronchite à éosinophiles et le fait que la toux est un symptôme fréquent chez les patients ayant une mastocytose sont

des arguments en faveur d'un rôle essentiel de ces cellules dans la pathogenèse de la toux (Hermine et al., 2008; McGarvey et al., 2009; Niimi et al., 2005). La corticothérapie peut diminuer la toux via les mastocytes car il y a des études qui montrent que la corticothérapie diminue l'infiltration et l'activation au niveau de la muqueuse bronchique (Djukanovic et al., 1997; Djukanovic et al., 1992). L'efficacité de l'imatinib dans le syndrome hyperéosinophilique pourrait être en rapport avec l'effet de diminution de la survie des mastocytes par la modulation au niveau des cellules stem (Barker et al., 2010; Chung et al., 2006). De plus, dans les études publiées sur le mepolizumab (anticorps anti-IL 5), traitement de l'asthme sévère éosinophilique, celui-ci réduit de manière significative le nombre et la sévérité des exacerbations, en même temps que le taux d'éosinophiles sans avoir d'impact par contre sur les symptômes et la fonction respiratoire (Flood-Page et al., 2003; Haldar et al., 2009; Leckie et al., 2000). D'ailleurs, les seuls patients qui ont amélioré leur toux étaient ceux prétraités par les corticoïdes systémiques pendant 2 semaines, avant de débuter le mepolizumab (Haldar et al., 2009).

Au vu de ces données il est difficile de conclure sur le rôle joué par l'inflammation éosinophilique dans la toux, d'autant plus que dans notre étude nous avons induit une inflammation bronchique à éosinophiles importante chez les lapins sensibilisés, prouvée par le taux élevé à 26,3% d'éosinophiles dans le LBA, sans pour autant d'avoir une augmentation du taux de mastocytes. Nos résultats de la cytologie du LBA étaient similaires à ceux obtenus dans une autre étude qui comparait des lapins contrôles et sensibilisés à l'OVA (Zschauer et al., 1999). La formule cytologique normale du LBA chez le lapin est comparable à celle retrouvée chez l'homme avec environ 85% de macrophages, 10-15% de lymphocytes, <3% de neutrophiles, <1% d'éosinophiles, <5% de cellules bronchiques (Metzger et al., 1986; Zschauer et al., 1999). Dans la plupart des études, le seuil établi qui reflète l'inflammation bronchique à éosinophiles est un taux >3% (Niimi, 2011b; Niimi et al., 2009; Rytila et al., 2002). Dans une étude publiée par Niimi (Niimi et al., 2005) il trouvait chez les sujets contrôles 1% d'éosinophiles et 2% des mastocytes ; chez les asthmatiques 31,6% d'éosinophiles et 6.6% des mastocytes ; chez les tousseurs chroniques non asthmatiques 10% d'éosinophiles et 8,4% des mastocytes donc des valeurs significativement plus élevées pour les deux lignes cellulaires chez les patients ayant une toux chronique, asthmatiques ou non ($p=0.007$ pour les éosinophiles et $p=0.01$ pour les mastocytes par ANOVA) (Niimi et al., 2005).

Malheureusement, dans notre étude nous n'avons pas mis en évidence l'association : apparition de toux suite à l'exposition allergénique (aérosol OVA) et inflammation à éosinophiles induite par la sensibilisation à l'OVA, contrairement à des études antérieures sur d'autres modèles animaux (Brozmanova et al., 2006; Hara et al., 2005; Liu et al., 2001). Chez le cochon d'Inde sensibilisé, la sensibilité de la toux (prouvée par le test à la capsaïcine) a été significativement augmentée dans les premières 24h après exposition allergénique sans bronchoconstriction. Cette hypersensibilité de la toux disparaît dans la première semaine après l'exposition allergénique (Liu et al., 2001). Ces données ont été confirmées par une étude plus récente (Hara et al., 2005), mais dans celle-ci il y avait en plus, une hyperréactivité bronchique. De manière similaire, le test de provocation nasale à l'OVA chez le cochon d'Inde sensibilisé entraîne une augmentation précoce de la toux (dans les 3 premières heures après l'exposition) (Brozmanova et al., 2006). Une étude réalisée chez l'homme par Minoguchi (Minoguchi et al., 2003) n'a pas confirmé les résultats obtenus dans les études sur le modèle animal de cochon d'Inde car il n'y a pas eu d'hypersensibilité de la toux au test à la capsaïcine dans les 24h après le test de provocation allergénique. Etant donné ces données divergentes (probablement en rapport avec les différences inter-espèces) il est difficile de conclure par rapport à la relation entre la sensibilisation du réflexe de toux et l'inflammation à éosinophiles des voies aériennes chez les patients ayant une rhinite allergique ou un asthme.

Les hypothèses émises pour l'instant que les éosinophiles, en contact avec les fibres nerveuses et les récepteurs des voies aériennes sont capables de déclencher une neuro-inflammation entraînant l'augmentation de l'occurrence de la toux sont intéressantes (Gu et al., 2008; Kingham et al., 2003; Kingham et al., 2002) et méritent des études complémentaires. Même si les mécanismes spécifiques par lesquels l'inflammation module le réflexe de toux n'est pas établi clairement, il est démontré que les médiateurs inflammatoires influencent indirectement les réponses neuronales des voies aériennes à la capsaïcine par l'activation des récepteurs de type *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1)* des fibres C (Chung et al., 2013; Sikand and Premkumar, 2007).

- **Influence de l'exercice sur la toux dans le contexte d'inflammation bronchique à éosinophiles**

Si la modulation de la toux par l'inflammation est complexe et incomplètement éclaircie, les interactions entre l'exercice-toux–inflammation bronchique éosinophilique sont encore plus difficiles à étudier et à interpréter car les données disponibles actuellement dans le domaine toux-exercice sont limitées et parfois contradictoires.

Dans la littérature, une étude récente réalisée sur des rats sensibilisés à l'OVA *vs* contrôles (Kodesh et al., 2011b), il a été observé qu'aucun animal contrôle avec ou sans exercice n'a présenté une bronchoconstriction induite par l'exercice, alors que 80% des rats sensibilisés à l'OVA avaient une respiration bruyante au décours de l'aérosol d'OVA et 30% des rats sensibilisés à l'OVA présentaient une respiration bruyante pendant l'exercice sans exposition à l'aérosol d'OVA. Dans cette étude, les prélèvements tissulaires avaient des concentrations significativement plus élevées de TNF-α, IL-1α, growth-related oncogène/kératinocyte/chémoattractant et IFN-γ ($p < 0.001$) dans le groupe sensibilisé à l'OVA et exposé aux aérosols d'OVA par rapport aux autres groupes. Ces anomalies n'ont pas été retrouvées chez les rats sensibilisés à l'OVA ayant fait l'exercice, pouvant suggérer un mécanisme différent à l'origine de la bronchoconstriction (Kodesh et al., 2011b).

Dans notre étude, au décours des expérimentations aiguës, nous n'avons pas enregistré d'anomalies auscultatoires, ni pendant l'aérosol d'OVA, ni pendant l'exercice pour les deux groupes de lapins, mais nous n'avons pas pu réaliser des prélèvements tissulaires pour le dosage de certains biomarqueurs et faire des analyses comparatives. Il est difficile d'extrapoler les résultats obtenus sur l'animal à l'être humain, surtout quand le domaine de recherche est la bronchoconstriction induite par l'exercice car malgré certaines similarités il existe aussi beaucoup de différences inter-espèces (Freed, 1995). Malgré tout, les recherches doivent continuer dans ce domaine afin d'avancer dans la compréhension du comportement respiratoire à l'exercice, pour les différents phénotypes inflammatoires.

Effectivement, il existe un intérêt croissant pour l'étude des interactions entre la toux et les activités humaines (Widdicombe et al., 2009). Des activités communes comme manger, boire, parler, chanter ou faire des exercices peuvent être des

triggers de la toux faisant l'objet d'un nouveau concept de la toux, comme maladie neurologique (Chung et al., 2013). Concernant l'exercice, les données actuelles sont en faveur d'une modulation de la toux par l'activité physique indiquant des réponses adaptatives variables (Widdicombe et al., 2009), par régulation nerveuse centrale et périphérique (Bonham et al., 2004).

- **Modulation centrale de la toux**

A l'heure actuelle il y a beaucoup d'arguments en faveur d'une modulation de la toux chez le lapin sensibilisé à l'OVA par le système nerveux périphérique mais il faut s'interroger aussi sur le rôle du système nerveux central. La vision actuelle est qu'il existe au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) du tronc cérébral, des neurones relais recevant l'information tussigène périphérique par le nerf vague. Ces neurones sont capables d'envoyer l'information aux neurones portails (gating-neurons) de la toux qui intègrent les informations des neurones relais et codent l'intensité et le nombre de quintes de toux nécessaires. Le centre générateur de la toux élabore ainsi le schéma de toux qui est transmis par des neurones spécifiques (neurones bulbospinaux majorant l'inspiration et l'expiration) aux voies effectrices motrices respiratoires, intervenant dans la toux (muscles des voies aériennes supérieures, respiratoires accessoires et diaphragme) (Didier, 2015).

La toux et la respiration sont générées par des neurones localisés dans des régions voisines, voire les mêmes au niveau cérébral (Bolser et al., 2006; McGovern et al., 2012). En réponse à la stimulation trachéale, les centres nerveux respiratoires doivent répondre de manière adaptée, à la fois par rapport au statut repos/effort, comme à la stimulation mécanique trachéale (Bolser et al., 2006; Poussel et al., 2014).

Dans notre étude, le phénomène de "down regulation" de la toux par l'exercice chez les lapins contrôles a été confirmé, comme précédemment démontré par notre équipe (Poussel et al., 2014). Cette constatation peut être en rapport avec le fait que les centres coordinateurs respiratoires privilégient l'adaptation de la respiration à l'exercice par l'hyperventilation chez les lapins contrôles, en inhibant le réflexe de toux, comme mécanisme de défense à la stimulation mécanique trachéale. Chez les lapins sensibilisés à l'OVA, on s'attendait à avoir une augmentation de la toux à l'exercice mais on assiste simplement à la disparition de ce phénomène de "down-

regulation” décrit chez les lapins contrôles. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que l’inflammation des voies aériennes entraîne des modifications locales qui empêchent l’apparition des réponses physiologiques et que pour les centres respiratoires, la priorité est l’adaptation de la respiration à l’exercice par l’hyperventilation, et non la défense face à une agression locale (Larsson et al., 1998).

V. CONCLUSION

Notre étude confirme l'apparition du phénomène de "down-regulation" à l'exercice pour les lapins contrôles, comme déjà démontré dans des études précédentes réalisées dans notre laboratoire. L'originalité de notre étude consiste en l'analyse comparative entre un groupe contrôle et un groupe sensibilisé à l'OVA (modèle d'inflammatoire bronchique d'origine allergique) avec les mêmes conditions de stimulation (locale par la stimulation mécanique trachéale et générale par l'exercice) au repos et à l'exercice. Nous avons alors mis en évidence des différences entre le comportement des lapins sensibilisés à l'OVA et les lapins contrôles avec la perte du phénomène de « down-regulation » à l'exercice pour les lapins sensibilisés. Même si nous n'avons pas assisté à une aggravation de la toux par l'exercice chez les lapins sensibilisés à l'OVA, cette étude a démontré que les lapins ayant une inflammation de type allergique des voies aériennes ont un comportement respiratoire différent des lapins contrôles, en réponse aux mêmes stimuli. Ces résultats vont dans le sens d'une susceptibilité à la toux, augmentée chez les patients asthmatiques durant l'exercice. D'autres études sont nécessaires pour une meilleure compréhension des mécanismes expliquant la perte du phénomène de « down-regulation » à l'exercice chez les lapins ayant une inflammation des voies aériennes.

D. CONCLUSIONS ET PERPECTIVES

La toux chronique est souvent rapportée par les patients ayant un asthme, allergique ou non, au repos comme à l'effort. Les mécanismes physiopathologiques de la toux chez l'asthmatique ne sont pas complètement élucidés et les hypothèses évoquées sont multiples et complexes. A l'heure actuelle, on ne peut pas affirmer si l'éosinophile joue un rôle principal ou secondaire dans la pathogènse de la toux chez le patient asthmatique.

En ce qui concerne la pathogenèse de la toux à l'effort, elle n'est pas exactement éclaircie malgré un intérêt croissant pour ce domaine au décours des dernières années et un nombre grandissant de publications récentes.

A notre connaissance, ce travail est le premier à étudier la modulation du réflexe de toux par l'exercice, chez des lapins sensibilisés à l'ovalbumine par rapport à un échantillon contrôle. Notre travail a confirmé que les lapins sensibilisés ont un comportement différent à l'exercice face à la stimulation tussive, par rapport à celui des lapins contrôles, avec une perte de l'effet de « down-regulation » physiologique induit par l'exercice.

Le modèle de lapin développé dans cette étude est particulièrement adapté aux travaux de recherche en physiologie respiratoire car il permet une ventilation spontanée durant toute la période de l'expérimentation aiguë. Les mesures des variables respiratoires sont ainsi facilitées et fiables. Elles permettent de distinguer sans difficulté le réflexe de toux, du réflexe expiratoire, et testent les boucles réflexes, suite à la stimulation trachéale administrée au moment choisi du cycle respiratoire. Ce modèle expérimental ouvre des perspectives intéressantes en permettant des études visant à une meilleure compréhension des voies impliquées dans ces réflexes de défense respiratoire, ainsi que des mécanismes de régulation.

Dans l'avenir proche, nous souhaitons réaliser une étude similaire mais en faisant le test thérapeutique par corticothérapie systémique, pour savoir si elle est de nature à entraîner une restauration du phénomène de « down-régulation » à l'exercice chez les lapins sensibilisés à l'OVA, comme décrit chez les lapins contrôles. Le traitement anti-inflammatoire des voies aériennes permettrait alors la

« normalisation » des réponses physiologiques de défense à la stimulation mécanique trachéale.

La meilleure compréhension des voies impliquées dans la toux, à l'exercice comme au repos, sur un modèle d'inflammation bronchique devrait permettre une meilleure approche clinique et thérapeutique de cette pathologie. De nouveaux traitements spécifiques seraient souhaitables afin d'améliorer la prise en charge de cette pathologie tussive, parfois invalidante pour les patients et qui peut être à l'origine d'une altération de leur qualité de vie puisqu'il n'existe pour le moment que des traitements symptomatiques, avec une efficacité variable.

E. RÉFÉRENCES

Aalbers, R., Kauffman, H.F., Vrugt, B., Koeter, G.H., de Monchy, J.G., 1993. Allergen-induced recruitment of inflammatory cells in lavage 3 and 24 h after challenge in allergic asthmatic lungs. Chest 103, 1178-1184.

Adamko, D., Odemuyiwa, S.O., Moqbel, R., 2003. The eosinophil as a therapeutic target in asthma: beginning of the end, or end of the beginning? Current opinion in pharmacology 3, 227-232.

Ali, S., Metzger, W.J., Mustafa, S.J., 1996. Simultaneous measurement of cyclopentyladenosine-induced contraction and intracellular calcium in bronchial rings from allergic rabbits and it's antagonism. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 278, 639-644.

Ambalavanar, R., Tanaka, Y., Selbie, W.S., Ludlow, C.L., 2004. Neuronal activation in the medulla oblongata during selective elicitation of the laryngeal adductor response. Journal of neurophysiology 92, 2920-2932.

Anderson, S.D., Daviskas, E., 2000. The mechanism of exercise-induced asthma is. The Journal of allergy and clinical immunology 106, 453-459.

Anderson, S.D., Holzer, K., 2000. Exercise-induced asthma: is it the right diagnosis in elite athletes? The Journal of allergy and clinical immunology 106, 419-428.

Anderson, S.D., Schoeffel, R.E., Follet, R., Perry, C.P., Daviskas, E., Kendall, M., 1982. Sensitivity to heat and water loss at rest and during exercise in asthmatic patients. European journal of respiratory diseases 63, 459-471.

Armstrong, D.J., Luck, J.C., 1974. A comparative study of irritant and type J receptors in the cat. Respiration physiology 21, 47-60.

Arora, N.S., Gal, T.J., 1981. Cough dynamics during progressive expiratory muscle weakness in healthy curarized subjects. Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology 51, 494-498.

Atzori, L., Bannenberg, G., Corriga, A.M., Lou, Y.P., Lundberg, J.M., Ryrfeldt, A., Moldeus, P., 1992. Sulfur dioxide-induced bronchoconstriction via ruthenium red-sensitive activation of sensory nerves. Respiration; international review of thoracic diseases 59, 272-278.

Ayik, S.O., Basoglu, O.K., Erdinc, M., Bor, S., Veral, A., Bilgen, C., 2003. Eosinophilic bronchitis as a cause of chronic cough. Respiratory medicine 97, 695-701.

Baekey, D.M., Morris, K.F., Nuding, S.C., Segers, L.S., Lindsey, B.G., Shannon, R., 2003. Medullary raphe neuron activity is altered during fictive cough in the decerebrate cat. J Appl Physiol (1985) 94, 93-100.

Baluk, P., Nadel, J.A., McDonald, D.M., 1992. Substance P-immunoreactive sensory axons in the rat respiratory tract: a quantitative study of their distribution and role in neurogenic inflammation. The Journal of comparative neurology 319, 586-598.

Banner, A.S., Chausow, A., Green, J., 1985. The tussive effect of hyperpnea with cold air. The American review of respiratory disease 131, 362-367.

Banner, A.S., Green, J., O'Connor, M., 1984. Relation of respiratory water loss to coughing after exercise. The New England journal of medicine 311, 883-886.

Barker, B., Moudgil, H., Slocombe, G., Srinivasan, K., 2010. Persistent cough: an unusual cause. Idiopathic hypereosinophilic syndrome (HES). Thorax 65, 1009, 1024.

Barrett, N.A., Austen, K.F., 2009. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. Immunity 31, 425-437.

Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., Julius, D., 2006. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. Cell 124, 1269-1282.

Beasley, R., Roche, W.R., Roberts, J.A., Holgate, S.T., 1989. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. The American review of respiratory disease 139, 806-817.

Belvisi, M.G., Birrell, M.A., Khalid, S., Wortley, M.A., Dockry, R., Coote, J., Holt, K., Dubuis, E., Kelsall, A., Maher, S.A., Bonvini, S., Woodcock, A., Smith, J.A., 2016. Neurophenotypes in Airway Diseases. Insights from Translational Cough Studies. American journal of respiratory and critical care medicine 193, 1364-1372.

Belvisi, M.G., Bolser, D.C., 2002. Summary: animal models for cough. Pulmonary pharmacology & therapeutics 15, 249-250.

Belvisi, M.G., Dubuis, E., Birrell, M.A., 2011. Transient receptor potential A1 channels: insights into cough and airway inflammatory disease. Chest 140, 1040-1047.

Belvisi, M.G., Geppetti, P., 2004. Cough. 7: Current and future drugs for the treatment of chronic cough. Thorax 59, 438-440.

Benemei, S., Patacchini, R., Trevisani, M., Geppetti, P., 2015. TRP channels. Current opinion in pharmacology 22, 18-23.

Bennett, W.D., Chapman, W.F., Mascarella, J.M., 1993. The acute effect of ipratropium bromide bronchodilator therapy on cough clearance in COPD. Chest 103, 488-495.

Bergren, D.R., 1997. Sensory receptor activation by mediators of defense reflexes in guinea-pig lungs. Respiration physiology 108, 195-204.

Berkman, N., Avital, A., Breuer, R., Bardach, E., Springer, C., Godfrey, S., 2005. Exhaled nitric oxide in the diagnosis of asthma: comparison with bronchial provocation tests. Thorax 60, 383-388.

Birrell, M.A., Belvisi, M.G., Grace, M., Sadofsky, L., Faruqi, S., Hele, D.J., Maher, S.A., Freund-Michel, V., Morice, A.H., 2009. TRPA1 agonists evoke coughing in guinea pig and human volunteers. American journal of respiratory and critical care medicine 180, 1042-1047.

Birrell, M.A., Bonvini, S.J., Dubuis, E., Maher, S.A., Wortley, M.A., Grace, M.S., Raemdonck, K., Adcock, J.J., Belvisi, M.G., 2014. Tiotropium modulates transient receptor potential V1 (TRPV1) in airway sensory nerves: A beneficial off-target effect? The Journal of allergy and clinical immunology 133, 679-687 e679.

Birring, S.S., Parker, D., Brightling, C.E., Bradding, P., Wardlaw, A.J., Pavord, I.D., 2004. Induced sputum inflammatory mediator concentrations in chronic cough. American journal of respiratory and critical care medicine 169, 15-19.

Bloom, J.W., Baumgartener-Folkerts, C., Palmer, J.D., Halonen, M., 1988. Airway cholinergic responsiveness in rabbits in relation to antigen sensitization and challenge. Immunopharmacology 15, 157-167.

Bolser, D.C., Aziz, S.M., Chapman, R.W., 1991. Ruthenium red decreases capsaicin and citric acid-induced cough in guinea pigs. Neuroscience letters 126, 131-133.

Bolser, D.C., Poliacek, I., Jakus, J., Fuller, D.D., Davenport, P.W., 2006. Neurogenesis of cough, other airway defensive behaviors and breathing: A holarchical system? Respiratory physiology & neurobiology 152, 255-265.

Bongianni, F., Mutolo, D., Fontana, G.A., Pantaleo, T., 1998. Discharge patterns of Botzinger complex neurons during cough in the cat. The American journal of physiology 274, R1015-1024.

Bonham, A.C., Joad, J.P., 1991. Neurones in commissural nucleus tractus solitarii required for full expression of the pulmonary C fibre reflex in rat. The Journal of physiology 441, 95-112.

Bonham, A.C., McCrimmon, D.R., 1990. Neurones in a discrete region of the nucleus tractus solitarius are required for the Breuer-Hering reflex in rat. The Journal of physiology 427, 261-280.

Bonham, A.C., Sekizawa, S., Chen, C.Y., Joad, J.P., 2006. Plasticity of brainstem mechanisms of cough. Respiratory physiology & neurobiology 152, 312-319.

Bonham, A.C., Sekizawa, S.I., Joad, J.P., 2004. Plasticity of central mechanisms for cough. Pulmonary pharmacology & therapeutics 17, 453-457; discussion 469-470.

Bonsignore, M.R., Morici, G., Vignola, A.M., Riccobono, L., Bonanno, A., Profita, M., Abate, P., Scichilone, N., Amato, G., Bellia, V., Bonsignore, G., 2003. Increased airway inflammatory cells in endurance athletes: what do they mean? Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 33, 14-21.

Bougault, V., Turmel, J., Levesque, B., Boulet, L.P., 2009. The respiratory health of swimmers. Sports medicine 39, 295-312.

Boulet, L.P., O'Byrne, P.M., 2015. Asthma and exercise-induced bronchoconstriction in athletes. The New England journal of medicine 372, 641-648.

Brightling, C.E., 2011. Eosinophils, bronchitis and asthma: pathogenesis of cough and airflow obstruction. Pulm Pharmacol Ther 24, 324-327.

Brightling, C.E., Bradding, P., Symon, F.A., Holgate, S.T., Wardlaw, A.J., Pavord, I.D., 2002a. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. The New England journal of medicine 346, 1699-1705.

Brightling, C.E., Pavord, I.D., 2000. Eosinophilic bronchitis: an important cause of prolonged cough. Annals of medicine 32, 446-451.

Brightling, C.E., Symon, F.A., Birring, S.S., Bradding, P., Pavord, I.D., Wardlaw, A.J., 2002b. TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. The Journal of allergy and clinical immunology 110, 899-905.

Brightling, C.E., Symon, F.A., Birring, S.S., Bradding, P., Wardlaw, A.J., Pavord, I.D., 2003. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. Thorax 58, 528-532.

Brightling, C.E., Ward, R., Goh, K.L., Wardlaw, A.J., Pavord, I.D., 1999. Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough. American journal of respiratory and critical care medicine 160, 406-410.

Brightling, C.E., Ward, R., Wardlaw, A.J., Pavord, I.D., 2000a. Airway inflammation, airway responsiveness and cough before and after inhaled budesonide in patients with eosinophilic bronchitis. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 15, 682-686.

Brightling, C.E., Ward, R., Woltmann, G., Bradding, P., Sheller, J.R., Dworski, R., Pavord, I.D., 2000b. Induced sputum inflammatory mediator concentrations in eosinophilic bronchitis and asthma. American journal of respiratory and critical care medicine 162, 878-882.

Brito, R., Sheth, S., Mukherjea, D., Rybak, L.P., Ramkumar, V., 2014. TRPV1: A Potential Drug Target for Treating Various Diseases. Cells 3, 517-545.

Brooks, S.M., 2011. Perspective on the human cough reflex. Cough 7, 10.

Brozmanova, M., Calkovsky, V., Plevkova, J., Bartos, V., Plank, L., Tatar, M., 2006. Early and late allergic phase related cough response in sensitized guinea pigs with experimental allergic rhinitis. Physiological research 55, 577-584.

Brusselle, G.G., Maes, T., Bracke, K.R., 2013. Eosinophils in the spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. Nature medicine 19, 977-979.

Canning, B.J., Farmer, D.G., Mori, N., 2006a. Mechanistic studies of acid-evoked coughing in anesthetized guinea pigs. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 291, R454-463.

Canning, B.J., Mori, N., Mazzone, S.B., 2006b. Vagal afferent nerves regulating the cough reflex. Respiratory physiology & neurobiology 152, 223-242.

Canning, B.J., Reynolds, S.M., Mazzone, S.B., 2001. Multiple mechanisms of reflex bronchospasm in guinea pigs. J Appl Physiol 91, 2642-2653.

Canning, B.J., Widdicombe, J.G., 2001. Innervation of the airways: introduction. Respiration physiology 125, 1-2.

Carr, M.J., Lee, L.Y., 2006. Plasticity of peripheral mechanisms of cough. Respiratory physiology & neurobiology 152, 298-311.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 389, 816-824.

Chambers, M.A., Williams, A., Gavier-Widen, D., Whelan, A., Hall, G., Marsh, P.D., Bloom, B.R., Jacobs, W.R., Hewinson, R.G., 2000. Identification of a Mycobacterium bovis BCG auxotrophic mutant that protects guinea pigs against M. bovis and hematogenous spread of Mycobacterium tuberculosis without sensitization to tuberculin. Infection and immunity 68, 7094-7099.

Chang, A.B., Gibson, P.G., Ardill, J., McGarvey, L.P., 2007. Calcitonin gene-related peptide relates to cough sensitivity in children with chronic cough. The European respiratory journal 30, 66-72.

Chatkin, J.M., Ansarin, K., Silkoff, P.E., McClean, P., Gutierrez, C., Zamel, N., Chapman, K.R., 1999. Exhaled nitric oxide as a noninvasive assessment of chronic cough. American journal of respiratory and critical care medicine 159, 1810-1813.

Chimenti, L., Morici, G., Paterno, A., Santagata, R., Bonanno, A., Profita, M., Riccobono, L., Bellia, V., Bonsignore, M.R., 2010. Bronchial epithelial damage after a half-marathon in nonasthmatic amateur runners. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 298, L857-862.

Cho, Y.S., Lee, C.K., Yoo, B., Moon, H.B., 2002. Cough sensitivity and extrathoracic airway responsiveness to inhaled capsaicin in chronic cough patients. Journal of Korean medical science 17, 616-620.

Cho, Y.S., Park, S.Y., Lee, C.K., Lee, E.Y., Shin, J.H., Yoo, B., Moon, H.B., 2003. Enhanced cough response to hyperpnea with cold air challenge in chronic cough patients showing increased cough sensitivity to inhaled capsaicin. Allergy 58, 486-491.

Chou, Y.L., Scarupa, M.D., Mori, N., Canning, B.J., 2008. Differential effects of airway afferent nerve subtypes on cough and respiration in anesthetized guinea pigs. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 295, R1572-1584.

Choudry, N.B., Fuller, R.W., Pride, N.B., 1989. Sensitivity of the human cough reflex: effect of inflammatory mediators prostaglandin E2, bradykinin, and histamine. The American review of respiratory disease 140, 137-141.

Christianson, C.A., Goplen, N.P., Zafar, I., Irvin, C., Good, J.T., Jr., Rollins, D.R., Gorentla, B., Liu, W., Gorska, M.M., Chu, H., Martin, R.J., Alam, R., 2015. Persistence of asthma requires multiple feedback circuits involving type 2 innate lymphoid cells and IL-33. The Journal of allergy and clinical immunology 136, 59-68 e14.

Chuaychoo, B., Hunter, D.D., Myers, A.C., Kollarik, M., Undem, B.J., 2005a. Allergen-induced substance P synthesis in large-diameter sensory neurons innervating the lungs. The Journal of allergy and clinical immunology 116, 325-331.

Chuaychoo, B., Lee, M.G., Kollarik, M., Pullmann, R., Jr., Undem, B.J., 2006. Evidence for both adenosine A1 and A2A receptors activating single vagal sensory C-fibres in guinea pig lungs. The Journal of physiology 575, 481-490.

Chuaychoo, B., Lee, M.G., Kollarik, M., Undem, B.J., 2005b. Effect of 5-hydroxytryptamine on vagal C-fiber subtypes in guinea pig lungs. Pulmonary pharmacology & therapeutics 18, 269-276.

Chung, K.F., Hew, M., Score, J., Jones, A.V., Reiter, A., Cross, N.C., Bain, B.J., 2006. Cough and hypereosinophilia due to FIP1L1-PDGFRA fusion gene with tyrosine kinase activity. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 27, 230-232.

Chung, K.F., McGarvey, L., Mazzone, S.B., 2013. Chronic cough as a neuropathic disorder. The Lancet. Respiratory medicine 1, 414-422.

Chung, K.F., Pavord, I.D., 2008. Prevalence, pathogenesis, and causes of chronic cough. Lancet 371, 1364-1374.

Chung, K.F., Widdicombe, J.G., 2009. Cough: setting the scene. Handbook of experimental pharmacology, 1-21.

Clay, E., Patacchini, R., Trevisani, M., Preti, D., Brana, M.P., Spina, D., Page, C., 2016. Ozone-Induced Hypertussive Responses in Rabbits and Guinea Pigs. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 357, 73-83.

Cohn, M.A., Baier, H., Wanner, A., 1978. Failure of hypoxic pulmonary vasoconstriction in the canine asthma model. Effect of prostaglandin inhibitors. The Journal of clinical investigation 61, 1463-1470.

Coleridge, H.M., Coleridge, J.C., Ginzel, K.H., Baker, D.G., Banzett, R.B., Morrison, M.A., 1976. Stimulation of 'irritant' receptors and afferent C-fibres in the lungs by prostaglandins. Nature 264, 451-453.

Coleridge, J.C., Coleridge, H.M., 1984. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology 99, 1-110.

Coleridge, J.C., Coleridge, H.M., Roberts, A.M., Kaufman, M.P., Baker, D.G., 1982. Tracheal contraction and relaxation initiated by lung and somatic afferents in dogs. J Appl Physiol 52, 984-990.

Costello, R.W., Schofield, B.H., Kephart, G.M., Gleich, G.J., Jacoby, D.B., Fryer, A.D., 1997. Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function. The American journal of physiology 273, L93-103.

Couillard, S., Bougault, V., Turmel, J., Boulet, L.P., 2014. Perception of bronchoconstriction following methacholine and eucapnic voluntary hyperpnea challenges in elite athletes. Chest 145, 794-802.

Coutier, L., Varechova, S., Demoulin, B., Bonabel, C., Roman-Amat, C., Tuan, T.L., Ioan, I., Schweitzer, C., Marchal, F., 2014. Specific airway resistance in children: panting or tidal breathing? Pediatric pulmonology 49, 245-251.

Coyle, A.J., Page, C.P., Atkinson, L., Sjoerdsma, K., Touvay, C., Metzger, W.J., 1989. Modification of allergen-induced airway obstruction and airway hyperresponsiveness in an allergic rabbit model by the selective platelet-activating factor antagonist, BN 52021. The Journal of allergy and clinical immunology 84, 960-967.

Coyle, M.A., Keenan, D.B., Henderson, L.S., Watkins, M.L., Haumann, B.K., Mayleben, D.W., Wilson, M.G., 2005. Evaluation of an ambulatory system for the quantification of cough frequency in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Cough 1, 3.

Cross, B.A., Davey, A., Guz, A., Katona, P.G., MacLean, M., Murphy, K., Semple, S.J., Stidwill, R., 1982. The role of spinal cord transmission in the ventilatory response to electrically induced exercise in the anaesthetized dog. The Journal of physiology 329, 37-55.

Davies, R.O., Kubin, L., 1986. Projection of pulmonary rapidly adapting receptors to the medulla of the cat: an antidromic mapping study. The Journal of physiology 373, 63-86.

Davies, R.O., Kubin, L., Pack, A.I., 1987. Pulmonary stretch receptor relay neurones of the cat: location and contralateral medullary projections. The Journal of physiology 383, 571-585.

de Groot, J.C., Ten Brinke, A., Bel, E.H., 2015. Management of the patient with eosinophilic asthma: a new era begins. ERJ open research 1.

De Logu, F., Patacchini, R., Fontana, G., Geppetti, P., 2016. TRP functions in the broncho-pulmonary system. Seminars in immunopathology 38, 321-329.

Del Giacco, S.R., Firinu, D., Bjermer, L., Carlsen, K.H., 2015. Exercise and asthma: an overview. European clinical respiratory journal 2, 27984.

Delmas, M.C., Fuhrman, C., 2010. Asthma in France: a review of descriptive epidemiological data. Revue des maladies respiratoires 27, 151-159.

Dey, R.D., Altemus, J.B., Zervos, I., Hoffpauir, J., 1990. Origin and colocalization of CGRP- and SP-reactive nerves in cat airway epithelium. J Appl Physiol 68, 770-778.

Dicpinigaitis, P.V., 2007. Experimentally induced cough. Pulmonary pharmacology & therapeutics 20, 319-324.

Didier, A.,Escamilla, R. 2015. Toux chronique. Margaux Orange, Paris.

Djukanovic, R., Homeyard, S., Gratziou, C., Madden, J., Walls, A., Montefort, S., Peroni, D., Polosa, R., Holgate, S., Howarth, P., 1997. The effect of treatment with oral corticosteroids on asthma symptoms and airway inflammation. American journal of respiratory and critical care medicine 155, 826-832.

Djukanovic, R., Wilson, J.W., Britten, K.M., Wilson, S.J., Walls, A.F., Roche, W.R., Howarth, P.H., Holgate, S.T., 1992. Effect of an inhaled corticosteroid on airway inflammation and symptoms in asthma. The American review of respiratory disease 145, 669-674.

Doherty, M.J., Mister, R., Pearson, M.G., Calverley, P.M., 2000. Capsaicin responsiveness and cough in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 55, 643-649.

Dozier, T.S., Brodsky, M.B., Michel, Y., Walters, B.C., Jr., Martin-Harris, B., 2006. Coordination of swallowing and respiration in normal sequential cup swallows. The Laryngoscope 116, 1489-1493.

Durham, S.R., Craddock, C.F., Cookson, W.O., Benson, M.K., 1988. Increases in airway responsiveness to histamine precede allergen-induced late asthmatic responses. The Journal of allergy and clinical immunology 82, 764-770.

Duz, M., Whittaker, A.G., Love, S., Parkin, T.D., Hughes, K.J., 2010. Validation of a digital audio recording method for the objective assessment of cough in the horse. Research in veterinary science 89, 266-271.

Dwyer, T.M., Farley, J.M., 1997. Mucus glycoconjugate secretion in cool and hypertonic solutions. The American journal of physiology 272, L1121-1125.

El-Hashim, A.Z., Amine, S.A., 2005. The role of substance P and bradykinin in the cough reflex and bronchoconstriction in guinea-pigs. European journal of pharmacology 513, 125-133.

Eum, S.Y., Maghni, K., Tolloczko, B., Eidelman, D.H., Martin, J.G., 2005. IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 288, L576-584.

Ezure, K., Otake, K., Lipski, J., She, R.B., 1991. Efferent projections of pulmonary rapidly adapting receptor relay neurons in the cat. Brain research 564, 268-278.

Ezure, K., Tanaka, I., Saito, Y., Otake, K., 2002. Axonal projections of pulmonary slowly adapting receptor relay neurons in the rat. The Journal of comparative neurology 446, 81-94.

Flood-Page, P.T., Menzies-Gow, A.N., Kay, A.B., Robinson, D.S., 2003. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. American journal of respiratory and critical care medicine 167, 199-204.

Fontana, G.A., Pantaleo, T., Lavorini, F., Bongianni, F., Mannelli, M., Bridge, P.D., Pistolesi, M., 2002a. Handgrip-induced airway dilation in asthmatic patients with bronchoconstriction induced by MCh inhalation. J Appl Physiol 93, 1723-1730.

Fontana, G.A., Pantaleo, T., Lavorini, F., Bongianni, F., Mannelli, M., Bridge, P.D., Pistolesi, M., 2002b. Handgrip-induced airway dilation in asthmatic patients with bronchoconstriction induced by MCh inhalation. J Appl Physiol (1985) 93, 1723-1730.

Fontana, G.A., Pantaleo, T., Lavorini, F., Mutolo, D., Polli, G., Pistolesi, M., 1999. Coughing in laryngectomized patients. American journal of respiratory and critical care medicine 160, 1578-1584.

Fontana, G.A., Widdicombe, J., 2007. What is cough and what should be measured? Pulmonary pharmacology & therapeutics 20, 307-312.

Ford, A.C., Forman, D., Moayyedi, P., Morice, A.H., 2006. Cough in the community: a cross sectional survey and the relationship to gastrointestinal symptoms. Thorax 61, 975-979.

Forsberg, K., Karlsson, J.A., Theodorsson, E., Lundberg, J.M., Persson, C.G., 1988. Cough and bronchoconstriction mediated by capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. Pulmonary pharmacology 1, 33-39.

Fox, A.J., Lalloo, U.G., Belvisi, M.G., Bernareggi, M., Chung, K.F., Barnes, P.J., 1996. Bradykinin-evoked sensitization of airway sensory nerves: a mechanism for ACE-inhibitor cough. Nature medicine 2, 814-817.

Franova, S., Joskova, M., Sadlonova, V., Pavelcikova, D., Mesarosova, L., Novakova, E., Sutovska, M., 2013. Experimental model of allergic asthma. Advances in experimental medicine and biology 756, 49-55.

Freed, A.N., 1995. Models and mechanisms of exercise-induced asthma. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 8, 1770-1785.

Fujimura, M., Ogawa, H., Nishizawa, Y., Nishi, K., 2003. Comparison of atopic cough with cough variant asthma: is atopic cough a precursor of asthma? Thorax 58, 14-18.

Fujimura, M., Sakamoto, S., Kamio, Y., Bando, T., Kurashima, K., Matsuda, T., 1993. Effect of inhaled procaterol on cough receptor sensitivity to capsaicin in patients with asthma or chronic bronchitis and in normal subjects. Thorax 48, 615-618.

Fujimura, M., Sakamoto, S., Kamio, Y., Matsuda, T., 1992. Effects of methacholine induced bronchoconstriction and procaterol induced bronchodilation on cough receptor sensitivity to inhaled capsaicin and tartaric acid. Thorax 47, 441-445.

Fuller, R.W., Dixon, C.M., Barnes, P.J., 1985. Bronchoconstrictor response to inhaled capsaicin in humans. J Appl Physiol (1985) 58, 1080-1084.

Garland, A., Necheles, J., White, S.R., Neeley, S.P., Leff, A.R., Carson, S.S., Alger, L.E., McAllister, K., Solway, J., 1997. Activated eosinophils elicit substance P release from cultured dorsal root ganglion neurons. The American journal of physiology 273, L1096-1102.

Gatti, R., Andre, E., Amadesi, S., Dinh, T.Q., Fischer, A., Bunnett, N.W., Harrison, S., Geppetti, P., Trevisani, M., 2006. Protease-activated receptor-2 activation exaggerates TRPV1-mediated cough in guinea pigs. J Appl Physiol 101, 506-511.

George, L., Brightling, C.E., 2016. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Therapeutic advances in chronic disease 7, 34-51.

Gestreau, C., Dutschmann, M., Obled, S., Bianchi, A.L., 2005. Activation of XII motoneurons and premotor neurons during various oropharyngeal behaviors. Respiratory physiology & neurobiology 147, 159-176.

Ghosh, S., Hoselton, S.A., Dorsam, G.P., Schuh, J.M., 2013. Eosinophils in fungus-associated allergic pulmonary disease. Frontiers in pharmacology 4, 8.

Gibson, P.G., 2004. Cough is an airway itch? American journal of respiratory and critical care medicine 169, 1-2.

Gibson, P.G., Dolovich, J., Denburg, J., Ramsdale, E.H., Hargreave, F.E., 1989. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma. Lancet 1, 1346-1348.

Gibson, P.G., Zlatic, K., Scott, J., Sewell, W., Woolley, K., Saltos, N., 1998. Chronic cough resembles asthma with IL-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene expression in bronchoalveolar cells. The Journal of allergy and clinical immunology 101, 320-326.

GINA, (2016). www.ginaasthma.com

Grace, M., Birrell, M.A., Dubuis, E., Maher, S.A., Belvisi, M.G., 2012. Transient receptor potential channels mediate the tussive response to prostaglandin E2 and bradykinin. Thorax 67, 891-900.

Grace, M.S., Dubuis, E., Birrell, M.A., Belvisi, M.G., 2013. Pre-clinical studies in cough research: role of Transient Receptor Potential (TRP) channels. Pulmonary pharmacology & therapeutics 26, 498-507.

Green, J.F., Schertel, E.R., Coleridge, H.M., Coleridge, J.C., 1986. Effect of pulmonary arterial PCO2 on slowly adapting pulmonary stretch receptors. J Appl Physiol 60, 2048-2055.

Groneberg, D.A., Niimi, A., Dinh, Q.T., Cosio, B., Hew, M., Fischer, A., Chung, K.F., 2004. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. American journal of respiratory and critical care medicine 170, 1276-1280.

Gu, Q., Wiggers, M.E., Gleich, G.J., Lee, L.Y., 2008. Sensitization of isolated rat vagal pulmonary sensory neurons by eosinophil-derived cationic proteins. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 294, L544-552.

Haji, A., Kimura, S., Ohi, Y., 2013. A model of the central regulatory system for cough reflex. Biological & pharmaceutical bulletin 36, 501-508.

Haldar, P., Brightling, C.E., Hargadon, B., Gupta, S., Monteiro, W., Sousa, A., Marshall, R.P., Bradding, P., Green, R.H., Wardlaw, A.J., Pavord, I.D., 2009. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. The New England journal of medicine 360, 973-984.

Hallstrand, T.S., 2012. New insights into pathogenesis of exercise-induced bronchoconstriction. Current opinion in allergy and clinical immunology 12, 42-48.

Hallstrand, T.S., Henderson, W.R., Jr., 2009. Role of leukotrienes in exercise-induced bronchoconstriction. Current allergy and asthma reports 9, 18-25.

Hallstrand, T.S., Moody, M.W., Wurfel, M.M., Schwartz, L.B., Henderson, W.R., Jr., Aitken, M.L., 2005. Inflammatory basis of exercise-induced bronchoconstriction. American journal of respiratory and critical care medicine 172, 679-686.

Hanacek, J., Davies, A., Widdicombe, J.G., 1984. Influence of lung stretch receptors on the cough reflex in rabbits. Respiration; international review of thoracic diseases 45, 161-168.

Hanacek, J., Tatar, M., Widdicombe, J., 2006. Regulation of cough by secondary sensory inputs. Respiratory physiology & neurobiology 152, 282-297.

Haouzi, P., Chenuel, B., 2005. Control of arterial PCO2 by somatic afferents in sheep. The Journal of physiology 569, 975-987.

Hara, J., Fujimura, M., Myou, S., Oribe, Y., Furusho, S., Kita, T., Katayama, N., Abo, M., Ohkura, N., Herai, Y., Hori, A., Ishiura, Y., Nobata, K., Ogawa, H., Yasui, M., Kasahara, K., Nakao, S., 2005. Comparison of cough reflex sensitivity after an inhaled antigen challenge between actively and passively sensitized guinea pigs. Cough 1, 6.

Haxhiu, M.A., Chavez, J.C., Pichiule, P., Erokwu, B., Dreshaj, I.A., 2000. The excitatory amino acid glutamate mediates reflexly increased tracheal blood flow and airway submucosal gland secretion. Brain research 883, 77-86.

Haxhiu, M.A., Erokwu, B., Dreshaj, I.A., 1997. The role of excitatory amino acids in airway reflex responses in anesthetized dogs. Journal of the autonomic nervous system 67, 192-199.

Helenius, I.J., Tikkanen, H.O., Haahtela, T., 1997. Association between type of training and risk of asthma in elite athletes. Thorax 52, 157-160.

Herd, C.M., Donigi-Gale, D., Shoupe, T.S., Burroughs, D.A., Yeadon, M., Page, C.P., 1994. Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor and leukotriene antagonist (PF 5901) on antigen-induced airway responses in neonatally immunized rabbits. British journal of pharmacology 112, 292-298.

Herd, C.M., Gozzard, N., Page, C.P., 1995. Capsaicin pre-treatment prevents the development of antigen-induced airway hyperresponsiveness in neonatally immunised rabbits. European journal of pharmacology 282, 111-119.

Hermine, O., Lortholary, O., Leventhal, P.S., Catteau, A., Soppelsa, F., Baude, C., Cohen-Akenine, A., Palmerini, F., Hanssens, K., Yang, Y., Sobol, H., Fraytag, S., Ghez, D., Suarez, F., Barete, S., Casassus, P., Sans, B., Arock, M., Kinet, J.P., Dubreuil, P., Moussy, A., 2008. Case-control cohort study of patients' perceptions of disability in mastocytosis. PloS one 3, e2266.

Hilaire, G., Duron, B., 1999. Maturation of the mammalian respiratory system. Physiological reviews 79, 325-360.

Ho, C.Y., Gu, Q., Lin, Y.S., Lee, L.Y., 2001. Sensitivity of vagal afferent endings to chemical irritants in the rat lung. Respiration physiology 127, 113-124.

Hoffman-Goetz, L., Pedersen, B.K., 1994. Exercise and the immune system: a model of the stress response? Immunology today 15, 382-387.

House, A., Celly, C., Skeans, S., Lamca, J., Egan, R.W., Hey, J.A., Chapman, R.W., 2004. Cough reflex in allergic dogs. European journal of pharmacology 492, 251-258.

Hunter, D.D., Undem, B.J., 1999. Identification and substance P content of vagal afferent neurons innervating the epithelium of the guinea pig trachea. American journal of respiratory and critical care medicine 159, 1943-1948.

Ioan, I., Demoulin, B., Duvivier, C., Leblanc, A.L., Bonabel, C., Marchal, F., Schweitzer, C., Varechova, S., 2014. Frequency dependence of capnography in anesthetized rabbits. Respiratory Physiology&Neurobiology 190, 14-19

Irwin, R.S., Boulet, L.P., Cloutier, M.M., Fuller, R., Gold, P.M., Hoffstein, V., Ing, A.J., McCool, F.D., O'Byrne, P., Poe, R.H., Prakash, U.B., Pratter, M.R., Rubin, B.K., 1998. Managing cough as a defense mechanism and as a symptom. A consensus panel report of the American College of Chest Physicians. Chest 114, 133S-181S.

Jackson, D.M., 1988. The effect of nedocromil sodium, sodium cromoglycate and codeine phosphate on citric acid-induced cough in dogs. British journal of pharmacology 93, 609-612.

Janson, C., Chinn, S., Jarvis, D., Burney, P., 2001. Determinants of cough in young adults participating in the European Community Respiratory Health Survey. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 18, 647-654.

Javorka, K., Kulisek, V., Calkovska, A., 1994. Defensive reflexes of the respiratory system in anaesthetized rabbits during high frequency jet ventilation. Experimental physiology 79, 967-973.

Jia, Y., McLeod, R.L., Wang, X., Parra, L.E., Egan, R.W., Hey, J.A., 2002. Anandamide induces cough in conscious guinea-pigs through VR1 receptors. British journal of pharmacology 137, 831-836.

Jiang, C., Lipski, J., 1990. Extensive monosynaptic inhibition of ventral respiratory group neurons by augmenting neurons in the Botzinger complex in the cat. Experimental brain research 81, 639-648.

Joad, J.P., Sekizawa, S., Chen, C.Y., Bonham, A.C., 2007. Air pollutants and cough. Pulmonary pharmacology & therapeutics 20, 347-354.

Kahan, E.S., Martin, U.J., Spungen, S., Ciccolella, D., Criner, G.J., 2007. Chronic cough and dyspnea in ice hockey players after an acute exposure to combustion products of a faulty ice resurfacer. Lung 185, 47-54.

Kalia, M., Richter, D., 1985a. Morphology of physiologically identified slowly adapting lung stretch receptor afferents stained with intra-axonal horseradish peroxidase in the nucleus of the tractus solitarius of the cat. I. A light microscopic analysis. The Journal of comparative neurology 241, 503-520.

Kalia, M., Richter, D., 1985b. Morphology of physiologically identified slowly adapting lung stretch receptor afferents stained with intra-axonal horseradish peroxidase in the nucleus of the tractus solitarius of the cat. II. An ultrastructural analysis. The Journal of comparative neurology 241, 521-535.

Kamaruzaman, N.A., Kardia, E., Kamaldin, N., Latahir, A.Z., Yahaya, B.H., 2013. The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy. BioMed research international 2013, 691830.

Karlsson, J.A., Fuller, R.W., 1999. Pharmacological regulation of the cough reflex--from experimental models to antitussive effects in Man. Pulmonary pharmacology & therapeutics 12, 215-228.

Karlsson, J.A., Persson, C.G., 1989. Novel peripheral neurotransmitters and control of the airways. Pharmacology & therapeutics 43, 397-423.

Karlsson, J.A., Sant'Ambrogio, G., Widdicombe, J., 1988. Afferent neural pathways in cough and reflex bronchoconstriction. J Appl Physiol (1985) 65, 1007-1023.

Katsumata, U., Sekizawa, K., Inoue, H., Sasaki, H., Takishima, T., 1989. Inhibitory actions of procaterol, a beta-2 stimulant, on substance P-induced cough in normal subjects during upper respiratory tract infection. The Tohoku journal of experimental medicine 158, 105-106.

Kauffmann, F., Varraso, R., 2011. The epidemiology of cough. Pulmonary pharmacology & therapeutics 24, 289-294.

Kay, A.B., 2001. Allergy and allergic diseases. First of two parts. The New England journal of medicine 344, 30-37.

Keir, S., Page, C., 2008. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. Pulmonary pharmacology & therapeutics 21, 721-730.

Kennedy, M.D., Davidson, W.J., Wong, L.E., Traves, S.L., Leigh, R., Eves, N.D., 2015. Airway inflammation, cough and athlete quality of life in elite female cross-country skiers: A longitudinal study. Scandinavian journal of medicine & science in sports.

Khalid, S., Murdoch, R., Newlands, A., Smart, K., Kelsall, A., Holt, K., Dockry, R., Woodcock, A., Smith, J.A., 2014. Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonism in

patients with refractory chronic cough: a double-blind randomized controlled trial. The Journal of allergy and clinical immunology 134, 56-62.

Kingham, P.J., Costello, R.W., McLean, W.G., 2003. Eosinophil and airway nerve interactions. Pulmonary pharmacology & therapeutics 16, 9-13.

Kingham, P.J., McLean, W.G., Sawatzky, D.A., Walsh, M.T., Costello, R.W., 2002. Adhesion-dependent interactions between eosinophils and cholinergic nerves. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 282, L1229-1238.

Knudson, R.J., Mead, J., Knudson, D.E., 1974. Contribution of airway collapse to supramaximal expiratory flows. J Appl Physiol 36, 653-667.

Kodesh, E., Nesher, N., Simaan, A., Hochner, B., Beeri, R., Gilon, D., Stern, M.D., Gerstenblith, G., Horowitz, M., 2011a. Heat acclimation and exercise training interact when combined in an overriding and trade-off manner: physiologic-genomic linkage. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 301, R1786-1797.

Kodesh, E., Zaldivar, F., Schwindt, C., Tran, P., Yu, A., Camilon, M., Nance, D.M., Leu, S.Y., Cooper, D., Adams, G.R., 2011b. A rat model of exercise-induced asthma: a nonspecific response to a specific immunogen. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 300, R917-924.

Kollarik, M., Dinh, Q.T., Fischer, A., Undem, B.J., 2003. Capsaicin-sensitive and -insensitive vagal bronchopulmonary C-fibres in the mouse. The Journal of physiology 551, 869-879.

Kondo, T., Kobayashi, I., Hayama, N., Ohta, Y., 1998. An increase in the threshold of citric acid-induced cough during chest wall vibration in healthy humans. The Japanese journal of physiology 48, 341-345.

Korpas, J., 1972. Expiration reflex from the vocal folds. Physiologia Bohemoslovaca 21, 671-675.

Korpas, J., Kalocsayova, G., 1973. Mechanoreception of the cat respiratory tract on the first days of postnatal life. Physiologia Bohemoslovaca 22, 365-373.

Koskela, H.O., Purokivi, M.K., Kontra, K.M., Taivainen, A.H., Tukiainen, H.O., 2008. Hypertonic saline cough provocation test with salbutamol pre-treatment: evidence for sensorineural dysfunction in asthma. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 38, 1100-1107.

Kowal, K., Bodzenta-Lukaszyk, A., Zukowski, S., 2009. Exhaled nitric oxide in evaluation of young adults with chronic cough. The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma 46, 692-698.

Kubin, L., Alheid, G.F., Zuperku, E.J., McCrimmon, D.R., 2006. Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. J Appl Physiol 101, 618-627.

Kubin, L., Kimura, H., Davies, R.O., 1991. The medullary projections of afferent bronchopulmonary C fibres in the cat as shown by antidromic mapping. The Journal of physiology 435, 207-228.

Kummer, W., Fischer, A., Kurkowski, R., Heym, C., 1992. The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. Neuroscience 49, 715-737.

Kwong, K., Carr, M.J., Gibbard, A., Savage, T.J., Singh, K., Jing, J., Meeker, S., Undem, B.J., 2008. Voltage-gated sodium channels in nociceptive versus non-nociceptive nodose vagal sensory neurons innervating guinea pig lungs. The Journal of physiology 586, 1321-1336.

Kwong, K., Lee, L.Y., 2005. Prostaglandin E2 potentiates a TTX-resistant sodium current in rat capsaicin-sensitive vagal pulmonary sensory neurones. The Journal of physiology 564, 437-450.

Lalloo, U.G., Fox, A.J., Belvisi, M.G., Chung, K.F., Barnes, P.J., 1995. Capsazepine inhibits cough induced by capsaicin and citric acid but not by hypertonic saline in guinea pigs. J Appl Physiol 79, 1082-1087.

Lamb, J.P., Sparrow, M.P., 2002. Three-dimensional mapping of sensory innervation with substance p in porcine bronchial mucosa: comparison with human airways. American journal of respiratory and critical care medicine 166, 1269-1281.

Lambrecht, B.N., Hammad, H., 2015. The immunology of asthma. Nature immunology 16, 45-56.

Langdeau, J.B., Turcotte, H., Bowie, D.M., Jobin, J., Desgagne, P., Boulet, L.P., 2000. Airway hyperresponsiveness in elite athletes. American journal of respiratory and critical care medicine 161, 1479-1484.

Larsson, K., Tornling, G., Gavhed, D., Muller-Suur, C., Palmberg, L., 1998. Inhalation of cold air increases the number of inflammatory cells in the lungs in healthy subjects. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 12, 825-830.

Laude, E.A., Higgins, K.S., Morice, A.H., 1993. A comparative study of the effects of citric acid, capsaicin and resiniferatoxin on the cough challenge in guinea-pig and man. Pulmonary pharmacology 6, 171-175.

Lavietes, M.H., Smeltzer, S.C., Cook, S.D., Modak, R.M., Smaldone, G.C., 1998. Airway dynamics, oesophageal pressure and cough. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 11, 156-161.

Lavorini, F., Fontana, G.A., Chellini, E., Magni, C., Duranti, R., Widdicombe, J., 2010. Desensitization of the cough reflex by exercise and voluntary isocapnic hyperpnea. J Appl Physiol (1985) 108, 1061-1068.

Lavorini, F., Fontana, G.A., Chellini, E., Magni, C., Pistolesi, M., Widdicombe, J., 2011. Respiratory expulsive efforts evoked by maximal lung emptying. Chest 140, 690-696.

Leckie, M.J., ten Brinke, A., Khan, J., Diamant, Z., O'Connor, B.J., Walls, C.M., Mathur, A.K., Cowley, H.C., Chung, K.F., Djukanovic, R., Hansel, T.T., Holgate, S.T., Sterk, P.J., Barnes, P.J., 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. Lancet 356, 2144-2148.

Lee, L.Y., Gu, Q., Gleich, G.J., 2001. Effects of human eosinophil granule-derived cationic proteins on C-fiber afferents in the rat lung. J Appl Physiol (1985) 91, 1318-1326.

Lee, L.Y., Morton, R.F., 1993. Histamine enhances vagal pulmonary C-fiber responses to capsaicin and lung inflation. Respiration physiology 93, 83-96.

Lee, L.Y., Pisarri, T.E., 2001. Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. Respiration physiology 125, 47-65.

Lee, S.Y., Kim, M.K., Shin, C., Shim, J.J., Kim, H.K., Kang, K.H., Yoo, S.H., In, K.H., 2003. Substance P-immunoreactive nerves in endobronchial biopsies in cough-variant asthma and classic asthma. Respiration; international review of thoracic diseases 70, 49-53.

Leung, S.Y., Niimi, A., Williams, A.S., Nath, P., Blanc, F.X., Dinh, Q.T., Chung, K.F., 2007. Inhibition of citric acid- and capsaicin-induced cough by novel TRPV-1 antagonist, V112220, in guinea-pig. Cough 3, 10.

Levesque, B., Duchesne, J.F., Gingras, S., Lavoie, R., Prud'Homme, D., Bernard, E., Boulet, L.P., Ernst, P., 2006. The determinants of prevalence of health complaints among young competitive swimmers. International archives of occupational and environmental health 80, 32-39.

Li-Weber, M., Krammer, P.H., 2003. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. Nature reviews. Immunology 3, 534-543.

Lin, R.L., Gu, Q., Lin, Y.S., Lee, L.Y., 2005. Stimulatory effect of CO2 on vagal bronchopulmonary C-fiber afferents during airway inflammation. J Appl Physiol 99, 1704-1711.

Lipski, J., Ezure, K., Wong She, R.B., 1991. Identification of neurons receiving input from pulmonary rapidly adapting receptors in the cat. The Journal of physiology 443, 55-77.

Liu, Q., Fujimura, M., Tachibana, H., Myou, S., Kasahara, K., Yasui, M., 2001. Characterization of increased cough sensitivity after antigen challenge in guinea pigs. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 31, 474-484.

Ma, A., Bravo, M., Kappagoda, C.T., 2003. Responses of bronchial C-fiber afferents of the rabbit to changes in lung compliance. Respiratory physiology & neurobiology 138, 155-163.

Macklem, P.T., Wilson, N.J., 1965. Measurement of intrabronchial pressure in man. J Appl Physiol 20, 653-663.

Magni, C., Chellini, E., Zanasi, A., 2010. Cough variant asthma and atopic cough. Multidisciplinary respiratory medicine 5, 99-103.

Maher, S.A., Birrell, M.A., Belvisi, M.G., 2009. Prostaglandin E2 mediates cough via the EP3 receptor: implications for future disease therapy. American journal of respiratory and critical care medicine 180, 923-928.

Marchal, F., Demoulin, B., Schweitzer, C., Leblanc, A.L., Bertin, N., 2008a. Airway response to induced muscular contraction in spontaneously breathing rabbits. Respiratory physiology & neurobiology 160, 224-231.

Marchal, F., Schweitzer, C., Werts, F., Vu, L.T., DeMoulin, B., Nguyen, Y.T., 2008b. Post-exercise airway narrowing in healthy primary school children. Pediatric research 63, 328-331.

Marsh, W.R., Irvin, C.G., Murphy, K.R., Behrens, B.L., Larsen, G.L., 1985. Increases in airway reactivity to histamine and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. The American review of respiratory disease 131, 875-879.

Matsumoto, H., Niimi, A., Tabuena, R.P., Takemura, M., Ueda, T., Yamaguchi, M., Matsuoka, H., Jinnai, M., Chin, K., Mishima, M., 2007. Airway wall thickening in patients with cough variant asthma and nonasthmatic chronic cough. Chest 131, 1042-1049.

Matsuoka, H., Niimi, A., Matsumoto, H., Takemura, M., Ueda, T., Yamaguchi, M., Jinnai, M., Inoue, H., Ito, I., Chin, K., Mishima, M., 2010. Inflammatory subtypes in cough-variant asthma: association with maintenance doses of inhaled corticosteroids. Chest 138, 1418-1425.

Mazzone, S.B., Canning, B.J., 2002. Synergistic interactions between airway afferent nerve subtypes mediating reflex bronchospasm in guinea pigs. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 283, R86-98.

Mazzone, S.B., Cole, L.J., Ando, A., Egan, G.F., Farrell, M.J., 2011a. Investigation of the neural control of cough and cough suppression in humans using functional brain imaging. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31, 2948-2958.

Mazzone, S.B., McGovern, A.E., Cole, L.J., Farrell, M.J., 2011b. Central nervous system control of cough: pharmacological implications. Current opinion in pharmacology 11, 265-271.

Mazzone, S.B., McLennan, L., McGovern, A.E., Egan, G.F., Farrell, M.J., 2007. Representation of capsaicin-evoked urge-to-cough in the human brain using functional magnetic resonance imaging. American journal of respiratory and critical care medicine 176, 327-332.

Mazzone, S.B., Mori, N., Canning, B.J., 2005. Synergistic interactions between airway afferent nerve subtypes regulating the cough reflex in guinea-pigs. The Journal of physiology 569, 559-573.

McAlexander, M.A., Myers, A.C., Undem, B.J., 1999. Adaptation of guinea-pig vagal airway afferent neurones to mechanical stimulation. The Journal of physiology 521 Pt 1, 239-247.

McDonald, D.M., Mitchell, R.A., Gabella, G., Haskell, A., 1988. Neurogenic inflammation in the rat trachea. II. Identity and distribution of nerves mediating the increase in vascular permeability. Journal of neurocytology 17, 605-628.

McFadden, E.R., Jr., Lenner, K.A., Strohl, K.P., 1986. Postexertional airway rewarming and thermally induced asthma. New insights into pathophysiology and possible pathogenesis. The Journal of clinical investigation 78, 18-25.

McGarvey, L., McKeagney, P., Polley, L., MacMahon, J., Costello, R.W., 2009. Are there clinical features of a sensitized cough reflex? Pulmonary pharmacology & therapeutics 22, 59-64.

McGovern, A.E., Davis-Poynter, N., Farrell, M.J., Mazzone, S.B., 2012. Transneuronal tracing of airways-related sensory circuitry using herpes simplex virus 1, strain H129. Neuroscience 207, 148-166.

Metzger, W.J., Richerson, H.B., Worden, K., Monick, M., Hunninghake, G.W., 1986. Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen bronchoprovocation. Chest 89, 477-483.

Migueres, M., Fontaine, J.F., Haddad, T., Grosclaude, M., Saint-Martin, F., Bem David, D., Crestani, B., 2011. Characteristics of patients with respiratory allergy in France and factors influencing immunotherapy prescription: a prospective observational study (REALIS). International journal of immunopathology and pharmacology 24, 387-400.

Millqvist, E., 2015. TRP channels and temperature in airway disease-clinical significance. Temperature 2, 172-177.

Millqvist, E., Ternesten-Hasseus, E., Bende, M., 2013. Inhalation of menthol reduces capsaicin cough sensitivity and influences inspiratory flows in chronic cough. Respiratory medicine 107, 433-438.

Millqvist, E., Ternesten-Hasseus, E., Stahl, A., Bende, M., 2005. Changes in levels of nerve growth factor in nasal secretions after capsaicin inhalation in patients with airway symptoms from scents and chemicals. Environmental health perspectives 113, 849-852.

Mills, J.E., Sellick, H., Widdicombe, J.G., 1969. Activity of lung irritant receptors in pulmonary microembolism, anaphylaxis and drug-induced bronchoconstrictions. The Journal of physiology 203, 337-357.

Minoguchi, H., Minoguchi, K., Tanaka, A., Matsuo, H., Kihara, N., Adachi, M., 2003. Cough receptor sensitivity to capsaicin does not change after allergen bronchoprovocation in allergic asthma. Thorax 58, 19-22.

Minshall, E.M., Riccio, M.M., Herd, C.M., Douglas, G.J., Seeds, E.A., McKenniff, M.G., Sasaki, M., Spina, D., Page, C.P., 1993. A novel animal model for investigating persistent airway hyperresponsiveness. Journal of pharmacological and toxicological methods 30, 177-188.

Mohammed, S.P., Higenbottam, T.W., Adcock, J.J., 1993. Effects of aerosol-applied capsaicin, histamine and prostaglandin E2 on airway sensory receptors of anaesthetized cats. The Journal of physiology 469, 51-66.

Morice, A.H., Fontana, G.A., Belvisi, M.G., Birring, S.S., Chung, K.F., Dicpinigaitis, P.V., Kastelik, J.A., McGarvey, L.P., Smith, J.A., Tatar, M., Widdicombe, J., European Respiratory, S., 2007. ERS guidelines on the assessment of cough. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 29, 1256-1276.

Morice, A.H., Higgins, K.S., Yeo, W.W., 1992. Adaptation of cough reflex with different types of stimulation. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 5, 841-847.

Morice, A.H., McGarvey, L., Pavord, I., British Thoracic Society Cough Guideline, G., 2006. Recommendations for the management of cough in adults. Thorax 61 Suppl 1, i1-24.

Morici, G., Bonsignore, M.R., Zangla, D., Riccobono, L., Profita, M., Bonanno, A., Paterno, A., Di Giorgi, R., Mirabella, F., Chimenti, L., Benigno, A., Vignola, A.M., Bellia, V., Amato, G., Bonsignore, G., 2004. Airway cell composition at rest and after an all-out test in competitive rowers. Medicine and science in sports and exercise 36, 1723-1729.

Morris, K.F., Baekey, D.M., Nuding, S.C., Dick, T.E., Shannon, R., Lindsey, B.G., 2003. Invited review: Neural network plasticity in respiratory control. J Appl Physiol (1985) 94, 1242-1252.

Mutolo, D., Cinelli, E., Iovino, L., Pantaleo, T., Bongianni, F., 2016a. Downregulation of the cough reflex by aclidinium and tiotropium in awake and anesthetized rabbits. Pulmonary pharmacology & therapeutics.

Mutolo, D., Cinelli, E., Iovino, L., Pantaleo, T., Bongianni, F., 2016b. Downregulation of the cough reflex by aclidinium and tiotropium in awake and anesthetized rabbits. Pulmonary pharmacology & therapeutics 38, 1-9.

Myers, A.C., Kajekar, R., Undem, B.J., 2002. Allergic inflammation-induced neuropeptide production in rapidly adapting afferent nerves in guinea pig airways. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 282, L775-781.

Narula, M., McGovern, A.E., Yang, S.K., Farrell, M.J., Mazzone, S.B., 2014. Afferent neural pathways mediating cough in animals and humans. Journal of thoracic disease 6, S712-719.

Niimi, A., 2011a. Cough and Asthma. Current respiratory medicine reviews 7, 47-54.

Niimi, A., 2011b. Structural changes in the airways: cause or effect of chronic cough? Pulmonary pharmacology & therapeutics 24, 328-333.

Niimi, A., 2013. Cough, asthma, and cysteinyl-leukotrienes. Pulmonary pharmacology & therapeutics 26, 514-519.

Niimi, A., Amitani, R., Suzuki, K., Tanaka, E., Murayama, T., Kuze, F., 1998. Eosinophilic inflammation in cough variant asthma. The European respiratory journal 11, 1064-1069.

Niimi, A., Brightling, C.E., Dicpinigaitis, P.V., 2014. Cough in asthma is due to eosinophilic airway inflammation: a pro/con debate. Lung 192, 33-38.

Niimi, A., Matsumoto, H., Minakuchi, M., Kitaichi, M., Amitani, R., 2000. Airway remodelling in cough-variant asthma. Lancet 356, 564-565.

Niimi, A., Matsumoto, H., Mishima, M., 2009. Eosinophilic airway disorders associated with chronic cough. Pulmonary pharmacology & therapeutics 22, 114-120.

Niimi, A., Nguyen, L.T., Usmani, O., Mann, B., Chung, K.F., 2004. Reduced pH and chloride levels in exhaled breath condensate of patients with chronic cough. Thorax 59, 608-612.

Niimi, A., Torrego, A., Nicholson, A.G., Cosio, B.G., Oates, T.B., Chung, K.F., 2005. Nature of airway inflammation and remodeling in chronic cough. The Journal of allergy and clinical immunology 116, 565-570.

Nishino, T., Tagaito, Y., Isono, S., 1996. Cough and other reflexes on irritation of airway mucosa in man. Pulmonary pharmacology 9, 285-292.

Numao, T., Agrawal, D.K., 1992. Neuropeptides modulate human eosinophil chemotaxis. Journal of immunology 149, 3309-3315.

O'Connell, F., Springall, D.R., Moradoghli-Haftvani, A., Krausz, T., Price, D., Fuller, R.W., Polak, J.M., Pride, N.B., 1995. Abnormal intraepithelial airway nerves in persistent unexplained cough? American journal of respiratory and critical care medicine 152, 2068-2075.

Oh, M.J., Lee, J.Y., Lee, B.J., Choi, D.C., 2008. Exhaled nitric oxide measurement is useful for the exclusion of nonasthmatic eosinophilic bronchitis in patients with chronic cough. Chest 134, 990-995.

Ohi, Y., Yamazaki, H., Takeda, R., Haji, A., 2004. Phrenic and iliohypogastric nerve discharges during tussigenic stimulation in paralyzed and decerebrate guinea pigs and rats. Brain research 1021, 119-127.

Olgiati, R., Birch, S., Rao, A., Wanner, A., 1981. Differential effects of methacholine and antigen challenge on gas exchange in allergic subjects. The Journal of allergy and clinical immunology 67, 325-329.

Ono, K., Shiba, K., Nakazawa, K., Shimoyama, I., 2006. Synaptic origin of the respiratory-modulated activity of laryngeal motoneurons. Neuroscience 140, 1079-1088.

Otsuka, K., Niimi, A., Matsumoto, H., Ito, I., Yamaguchi, M., Matsuoka, H., Jinnai, M., Oguma, T., Takeda, T., Nakaji, H., Chin, K., Sasaki, K., Aoyama, N., Mishima, M., 2011. Plasma substance P levels in patients with persistent cough. Respiration; international review of thoracic diseases 82, 431-438.

Pack, A.I., DeLaney, R.G., 1983. Response of pulmonary rapidly adapting receptors during lung inflation. Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology 55, 955-963.

Paintal, A.S., 1969. Mechanism of stimulation of type J pulmonary receptors. The Journal of physiology 203, 511-532.

Patterson, R.N., Johnston, B.T., Ardill, J.E., Heaney, L.G., McGarvey, L.P., 2007. Increased tachykinin levels in induced sputum from asthmatic and cough patients with acid reflux. Thorax 62, 491-495.

Pauwels, R., Van Renterghem, D., Van der Straeten, M., Johannesson, N., Persson, C.G., 1985. The effect of theophylline and enprofylline on allergen-induced bronchoconstriction. The Journal of allergy and clinical immunology 76, 583-590.

Pedersen, K.E., Meeker, S.N., Riccio, M.M., Undem, B.J., 1998. Selective stimulation of jugular ganglion afferent neurons in guinea pig airways by hypertonic saline. J Appl Physiol (1985) 84, 499-506.

Petak, F., Hantos, Z., Adamicza, A., Gality, H., Habre, W., 2006. Development of bronchoconstriction after administration of muscle relaxants in rabbits with normal or hyperreactive airways. Anesthesia and analgesia 103, 103-109, table of contents.

Pickering, M., Jones, J.F., 2002. The diaphragm: two physiological muscles in one. Journal of anatomy 201, 305-312.

Piliponsky, A.M., Gleich, G.J., Nagler, A., Bar, I., Levi-Schaffer, F., 2003. Non-IgE-dependent activation of human lung- and cord blood-derived mast cells is induced by eosinophil major basic protein and modulated by the membrane form of stem cell factor. Blood 101, 1898-1904.

Pin, I., Freitag, A.P., O'Byrne, P.M., Girgis-Gabardo, A., Watson, R.M., Dolovich, J., Denburg, J.A., Hargreave, F.E., 1992. Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. The American review of respiratory disease 145, 1265-1269.

Pinckard, R.N., Halonen, M., Palmer, J.D., Butler, C., Shaw, J.O., Henson, P.M., 1977. Intravascular aggregation and pulmonary sequestration of platelets during IgE-induced systemic anaphylaxis in the rabbit: abrogation of lethal anaphylactic shock by platelet depletion. J Immunol 119, 2185-2193.

Piper, P., Vane, J., 1971. The release of prostaglandins from lung and other tissues. Annals of the New York Academy of Sciences 180, 363-385.

Plevkova, J., Antosiewicz, J., Varechova, S., Poliacek, I., Jakus, J., Tatar, M., Pokorski, M., 2009. Convergence of nasal and tracheal neural pathways in modulating the cough response in guinea pigs. Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society 60, 89-93.

Pliss, L.B., Ingenito, E.P., Ingram, R.H., Jr., Pichurko, B., 1990. Assessment of bronchoalveolar cell and mediator response to isocapnic hyperpnea in asthma. The American review of respiratory disease 142, 73-78.

Poliacek, I., Corrie, L.W., Wang, C., Rose, M.J., Bolser, D.C., 2007. Microinjection of DLH into the region of the caudal ventral respiratory column in the cat: evidence for an endogenous cough-suppressant mechanism. J Appl Physiol (1985) 102, 1014-1021.

Poliacek, I., Simera, M., Veternik, M., Machac, P., Barani, H., Visnovcova, N., Halasova, E., Jakus, J., 2012. Contribution of medullary raphe to control of coughing--codeine trials in cat. Respiratory physiology & neurobiology 184, 106-112.

Poliacek, I., Stransky, A., Jakus, J., Barani, H., Tomori, Z., Halasova, E., 2003. Activity of the laryngeal abductor and adductor muscles during cough, expiration and aspiration reflexes in cats. Physiological research 52, 749-762.

Poussel, M., Bosser, G., Varechova, S., Demoulin, B., Chalon, B., Ruckebusch, O., Tiotiu, A., Renaud, P., Schweitzer, C., Chenuel, B., 2014. Desensitization of the cough reflex during limb muscle contraction in anesthetized rabbits. Pulmonary pharmacology & therapeutics 27, 96-101.

Poussel, M., Varechova, S., Demoulin, B., Chalon, B., Schweitzer, C., Marchal, F., Chenuel, B., 2012. Nasal stimulation by water down-regulates cough in anesthetized rabbits. Respiratory physiology & neurobiology 183, 20-25.

Preti, D., Szallasi, A., Patacchini, R., 2012. TRP channels as therapeutic targets in airway disorders: a patent review. Expert opinion on therapeutic patents 22, 663-695.

Raj, H., Singh, V.K., Anand, A., Paintal, A.S., 1995. Sensory origin of lobeline-induced sensations: a correlative study in man and cat. The Journal of physiology 482 (Pt 1), 235-246.

Repke, H., Piotrowski, W., Bienert, M., Foreman, J.C., 1987. Histamine release induced by Arg-Pro-Lys-Pro(CH2)11CH3 from rat peritoneal mast cells. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 243, 317-321.

Ricco, M.M., Kummer, W., Biglari, B., Myers, A.C., Undem, B.J., 1996. Interganglionic segregation of distinct vagal afferent fibre phenotypes in guinea-pig airways. The Journal of physiology 496 (Pt 2), 521-530.

Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A.M., Corrigan, C., Durham, S.R., Kay, A.B., 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. The New England journal of medicine 326, 298-304.

Ross, B.B., Gramiak, R., Rahn, H., 1955. Physical dynamics of the cough mechanism. J Appl Physiol 8, 264-268.

Ryan, N.M., Birring, S.S., Gibson, P.G., 2012. Gabapentin for refractory chronic cough: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 380, 1583-1589.

Rytila, P., Metso, T., Petays, T., Sohlman, A., Tyolahti, H., Kohonen-Jalonen, P., Kiviniemi, P., Haahtela, T., 2002. Eosinophilic airway inflammation as an underlying mechanism of undiagnosed prolonged cough in primary healthcare patients. Respiratory medicine 96, 52-58.

Sant'Ambrogio, G., 1987a. Afferent nerves in reflex bronchoconstriction. Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire 23 Suppl 10, 81s-88s.

Sant'Ambrogio, G., 1987b. Afferent pathways for the cough reflex. Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire 23 Suppl 10, 19s-23s.

Sant'Ambrogio, G., 1987c. Nervous receptors of the tracheobronchial tree. Annual review of physiology 49, 611-627.

Sant'Ambrogio, G., Kuna, S.T., Vanoye, C.R., Sant'Ambrogio, F.B., 1997. Activation of intrinsic laryngeal muscles during cough. American journal of respiratory and critical care medicine 155, 637-641.

Schelegle, E.S., Gershwin, L.J., Miller, L.A., Fanucchi, M.V., Van Winkle, L.S., Gerriets, J.P., Walby, W.F., Omlor, A.M., Buckpitt, A.R., Tarkington, B.K., Wong, V.J., Joad, J.P., Pinkerton, K.B., Wu, R., Evans, M.J., Hyde, D.M., Plopper, C.G., 2001a. Allergic asthma induced in rhesus monkeys by house dust mite (Dermatophagoides farinae). The American journal of pathology 158, 333-341.

Schelegle, E.S., Green, J.F., 2001. An overview of the anatomy and physiology of slowly adapting pulmonary stretch receptors. Respiration physiology 125, 17-31.

Schelegle, E.S., Walby, W.F., Mansoor, J.K., Chen, A.T., 2001b. Lung vagal afferent activity in rats with bleomycin-induced lung fibrosis. Respiration physiology 126, 9-27.

Schweitzer, C., Demoulin, B., Bello, G., Bertin, N., Leblanc A.L., Marchal, F., 2006. Deep inhalation prevents the respiratory elastance response to methacholine in rats. Pediatric research 59, 646-649

Schweitzer, C., Demoulin, B., Varechova, S., Poussel, M., Marchal, F., 2011. Neural control of airway to deep inhalation in rabbits. Respiratory physiology & neurobiology 177, 169-175.

Sekizawa, S., Chen, C.Y., Bechtold, A.G., Tabor, J.M., Bric, J.M., Pinkerton, K.E., Joad, J.P., Bonham, A.C., 2008. Extended secondhand tobacco smoke exposure induces plasticity in nucleus tractus solitarius second-order lung afferent neurons in young guinea pigs. The European journal of neuroscience 28, 771-781.

Sekizawa, S., Joad, J.P., Pinkerton, K.E., Bonham, A.C., 2011. Distinct tachykinin NK(1) receptor function in primate nucleus tractus solitarius neurons is dysregulated after second-hand tobacco smoke exposure. British journal of pharmacology 163, 782-791.

Shampain, M.P., Behrens, B.L., Larsen, G.L., Henson, P.M., 1982. An animal model of late pulmonary responses to Alternaria challenge. The American review of respiratory disease 126, 493-498.

Shannon, R., Baekey, D.M., Morris, K.F., Li, Z., Lindsey, B.G., 2000. Functional connectivity among ventrolateral medullary respiratory neurones and responses during fictive cough in the cat. The Journal of physiology 525 Pt 1, 207-224.

Shannon, R., Baekey, D.M., Morris, K.F., Lindsey, B.G., 1996. Brainstem respiratory networks and cough. Pulmonary pharmacology 9, 343-347.

Shannon, R., Baekey, D.M., Morris, K.F., Lindsey, B.G., 1998. Ventrolateral medullary respiratory network and a model of cough motor pattern generation. J Appl Physiol (1985) 84, 2020-2035.

Shiba, K., Nakazawa, K., Ono, K., Umezaki, T., 2007. Multifunctional laryngeal premotor neurons: their activities during breathing, coughing, sneezing, and swallowing. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27, 5156-5162.

Sikand, P., Premkumar, L.S., 2007. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. The Journal of physiology 581, 631-647.

Singapuri, A., McKenna, S., Brightling, C.E., 2008. The utility of the mannitol challenge in the assessment of chronic cough: a pilot study. Cough 4, 10.

Skaper, S.D., Pollock, M., Facci, L., 2001. Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins. Brain research. Molecular brain research 97, 177-185.

Smith, A.D., Cowan, J.O., Brassett, K.P., Filsell, S., McLachlan, C., Monti-Sheehan, G., Peter Herbison, G., Robin Taylor, D., 2005. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. American journal of respiratory and critical care medicine 172, 453-459.

Smith, J.A., Woodcock, A., 2016. Chronic cough. The New England journal of medicine 375, 1544-1551.

Spector, S.L., Tan, R.A., 2004. Effectiveness of montelukast in the treatment of cough variant asthma. Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology 93, 232-236.

Spina, D., 2002. Airway nerves: neurotransmitter release. Current opinion in pharmacology 2, 283-285.

Spina, D., Ferlenga, P., Biasini, I., Moriggi, E., Marchini, F., Semeraro, C., Page, C.P., 1998. The effect duration of selective phosphodiesterase inhibitors in the guinea pig. Life sciences 62, 953-965.

Suarez, A.A., Pessolano, F.A., Monteiro, S.G., Ferreyra, G., Capria, M.E., Mesa, L., Dubrovsky, A., De Vito, E.L., 2002. Peak flow and peak cough flow in the evaluation of expiratory muscle weakness and bulbar impairment in patients with neuromuscular disease. American journal of physical medicine & rehabilitation 81, 506-511.

Tatar, M., Polacek, H., Pullmann, R., 1986. [Changes in protective reflexes in the respiratory tract during 5 hours of hypercapnia in conscious cats]. Bratislavske lekarske listy 85, 533-540.

Tatar, M., Sant'Ambrogio, G., Sant'Ambrogio, F.B., 1994. Laryngeal and tracheobronchial cough in anesthetized dogs. J Appl Physiol 76, 2672-2679.

Tatar, M., Webber, S.E., Widdicombe, J.G., 1988. Lung C-fibre receptor activation and defensive reflexes in anaesthetized cats. The Journal of physiology 402, 411-420.

Taylor-Clark, T.E., Kiros, F., Carr, M.J., McAlexander, M.A., 2009. Transient receptor potential ankyrin 1 mediates toluene diisocyanate-evoked respiratory irritation. American journal of respiratory cell and molecular biology 40, 756-762.

Tillie-Leblond, I., Godard, P., 2007. [Introduction for short texts from "La conference d'experts de la Societe de Pneumologie de Langue Francaise (SPLF) sur Asthme et Allergie"]. Revue des maladies respiratoires 24, 221-222.

Tomori, Z., Donic, V., Benacka, R., Gresova, S., Peregrim, I., Kundrik, M., Pallayova, M., Jakus, J., 2012. Reversal of functional disorders by aspiration, expiration, and cough reflexes and their voluntary counterparts. Frontiers in physiology 3, 467.

Tomori, Z., Widdicombe, J.G., 1969. Muscular, bronchomotor and cardiovascular reflexes elicited by mechanical stimulation of the respiratory tract. The Journal of physiology 200, 25-49.

Trevisani, M., Milan, A., Gatti, R., Zanasi, A., Harrison, S., Fontana, G., Morice, A.H., Geppetti, P., 2004. Antitussive activity of iodo-resiniferatoxin in guinea pigs. Thorax 59, 769-772.

Trivedi, S.G., Lloyd, C.M., 2007. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. Cellular and molecular life sciences : CMLS 64, 1269-1289.

Turcotte, H., Langdeau, J.B., Thibault, G., Boulet, L.P., 2003. Prevalence of respiratory symptoms in an athlete population. Respiratory medicine 97, 955-963.

Turmel, J., Bougault, V., Boulet, L.P., 2012. Seasonal variations of cough reflex sensitivity in elite athletes training in cold air environment. Cough 8, 2.

Turner, D.L., 1991. Cardiovascular and respiratory control mechanisms during exercise: an integrated view. The Journal of experimental biology 160, 309-340.

Undem, B.J., Chuaychoo, B., Lee, M.G., Weinreich, D., Myers, A.C., Kollarik, M., 2004. Subtypes of vagal afferent C-fibres in guinea-pig lungs. The Journal of physiology 556, 905-917.

Varechova, S., Demoulin, B., Poussel, M., Chenuel, B., Marchal, F., 2011. Cough threshold and reactivity to mechanical stimulation of the trachea in the rabbit preliminary observations. Bratislavske lekarske listy 112, 136-139.

Varechova, S., Poussel, M., Demoulin, B., Chenuel, B., Schweitzer, C., Marchal, F., 2010. Within breath ventilatory responses to mechanical tracheal stimulation in anaesthetised rabbits. Pulmonary pharmacology & therapeutics 23, 397-402.

Varechova, S., Poussel, M., Schweitzer, C., Demoulin, B., Chenuel, B., Marchal, F., 2012. Stimulus response latency of cough and expiration reflex depends on breathing in the rabbit. Pulmonary pharmacology & therapeutics 25, 242-247.

Verratti, V., 2009. Neuroimmune biology of physical exercise. Journal of biological regulators and homeostatic agents 23, 203-206.

Von, L., Isshiki, N., 1965. An Analysis of Cough at the Level of the Larynx. Arch Otolaryngol 81, 616-625.

Walker, J.A., Barlow, J.L., McKenzie, A.N., 2013. Innate lymphoid cells--how did we miss them? Nature reviews. Immunology 13, 75-87.

Wang, A.L., Blackford, T.L., Lee, L.Y., 1996. Vagal bronchopulmonary C-fibers and acute ventilatory response to inhaled irritants. Respiration physiology 104, 231-239.

Watanabe, N., Horie, S., Michael, G.J., Keir, S., Spina, D., Page, C.P., Priestley, J.V., 2006. Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system. Neuroscience 141, 1533-1543.

Weinfeld, D., Ternesten-Hasseus, E., Lowhagen, O., Millqvist, E., 2002. Capsaicin cough sensitivity in allergic asthmatic patients increases during the birch pollen season. Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology 89, 419-424.

Weinstock, J.V., Blum, A., Walder, J., Walder, R., 1988. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P. Journal of immunology 141, 961-966.

Widdicombe, J., 2001. Airway receptors. Respiration physiology 125, 3-15.

Widdicombe, J., 2002. Neuroregulation of cough: implications for drug therapy. Current opinion in pharmacology 2, 256-263.

Widdicombe, J., 2006. Réflexes from the lungs and airways: historical perspective. J Appl Physiol 101, 628-634.

Widdicombe, J., Fontana, G., 2006. Cough: what's in a name? The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 28, 10-15.

Widdicombe, J., Fontana, G., Gibson, P., 2009. Workshop--cough: exercise, speech and music. Pulmonary pharmacology & therapeutics 22, 143-147.

Widdicombe, J.G., 1954a. Receptors in the trachea and bronchi of the cat. The Journal of physiology 123, 71-104.

Widdicombe, J.G., 1954b. Respiratory réflexes excited by inflation of the lungs. The Journal of physiology 123, 105-115.

Widdicombe, J.G., 1954c. Respiratory réflexes from the trachea and bronchi of the cat. The Journal of physiology 123, 55-70.

Widdicombe, J.G., 1995. Neurophysiology of the cough reflex. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 8, 1193-1202.

Widdicombe, J.G., Kent, D.C., Nadel, J.A., 1962. Mechanism of bronchoconstriction during inhalation of dust. J Appl Physiol 17, 613-616.

Wolff, R.K., Dolovich, M.B., Obminski, G., Newhouse, M.T., 1977. Effects of exercise and eucapnic hyperventilation on bronchial clearance in man. Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology 43, 46-50.

Xing, H., Ling, J.X., Chen, M., Johnson, R.D., Tominaga, M., Wang, C.Y., Gu, J., 2008. TRPM8 mechanism of autonomic nerve response to cold in respiratory airway. Molecular pain 4, 22.

Xue, L., Salimi, M., Panse, I., Mjosberg, J.M., McKenzie, A.N., Spits, H., Klenerman, P., Ogg, G., 2014. Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. The Journal of allergy and clinical immunology 133, 1184-1194.

Yamamoto, Y., Ootsuka, T., Atoji, Y., Suzuki, Y., 1998. Morphological and quantitative study of the intrinsic nerve plexuses of the canine trachea as revealed by immunohistochemical staining of protein gene product 9.5. The Anatomical record 250, 438-447.

Yamamoto, Y., Sato, Y., Taniguchi, K., 2007. Distribution of TRPV1- and TRPV2-immunoreactive afferent nerve endings in rat trachea. Journal of anatomy 211, 775-783.

Yanagihara, N., Von Leden, H., Werner-Kukuk, E., 1966. The physical parameters of cough: the larynx in a normal single cough. Acta oto-laryngologica 61, 495-510.

Yang, X.D., Liu, Z., Liu, H.X., Wang, L.H., Ma, C.H., Li, Z.Z., 2007. Regulatory effect of nerve growth factor on release of substance P in cultured dorsal root ganglion neurons of rat. Neuroscience bulletin 23, 215-220.

Yu, J., Schultz, H.D., Goodman, J., Coleridge, J.C., Coleridge, H.M., Davis, B., 1989. Pulmonary rapidly adapting receptors reflexly increase airway secretion in dogs. J Appl Physiol 67, 682-687.

Yu, S., Kim, H.Y., Chang, Y.J., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., 2014. Innate lymphoid cells and asthma. The Journal of allergy and clinical immunology 133, 943-950; quiz 951.

Zhu, Z., Homer, R.J., Wang, Z., Chen, Q., Geba, G.P., Wang, J., Zhang, Y., Elias, J.A., 1999. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion,

subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. The Journal of clinical investigation 103, 779-788.

Zschauer, A.O., Sielczak, M.W., Wanner, A., 1999. Altered contractile sensitivity of isolated bronchial artery to phenylephrine in ovalbumin-sensitized rabbits. J Appl Physiol (1985) 86, 1721-1727.

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

Ce travail de thèse a fait l'objet d'une valorisation comprenant :

- Deux articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture :

"Desensitization of the cough reflex during limb muscle contraction in anesthetized rabbits"

Poussel M, Bosser G, Varechova S, Demoulin B, Chalon B, Ruckebusch O, **Tiotiu A**, Renaud P, Schweitzer C, Chenuel B
Pulm Pharmacol Ther. 2014 Feb; 27(1):96-101

"Lack of desensitization of the cough reflex in ovalbumin-sensitized rabbits during exercise"

Angelica Tiotiu, Bruno Chenuel, Laurent Foucaud, Bruno Demoulin, Silvia Demoulin-Alexikova, Christo Christov, Mathias Poussel
PlosOne 12(2): e0171862. doi:10.1371/journal. pone.0171862

- Une communication orale publiée et ayant reçu un prix :

Congrès de la Société Française de Physiologie et de la Société Européenne de Physiologie, Paris, 29/06/2016-1/07/2016

"Influence of ovalbumine sensitization on the down-regulation of cough during exercise in rabbits"

Angelica Tiotiu, Laurent Foucaud, Bruno Demoulin, Silvia Varechova, Bruno Chenuel, Mathias Poussel

Acta Physiol 2016, 217 (Suppl. 708), 3–158

Annexe 1

Pulmonary Pharmacology & Therapeutics xxx (2013) 1–6

Contents lists available at ScienceDirect

Pulmonary Pharmacology & Therapeutics

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

Desensitization of the cough reflex during limb muscle contraction in anesthetized rabbits

Mathias Poussel*, Gilles Bosser, Silvia Varechova, Bruno Demoulin, Bernard Chalon, Odile Ruckebusch, Angelica Tiotiu, Pierre Renaud, Cyril Schweitzer, Bruno Chenuel

EA 3450 DevAH – Development, Adaptation and Disadvantage, Cardiorespiratory regulations and motor control, Université de Lorraine, F-54505, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 February 2013
Received in revised form
10 July 2013
Accepted 15 July 2013

Keywords:
Cough
Expiration reflex
Mechanical stimulation
Muscle contraction
Rabbit

ABSTRACT

The 'cough network' exhibits plasticity at the sensor and integration levels leading to modulation of the strength or pattern of the cough reflex. Little is known about the interactions between cough and human activities, especially during exercise. The present study was designed to determine whether exercise, mimicked by electrically induced muscle contractions, can modify the incidence and/or strength of cough following mechanical stimulation of the trachea in anesthetized rabbits.

Thirteen anesthetized, tracheotomized rabbits were studied by a total of 311 tracheal stimulations: 196 at rest and 115 during exercise.

During muscle contractions, the incidence of the cough reflex (CR) decreased and the expiration reflex (ER) increased ($p < 0.0001$). The sensitivity of the CR and ER both decreased during exercise compared to the sensitivity of the CR at rest ($p < 0.02$), while the strength of the expulsive response remained unchanged.

These results indicate that adjustments occurring during muscle contractions likely downregulate tracheal defensive reflexes in anesthetized rabbits.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cough is one of the most common medical afflictions of mankind and has been extensively studied. Unfortunately, current antitussive medicines are not sufficiently effective and are also frequently associated with potentially harmful side effects [1,2]. A better understanding of the underlying mechanisms involved in modulation of the cough reflex could therefore hopefully lead to better antitussive treatments in the future.

Cough can be triggered by mechanical or chemical irritation of the receptor field of the vagus nerve in order to expel inhaled foreign matter from the lungs or to clear the airways of endogenous mucus. The primary role of this defensive reflex is to protect the airways from potentially harmful agents and afferents located in the airway mucosa are most relevant to this physiological function [3]. The 'cough network' can be tuned by various afferent inputs and exhibits significant plasticity in terms of both sensors [4] and integration [5]. This plasticity commonly consists of an increased or decreased strength of the cough reflex or modification of its pattern. 'Tuning' of cough can therefore be due to either interaction of afferent inputs or sensitization (upregulation) or desensitization (downregulation) of brainstem neural pathways [6,7]. Although the factors involved in modulation of the cough reflex have been extensively studied in the clinical setting and in the laboratory, little is known about the modulation of cough with human activities (i.e. behavioral modulation). Although the diurnal and nocturnal variations of cough, especially during sleep, are well documented, little information is available concerning modulation of cough during talking, laughing, singing, eating, drinking or exercising [8]. Based on empirical (sometimes anecdotal) evidence that some athletes experience inhibition of the cough reflex during exercise (contrasting with post-exercise hyperreactivity), physical activity appears to represent an interesting behavioral condition that may be able to modulate cough [8]. As exercise is associated with profound cardiorespiratory adjustments, ranging from changes in the breathing pattern leading to hyperpnea to activation of chest wall, lung, airway receptors and airway water and heat loss

* Corresponding author. EA 3450 DevAH – Development, Adaptation and Disadvantage, Cardio-respiratory regulations and motor control, Université de Lorraine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, F-54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel.: +33 (0)3 83 15 78 21; fax: +33 (0)3 83 15 42 69.
E-mail addresses: m.poussel@chu-nancy.fr (M. Poussel), b.chenuel@chu-nancy.fr (B. Chenuel).

1094-5539/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2013.07.005

[9], the consequences of exercise on cough need to be elucidated. In particular, neural and mechanical mechanisms involved in exercise-induced bronchodilation may also influence cough [10].

As only limited information is currently available concerning the impact of exercise on the sensitivity and strength of cough, the present study was designed to determine whether mechanical stimulation of the trachea can effectively trigger cough during exercise elicited by electrically induced muscle contractions in anesthetized rabbits. We hypothesized that cough may be down-regulated during exercise and, more precisely, that the cough reflex may be switched to an expiration reflex response under exercise conditions.

2. Material and methods

Thirteen anesthetized, tracheotomized New Zealand adult rabbits (3.13 ± 0.3 kg) were studied.

2.1. Anesthesia and surgical preparation

Anesthesia was induced with a mixture of urethane (500 mg kg^{-1}), alpha-chloralose (50 mg kg^{-1}) and sodium borate (50 mg kg^{-1}) injected through an ear vein. Supplementary anesthetic doses were administered intravenously as needed. The cervical part of the trachea was explored via a midline incision, paying attention to avoid damage to the vagal nerves. The rabbits were then tracheotomized and intubated with a steel tracheal cannula inserted caudally, while the rostral part of the trachea was ligated. This preparation allowed spontaneous breathing. An arterial catheter (Arrow 5 Fr) was inserted into the femoral artery allowing arterial pH and PCO_2 measurements (ABL500, Radiometer, Copenhagen, Denmark) by arterial sampling. Rectal temperature was continuously monitored with an electrical thermistor (Physiotemp Instruments, YSI 402 Clifton, NJ, USA) and maintained at 38 °C using a heated operating pad on which rabbits were placed in the supine position. Animal housing and experiments were performed according to Council Directive 86-609 EEC issued by the Council of the European Communities and under license from "Ministère de l'Agriculture et de la Pêche" and the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" (A5418-03409) and supervision by the "Services Vétérinaires Départementaux de Meurthe et Moselle".

2.2. Breathing pattern and respiratory resistance

Airflow was measured at the tracheal cannula using a heated Fleisch # 0 pneumotachograph (Metabo, Hepalinges, Switz erland) and airway pressure was measured at a side port of the cannula. The flow signal was digitized at 200 Hz, fed to a computer and integrated to volume. Tidal volume (V_T) and flow were displayed breath by breath throughout acquisition and were stored on disk for subsequent analysis. Respiratory resistance (Rrs) was measured by an adaptation of the forced oscillation technique, as described previously [11,12]. The airway opening was attached to a 3-way connector. A loudspeaker (ZR4009A, Bouyer, Montauban, France) connected to one end of the 3-way connector oscillated the transrespiratory pressure at a frequency of 20 Hz. The animal breathed spontaneously through a high-inertance tubing connected to the second connector, while a constant flow source flushed the breathing circuit with fresh air through the third connector to prevent CO_2 accumulation. Rrs was computed from the real part of the complex airway pressure-flow ratio at 20 Hz.

2.3. Tracheal stimulation

The apparatus developed to elicit discrete stimulation of the trachea has been described in detail and validated in previous reports [13–15]. Briefly, a semi-rigid rotating silastic catheter (0.7 mm OD) introduced through the tracheotomy toward the caudal end of the trachea is driven by a small electrical motor (low voltage DC motor 719RE280, MFA/Comodrills, UK) that spins the catheter and rubs the catheter tip on the airway mucosa for a short period of time. The duration of probing can be as brief as 50 ms, corresponding to almost a single probe rotation. The electrical signal from the motor was fed to a computer together with the respiratory signals to allow precise identification of the time-course of the stimulus.

2.4. Rhythmic electrically induced muscle contractions (EMC)

A validated technique was used to induce contraction of hindlimb muscles, previously performed in anesthetized sheep [16] and modified to be as close as possible to the approach used by Cross et al. [17]. Muscle contractions were generated using a timed stimulation frequency applied for 2 s every 4 s. Current intensity was set to between 10 and 30 mA with a rise and fall time of 0.5 s. The hindlimbs were shaved and fitted with stimulating surface electrodes (Dura-Stick Premium, REF 42205, DJO, USA) taped over the skin covering the gastrocnemius lateralis and connected to an electrical stimulator (Neuro Trac Rehab, Verity Medical LTD, UK). Stimulation was maintained for 3–4 min, during which the stimulus intensity was progressively increased from 10 to 30 mA, if needed, in order to at least double resting minute ventilation.

2.5. Arterial blood sampling

Arterial blood samples were drawn from 4 rabbits for pH and PCO_2 measurements at different time-points of the sequence: at rest and during electrically induced muscle contractions (at 1 min, 2 min and 4 min after the beginning of muscle contractions, respectively).

2.6. Protocol

One data acquisition sequence included recording of resting conditions followed by electrically induced muscle contractions (EMC). After a first sequence without tracheal stimulation allowing Rrs measurement, each rabbit was submitted to 2 to 3 sequences (separated by intervals of at least 10 min without stimulation) including tracheal stimulation. Mechanical stimulation of the trachea was performed at rest, while the animal had been breathing quietly for at least 1 min. Stimulations for various durations (50 ms, 150 ms, 300 ms, 600 ms and 1000 ms) were applied in random order. Stimulation times ranging from 50 ms to 300 ms were sufficiently brief to allow triggering of stimulation exclusively during inspiration, whereas stimulation lasting 600 ms and 1000 ms started during inspiration, but ended during expiration (i.e. longer stimulation time than the rabbit's inspiratory time). During EMC and after almost 1 min following onset of muscle contractions, 3 to 4 stimulations were applied at intervals of 1 min. Stimulations were also applied in random order and always during active muscle contraction.

2.7. Data analysis

A reference breath was characterized (at rest and during exercise) by averaging the following parameters on 3 reproducible breathing cycles prior to tracheal stimulation: V_T, peak expiratory

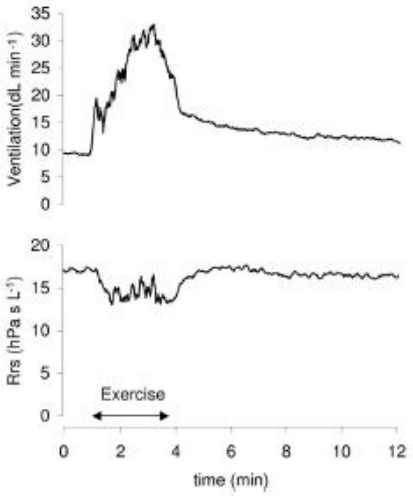


Fig. 1. Sequence including rest, exercise and recovery. During electrically induced exercise (horizontal arrow), minute ventilation is increased and respiratory resistance (Rrs) is decreased, indicating concomitant bronchodilation.

flow ($\dot{V}_{E_{peak}}$), inspiratory and expiratory times (T_I and T_E). A standard deviation (SD) for a given parameter was therefore computed to define its variability during spontaneous breathing. Accordingly, a significant response to tracheal stimulation was considered when the parameter was situated outside the 99th percentile, i.e. larger than the corresponding mean + 3 SD. Tracheal stimulation during breathing was assessed by the change in V_T and $\dot{V}_{E_{peak}}$ relative to the reference breath, as previously described [14,18]. Cough reflex (CR) was defined by a significant increase in both V_T and $\dot{V}_{E_{peak}}$ and expiration reflex (ER) was defined by an isolated increase in $\dot{V}_{E_{peak}}$ not preceded by an increase in V_T. A "no response" (NR) pattern was defined by no change in tidal flow and volume. Cough threshold (CT_{50}) and expiration reflex threshold (ERT_{50}) were defined as the shortest stimulus duration that induced ≥ 50% of cough responses and expiration reflex responses [18].

Respiratory variables (V_T, minute ventilation $\dot{V}_E$ and Rrs) were averaged over the relevant study period: i.e. at rest and during exercise.

Statistical analysis was performed using the JMP 9.0.0 package (2010 SAS Institute Inc). Quantitative and qualitative comparisons were performed. The incidence and type of response were analyzed by χ^2 test and Fisher's exact test when the expected sample sizes were small. Analysis of variance (ANOVA) was used for the quantitative assessment of breathing pattern (V_T, $\dot{V}_{E_{peak}}$, T_I and T_E) and respiratory resistance (Rrs). Comparisons between CR and ER threshold values were performed using nonparametric Wilcoxon signed-rank test. The limit of significance was $p < 0.05$. Data are expressed as mean ± SD.

3. Results

A total of 47 sequences (including rest and EMC) were analyzed in 13 rabbits and 311 tracheal stimulations were performed (196 at rest and 115 during exercise).

3.1. Breathing pattern and respiratory resistance

For all rabbits, minute ventilation was greater and Rrs was smaller ($p < 0.0001$) during exercise compared to baseline. Overall, minute ventilation was significantly greater during EMC compared to baseline ($p < 0.0001$; Fig. 1) with an increase of 613 ± 182 mL min^{-1} (+96%). EMC was also associated with a decrease ($p < 0.02$; Fig. 1) in Rrs of 5.3 ± 2.82 hPa s L^{-1} (−24%) indicating concomitant bronchodilation.

3.2. Types and incidence of expulsive events

Three types of response to brief stimulation were described: CR (Fig. 2), ER (Fig. 3) and NR. The stimulation failure rate was similar between rest and exercise for all stimulus durations (NS; Table 1). The incidence of CR was lower during exercise for the 300 ms, 600 ms and 1000 ms stimulus durations ($p < 0.03$). The incidence of

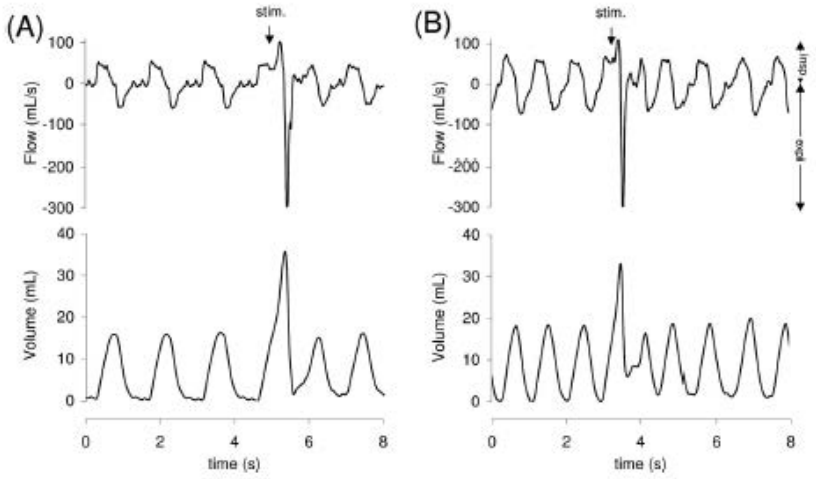


Fig. 2. (A-B). Cough reflex (CR) at rest (A) and during exercise (B) characterized by an increase in both tidal volume (V_T) and peak expiratory flow ($\dot{V}_{E_{peak}}$). The downward arrow indicates tracheal stimulation. Positive and negative airflow rates indicate inspiration and expiration, respectively. $\dot{V}_{E_{peak}}$ percentage change of CR from reference breath values was not different during exercise compared to rest.

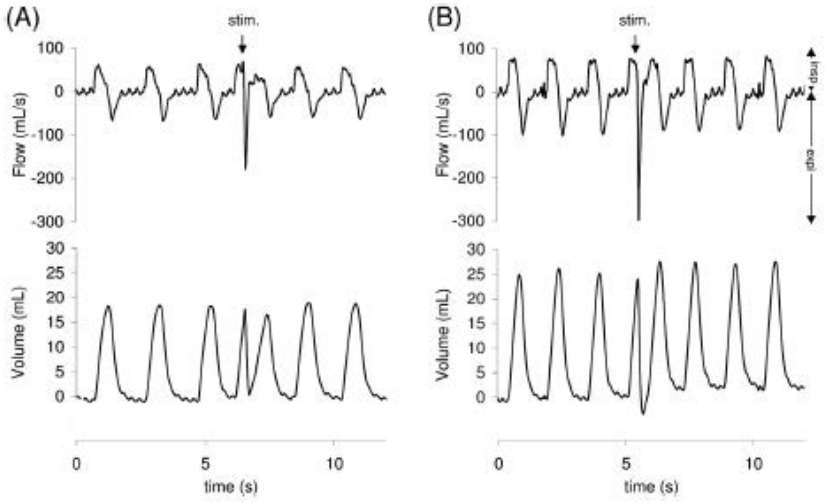


Fig. 3. (A-B). Expiration reflex (ER) at rest (A) and during exercise (B) characterized by an increase in peak expiratory flow ($\dot{V}E_{peak}$) but no change in tidal volume (V_T). The downward arrow indicates tracheal stimulation. Positive and negative airflow rates indicate inspiration and expiration, respectively. $\dot{V}E_{peak}$ percentage change of ER from reference breath values was not different during exercise compared to rest.

ER was higher during exercise for the 150 ms and 600 ms stimulus durations ($p < 0.04$). Overall, a small number of CR (117/196 vs. 38/115; $p < 0.0001$) and greater number of ER (35/196 vs. 47/115; $p < 0.0001$) were observed during EMC (Table 1). During EMC, CT_{50} was increased in 8 rabbits, remained unchanged in 4 rabbits and decreased in 1 rabbit (Table 2), indicating decreased sensitivity of the cough reflex compared to baseline ($p = 0.02$). During EMC, CT_{50} was higher than ERT_{50} in 7 rabbits and lower in 6 rabbits (NS) and ERT_{50} increased in 10 rabbits and remained unchanged in 3 rabbits compared to baseline CT_{50} ($p = 0.005$), indicating decreased sensitivity of the preferred defensive response (i.e. ER) during EMC compared to the baseline preferred response (i.e. CR).

3.3. Quantitative analysis of expulsive events

During EMC, CR was characterized by an increase in absolute $\dot{V}E_{peak}$ values but not in $\dot{V}E_{peak}$ percentage change from reference breath values (NS). Similarly, the $\dot{V}E_{peak}$ percentage change of ER also did not differ from resting values (NS).

3.4. Arterial sampling: pH, PCO_2

PCO_2 and pH values were similar (NS) between rest (35.39 mmHg and 7.392, respectively) and exercise (35 mmHg and 7.394, respectively).

Table 1
Respiratory response to tracheal stimulation at rest and during exercise.

Respiratory response to tracheal stimulation		Rest	Exercise	p
	n	196	115	
CR		117 (60%)	38 (33%)	<0.0001
ER		35 (18%)	47 (41%)	<0.0001
NR		44 (22%)	30 (26%)	NS

n: number of tracheal stimulations.
CR: Cough reflex.
ER: Expiration reflex.
NR: No response.
NS: Non significant.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first report studying the sensitivity and strength of the cough reflex in spontaneously breathing animals, in response to mechanical stimulation of the trachea during electrically induced muscle contractions. The central findings of this study are that, during this approach mimicking dynamic exercise, the incidence of the cough reflex was decreased and the cough threshold was increased, whereas the strength of cough remained unchanged.

Although cough has been extensively studied, little is known about its interaction with human activities, especially during exercise. Interestingly, although many athletes (asthmatic or non-asthmatic) experience cough and bronchoconstriction after exercise [19], some evidence suggests that these symptoms are inhibited during exercise [7]. The cough reflex therefore does not appear to be static, but exhibits plasticity in terms of both sensors [4] and integration [5]. This plasticity usually consists of sensitization of the cough reflex, but downregulation may also occur [6,7,13]. Exercise, corresponding to electrically induced muscle

Table 2
Cough threshold and expiration reflex threshold at rest and during exercise.

	CT_{50} (ms)		ERT_{50} (ms)
Rabbits	Rest	Exercise	Exercise
1	50	50	150
2	150	1000	300
3	50	150	600
4	50	50	300
5	50	50	300
6	150	1000	150
7	50	600	150
8	50	1000	50
9	50	150	1000
10	150	150	600
11	50	1000	50
12	300	1000	600
13	300	150	600

CT_{50} : Cough threshold.
ERT_{50} : Expiration reflex threshold.

contractions, induced an increase in ventilation associated with bronchodilation [10,11]. Numerous adaptive responses are generated during physical activity. Among these responses, increased sympathetic activity and the resulting increased plasma catecholamine concentrations as well as the release of inhibitory nonepinephrinergic-noncholinergic neurotransmitters contribute to exercise-induced bronchodilation [20]. Moreover, activation of airway, lung and chest wall sensors during exercise (resulting from increased ventilation) is also thought to be a primary mechanism. Overall, this exercise-induced bronchodilation obviously results from a combination of neural and mechanical mechanisms, although the respective contribution of these mechanisms has not been fully elucidated [10]. There is a poor correlation between the ability of stimuli to initiate coughing and bronchospasm (i.e. airway smooth muscle contraction is ineffective to trigger cough [21,22]). However, although induced bronchospasm fails to trigger cough, it may enhance cough induced by mechanical stimulation of the airways, suggesting a modulatory role of bronchoconstriction [23,24]. Bronchodilation could then be expected to downregulate cough. The results of the present study would support this hypothesis, as illustrated by the decrease in Rrs (21.6 vs. 16.3 hPa s L^{-1}; $p < 0.02$) associated with an increase in cough threshold ($p = 0.02$) during exercise. A particular feature of the model used in this study is that the sequence of muscle contractions is longer (as long as 4 min) compared to that used in other animal models and it also allowed a more marked increase in minute ventilation [10,11]. Bronchodilation is obviously not the only mechanism involved, as suggested by some human studies. Fujimura et al. [25] found that procaterol-induced bronchodilation (i.e. without exercise) had no direct effect on cough threshold. Lavorini et al. [26] demonstrated that cough threshold was increased during exercise and voluntary isocapnic hyperpnea (VIH) with no signs of bronchodilation (no significant change in forced expiratory volume in 1 s after exercise and VIH) suggesting that other mechanisms in addition to airway dilation are also involved.

Increased breathing during exercise is associated with a number of physical changes in the airways. Lung inflation (due to deep breaths associated with exercise) results in increased discharge of slowly adapting stretch receptors (SARs) in myelinated afferent fibers [6]. SARs obviously play a key role in modulating the cough reflex when the depth of breathing is increased (i.e. exercise) but with diverse findings. Nishino et al. [27,28] showed that, in anesthetized humans, lung inflations with continuous positive airway pressure (CPAP) increased the strength of the cough reflex, while other studies conducted in anesthetized animals have reported opposite effects, suggesting downregulation [29]. However, most of these experiments assessed the strength of the cough reflex and not its sensitivity. The present study determined both the strength ($\dot{V}\varepsilon_{peak}$) and the sensitivity ($CT_{50}$) of the cough reflex to tracheal mechanical stimulation. Our results are in accordance with those reported by Lavorini et al. [26,30], showing an increased threshold of the cough reflex, although different tussigenic stimuli were used (inhalation of nebulized distilled water vs. mechanical irritation). No differences in the strength of the cough reflex were observed between rest and exercise (NS), as shown by Romaniuk et al. [30]. SARs are probably involved in modulation of the cough reflex during exercise and our results are consistent with SAR-driven inhibition of cough, but the precise role of these receptors remains to be elucidated. Exercise also increased cardiac output, resulting in increased pulmonary blood flow [31], which stimulates the usually silent pulmonary C-fiber sensors [23,32] leading to reflex inhibition of respiratory (inspiratory and expiratory) muscles [33]. There is a persistent controversy concerning the role of C-fibers in cough. C-fibers arising from the jugular ganglia likely promote cough, whereas nodose C-fibers might inhibit cough [34,35]. Exercise could therefore result in inhibition of the cough reflex. Cough receptors are also sensitive to pH and arterial blood CO_2 tension. During EMC, the increased minute ventilation may lead to an increase in pH and a decrease in PCO_2 that may alter the sensitivity of the cough reflex. However, our results indicate similar (NS) values for PCO_2 and pH between rest and EMC, suggesting that these two stimuli did not account for our observations. These results are in accordance with previous studies demonstrating that, when moderate current intensities are applied directly to the muscles, the ventilatory response to electrically induced rhythmic muscle contractions only occurs in the presence of muscle contractions, and is independent of the electrical nature of the stimulation [17]. In addition, the ventilatory response to EMC, like that to muscular exercise, is proportional to the increase in pulmonary gas exchange rate [16,36], leading to an isocapnic response or a very small decline in arterial blood CO_2 tension. Activation of limb afferents can also influence the cough reflex, as electrical stimulation directly activated limb sensory receptors that may influence the 'cough network' regulation of the cough reflex. However, a low intensity current was used to limit direct stimulation of afferent fibers and to prevent nociceptive stimuli [16,17]. The ventilatory response to mechanical airway stimulation is strongly dependent [14] on the phase of breathing, in favor of the CR when the stimulus is delivered during inspiration and ER when the stimulus is delivered during expiration. These findings suggest the importance of the balance of discharge of SARs and rapidly adapting receptors (RARs) during the breathing cycle on the nature of the expulsive event. In our study, stimulations were therefore applied either throughout inspiration (50 ms, 150 ms, 300 ms) or starting during inspiration (600 ms, 1000 ms) in order to promote the CR and to more clearly highlight any interactions within the brainstem respiratory network.

Integrative processes within the brainstem respiratory network obviously play a major role in the integration of inhibitory and excitatory influences on defensive airway reflexes. Breathing and coughing are generated by neurons located in adjacent regions of the brainstem [37–39]. Thus, in response to mechanical stimulation of the trachea (always occurring during the same phase of breathing), the brainstem respiratory network must trigger a motor response appropriate to the prevailing needs of the two conditions (rest and exercise) [37]. It can then be speculated that, during the increased metabolic demands induced by exercise, the respiratory pattern generator favors an increase of respiratory activity and inhibits airway defensive reflexes. As a result, a given stimulus duration able to elicit a CR during resting breathing may no longer be able to elicit the same defensive reflex during exercise, as respiratory neurons are required to increase breathing for exercise. Our results support this hypothesis by showing an increase of CT_{50} ($p = 0.02$) during EMC, and are also in accordance with the results of other human studies. Lavorini et al. [26] showed desensitization of the cough reflex during exercise and voluntary isocapnic hyperpnea, suggesting downregulation of cough at the expense of hyperpnea. An appropriate animal preparation also allows more detailed characterization of downregulation of CR, by clearly distinguishing between CR and ER, as these two reflexes are powerful ancestral reflexes designed to protect the airways from potentially harmful inhaled agents, but CR and ER have different functions, sensory pathways, central nervous circuits and physiological and pharmacological modulations [3]. The smaller number of CR ($p < 0.0001$) and greater number of ER ($p < 0.0001$) during EMC may also suggest that interactions in the brainstem respiratory network promote ER rather than CR. Therefore, rather than inducing complete downregulation of airway defensive reflexes, the nature of the reflexes during EMC may switch from CR to ER. However, the sensitivity of the preferred defensive response, i.e. CR

at rest and ER in response to EMC, is decreased ($p = 0.005$), suggesting marked downregulation of both expulsive defensive reflexes during dynamic exercise.

In conclusion, this study shows that the adjustments occurring during EMC downregulate tracheal defensive reflexes in anesthetized rabbits, as shown by a decreased incidence of CR and a higher cough threshold. Although the sensitivity of the CR and ER were both decreased during EMC compared to the sensitivity of the CR at rest, the strength of the expulsive response remained unchanged. However, further studies are needed to more clearly elucidate the precise contributions of these respective adjustments on modulation of the CR during real dynamic exercise.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge N. Bertin and A-L. Leblanc for their helpful technical assistance and P-A Laurain for his contribution to this study. This study was supported by grant EA3450 from the Ministry of Research, Paris, France.

References

[1] Belvisi MG, Geppetti P. Cough. 7: current and future drugs for the treatment of chronic cough. Thorax 2004;59:438–40.
[2] Reynolds SM, Mackenzie AJ, Spina D, Page CP. The pharmacology of cough. Trends Pharmacol Sci 2004;25:569–76.
[3] Widdicombe J, Fontana G. Cough: what's in a name? Eur Respir J 2006;28:10–5.
[4] Carr MJ, Lee LY. Plasticity of peripheral mechanisms of cough. Respir Physiol Neurobiol 2006;152:298–311.
[5] Bonham AC, Sekizawa SI, Joad JP. Plasticity of central mechanisms for cough. Pulm Pharmacol Ther 2004;17:453–7.
[6] Hanacek J, Tatar M, Widdicombe J. Regulation of cough by secondary sensory inputs. Respir Physiol Neurobiol 2006;152:282–97.
[7] Widdicombe J, Singh V. Physiological and pathophysiological down-regulation of cough. Respir Physiol Neurobiol 2006;150:105–17.
[8] Widdicombe J, Fontana G, Gibson P. Workshop—cough: exercise, speech and music. Pulm Pharmacol Ther 2009;22:143–7.
[9] Turner DL. Cardiovascular and respiratory control mechanisms during exercise: an integrated view. J Exp Biol 1991;160:309–40.
[10] Marchal F, Evrot E, Schweitzer C, Demoulin B, Poussel M, Varechova S. Bronchodilation induced by muscular contraction in spontaneously breathing rabbits: neural or mechanical? Respir Physiol Neurobiol 2012;180:311–5.
[11] Marchal F, Demoulin B, Schweitzer C, Leblanc AL, Bertin N. Airway response to induced muscular contraction in spontaneously breathing rabbits. Respir Physiol Neurobiol 2008;160:224–31.
[12] Schweitzer C, Demoulin B, Varechova S, Poussel M, Marchal F. Neural control of airway to deep inhalation in rabbits. Respir Physiol Neurobiol 2011;177:169–75.
[13] Poussel M, Varechova S, Demoulin B, Chalon B, Schweitzer C, Marchal F, et al. Nasal stimulation by water down-regulates cough in anesthetized rabbits. Respir Physiol Neurobiol 2012;183:20–5.
[14] Varechova S, Poussel M, Demoulin B, Chenuel B, Schweitzer C, Marchal F. Within breath ventilatory responses to mechanical tracheal stimulation in anaesthetised rabbits. Pulm Pharmacol Ther 2010;23:397–402.
[15] Varechova S, Poussel M, Schweitzer C, Demoulin B, Chenuel B, Marchal F. Stimulus response latency of cough and expiration reflex depends on breathing in the rabbit. Pulm Pharmacol Ther 2012;25:242–7.
[16] Haouzi P, Chenuel B. Control of arterial PCO_2 by somatic afferents in sheep. J Physiol 2005;569:975–87.
[17] Cross BA, Davey A, Guz A, Katona PG, MacLean M, Murphy K, et al. The role of spinal cord transmission in the ventilatory response to electrically induced exercise in the anaesthetized dog. J Physiol 1982;329:37–55.
[18] Varechova S, Demoulin B, Poussel M, Chenuel B, Marchal F. Cough threshold and reactivity to mechanical stimulation of the trachea in the rabbit preliminary observations. Bratisl Lek Listy 2011;112:136–9.
[19] Poussel M, Chenuel B. Exercise-induced bronchoconstriction in non-asthmatic athletes. Rev Mal Respir 2010;27:898–906.
[20] Fontana GA, Pantaleo T, Lavorini F, Bongianni F, Mannelli M, Bridge PD, et al. Handgrip-induced airway dilation in asthmatic patients with bronchoconstriction induced by MCh inhalation. J Appl Physiol 2002;93:1723–30.
[21] El-Hashim AZ, Amine SA. The role of substance P and bradykinin in the cough reflex and bronchoconstriction in guinea-pigs. Eur J Pharmacol 2005;513:125–33.
[22] Barnes NC, Piper PJ, Costello JF. Comparative effects of inhaled leukotriene C4, leukotriene D4, and histamine in normal human subjects. Thorax 1984;39:500–4.
[23] Widdicombe J. Airway receptors. Respir Physiol 2001;125:3–15.
[24] House A, Celly C, Skeans S, Lamca J, Egan RW, Hey JA, et al. Cough reflex in allergic dogs. Eur J Pharmacol 2004;492:251–8.
[25] Fujimura M, Sakamoto S, Kamio Y, Matsuda T. Effects of methacholine induced bronchoconstriction and procaterol induced bronchodilation on cough receptor sensitivity to inhaled capsaicin and tartaric acid. Thorax 1992;47:441–5.
[26] Lavorini F, Fontana GA, Chellini E, Magni C, Duranti R, Widdicombe J. Desensitization of the cough reflex by exercise and voluntary isocapnic hyperpnea. J Appl Physiol 2010;108:1061–8.
[27] Nishino T, Hiraga K, Honda Y. Inhibitory effects of CO2 on airway defensive reflexes in enflurane-anesthetized humans. J Appl Physiol 1989;66:2642–6.
[28] Nishino T, Sugimori K, Hiraga K, Hond Y. Influence of CPAP on reflex responses to tracheal irritation in anesthetized humans. J Appl Physiol 1989;67:954–8.
[29] Javorka K, Michalik J, Caldos S, Bevilaqua J. Effect of increased intrapulmonary pressure on defense reflexes of the respiratory tract. Bratisl Lek Listy 1982;77:612–21.
[30] Romaniuk JR, Kowalski KE, Dick TE. The role of pulmonary stretch receptor activation during cough in dogs. Acta Neurobiol Exp (Wars) 1997;57:21–9.
[31] Astrand PO, Cuddy TE, Saltin B, Stenberg J. Cardiac output during submaximal and maximal work. J Appl Physiol 1964;19:268–74.
[32] Paintal AS. Mechanism of stimulation of type J pulmonary receptors. J Physiol 1969;203:511–32.
[33] Anand A, Paintal AS. Reflex effects following selective stimulation of J receptors in the cat. J Physiol 1980;299:553–72.
[34] Tatar M, Webber SE, Widdicombe JG. Lung C-fibre receptor activation and defensive reflexes in anaesthetized cats. J Physiol 1988;402:411–20.
[35] Canning BJ, Chou YL. Cough sensors. I. Physiological and pharmacological properties of the afferent nerves regulating cough. Handb Exp Pharmacol 2009:23–47.
[36] Huszczuk A, Whipp BJ, Oren A, Shors EC, Pokorski M, Nery LE, et al. Ventilatory responses to partial cardiopulmonary bypass at rest and exercise in dogs. J Appl Physiol 1986;61:575–83.
[37] Bolser DC, Poliacek I, Jakus J, Fuller DD, Davenport PW. Neurogenesis of cough, other airway defensive behaviors and breathing: a holarchical system? Respir Physiol Neurobiol 2006;152:255–65.
[38] Mutolo D, Bongianni F, Fontana GA, Pantaleo T. The role of excitatory amino acids and substance P in the mediation of the cough reflex within the nucleus tractus solitarii of the rabbit. Brain Res Bull 2007;74:284–93.
[39] Shannon R, Baekey DM, Morris KF, Nuding SC, Segers LS, Lindsey BG. Production of reflex cough by brainstem respiratory networks. Pulm Pharmacol Ther 2004;17:369–76.

Annexe 2

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Lack of desensitization of the cough reflex in ovalbumin-sensitized rabbits during exercise

Angelica Tiotiu[1,2]*, Bruno Chenuel[1,3], Laurent Foucaud[1], Bruno Demoulin[1], Silvia Demoulin-Alexikova[1], Christo Christov[4], Mathias Poussel[1,3]

1 EA 3450 DevAH - Development, Adaptation and Disadvantage, Cardiorespiratory regulations and motor control, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France, **2** Pulmonology Department, CHRU Nancy, Nancy, France, **3** Pulmonary Function Testing and Exercise Physiology, CHRU Nancy, Nancy, France, **4** Department of Histology, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France

* a.tiotiu@chru-nancy.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Tiotiu A, Chenuel B, Foucaud L, Demoulin B, Demoulin-Alexikova S, Christov C, et al. (2017) Lack of desensitization of the cough reflex in ovalbumin-sensitized rabbits during exercise. PLoS ONE 12(2): e0171862. doi:10.1371/journal.pone.0171862

Editor: Bernhard Ryffel, Centre National de la Recherche Scientifique, FRANCE

Received: October 9, 2016

Accepted: January 26, 2017

Published: February 9, 2017

Copyright: © 2017 Tiotiu et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Introduction

Cough is a major symptom of asthma frequently experienced during exercise but little is known about interactions between cough and exercise. The goal of our study was to clarify the potential modulation of the cough reflex (CR) by exercise in a spontaneously breathing anaesthetized animal model of airway eosinophilic inflammation.

Materials & methods

Ten ovalbumin (OVA) sensitized adult rabbits and 8 controls were studied. The ventilatory response to direct tracheal stimulation, performed both at rest and during exercise was determined to quantify the incidence and the sensitivity of the CR.

Broncho-alveolar lavages (BAL) and cell counts were performed to assess the level of the airway inflammation following OVA-induced sensitization. Exercise was mimicked by Electrically induced hindlimb Muscular Contractions (EMC).

Results

Among 494 tracheal stimulations, 261 were performed at rest and 233 at exercise. OVA challenges in sensitized rabbits caused a significant increase in the percentage of eosinophils ($p = 0.008$) in BAL. EMC increased minute ventilation by 36% and 35% in OVA and control rabbits respectively, compared to rest values. The sensitivity of the CR decreased during exercise compared to baseline in control rabbits ($p = 0.0313$) while it remained unchanged in OVA rabbits.

Conclusion

The desensitization of the CR during exercise in control rabbits was abolished in OVA rabbits. The precise role of airway inflammation in this lack of CR desensitization needs to be further investigated but it might contribute to the exercise-induced cough in asthmatics.

Introduction

Cough is a major airway defensive reflex [1, 2]. It is one of the most common medical afflictions for which patients seek medical attention and which remains an unmet need given the lack of effective and safe treatments [3, 4]. Little is known about the modulation of cough associated with human activities, particularly during exercise [5]. The major cardiorespiratory adjustments occurring during exercise [6] undoubtedly may influence the cough reflex (CR). Some evidence suggest that cough is decreased during exercise in healthy subjects [7] as well as in animals models [8]. In contrast, exercise-induced cough is frequently reported by asthmatic patients [9] or even by athletes exhibiting airway inflammation [10], suggesting the potential of airway inflammation to enhance the CR during exercise. As only limited (and sometimes contradictory) information is available concerning the impact of exercise on cough, our study was conceived to develop an animal model as close as possible to the "asthmatic" airway inflammation and to assess the specific role of exercise on the occurrence of stimulated CR. Electrically induced muscle contractions (EMC) have been extensively used in the study of the control of breathing at exercise (animals and human studies). Consequently, it has long been demonstrated that EMC provides a hyperpnea that follows the same characteristics as the physiological increase in ventilation induced by volitional exercise, particularly matched to metabolism. Therefore, the EMC model appears as a valid model of exercise. Our main goal was then to determine whether airway inflammation could modulate the cough-induced by mechanical stimulation of the trachea during experimental exercise in ovalbumin (OVA)-sensitized rabbits compared to controls. We hypothesized that cough may be either increased or at least not decreased during exercise in OVA rabbits while cough is decreased during exercise in control rabbits.

Materials and methods

All animal procedures (housing and experiments) were approved by the Lorraine University Committee for the Use and Care of Laboratory animals and performed according to Council Directive 86–609 EEC, issued by the Council of the European Communities, under license from "Ministère de l'Agriculture et de la Pêche" and the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" (A5418-03409), and supervision by the "Services Vétérinaires Départementaux de Meurthe et Moselle". Eighteen anesthetized, tracheotomized and spontaneously breathing New Zealand adult rabbits (weight: 3.07± 0.30 kg; age: 3 months) were studied (SARL HYCOLE—Route de Villers Plouich, 59159 MARCOING, France, http://www.hycole.com/). Among them, 10 were sensitized to ovalbumin (OVA) and 8 were sham sensitized (controls).

Ovalbumin sensitization protocol and control group

The month before the acute experiment with tracheal stimulations and exercise, an OVA sensitization protocol was performed. As previously described, OVA sensitized rabbits [11, 12] received intra-peritoneal (i.p.) injections of 0.1 mg OVA and 10 mg $Al(OH)_3$ dissolved in 1 ml saline (0.9%) on day 1 and day 14. From day 26 to 28, sensitized rabbits were exposed daily to an aerosol of OVA during 20 minutes (2.5 mg/ml; 50 mg OVA dissolved in 20 ml saline). Aerosols were administrated in a closed Plexiglas box (Fig 1) using an ultrasonic-nebulizer (SYST'AM, LS290). A sham protocol was used on control rabbits. They were treated similarly but saline was systematically used instead of OVA solutions, either intra-peritoneally or in nebulizations. All acute experiments were performed on day 28.

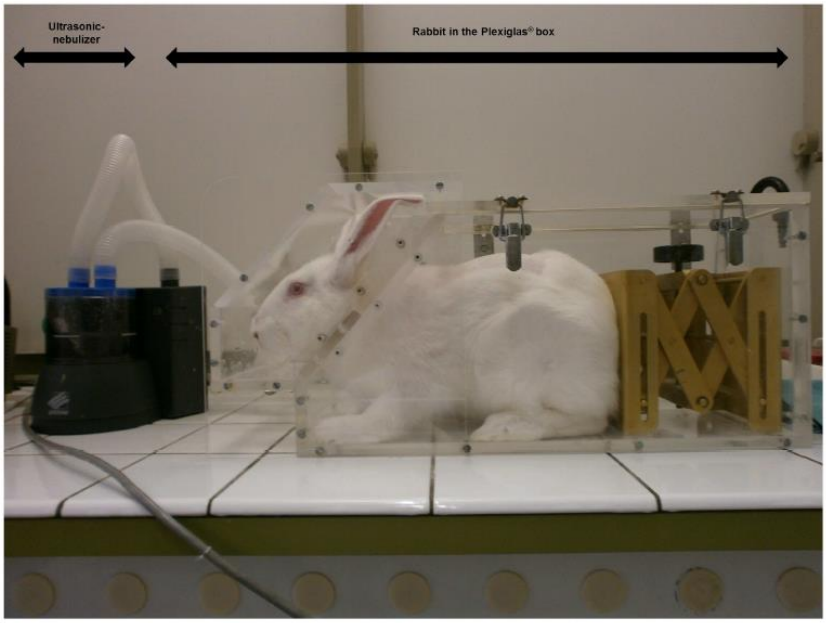


Fig 1. Rabbit exposed to an aerosol administrated in a closed Plexiglas box using an ultrasonic-nebulizer (SYST'AM, LS290). The box was conceived to allow the head of the rabbit to be maintained in front of the aerosol particles and drops cloud generated by the nebulizer. Aerosol sessions were performed 15–20 min daily from day 26 to day 28 either with ovalbumin (OVA rabbits) or with saline (control rabbits).

doi:10.1371/journal.pone.0171862.g001

Ovalbumin sensitization evaluation

Intradermal skin tests. Seven days before acute experiments (day 21), sensitization to OVA was tested in both groups by intradermal skin tests. A 200 μg/mL OVA solution and saline (for control) were used. One hundred microliters of solutions (OVA and saline) were injected subcutaenously, symetrically in the shaved dermis on the back of each animals. The extent of the reaction was measured 1h later using a calliper. Two measurements were taken at right angles to one another, in order to calculate the wheal area (mm^2) [13].

Bronchoalveolar lavage (BAL). BAL was performed at the end of each acute experiment (from 1.5 to 2.5 hours after the last OVA challenge on day 28), following immediately the animal euthanasia. A polyethylene-190 catheter was advanced through the endotracheal cannula into the trachea and gently wedged into a bronchus. Slow injection (followed by removal aspiration) of 5 ml of HEPES solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 MgCl2, 10mM glucose, and 10 mM HEPES; pH 7.4) was repeated three times (overall injected volume = 15ml). BAL was then collected into a tube placed on ice and previously filtrated on nylon tissue with 60 μm mesh to remove mucus. An aliquot of this suspension was then centrifuged (600 rpm, 10 minutes) and the resulting Cytospin cell preparations were stained with May-Grünwald-Giemsa.

Microscopy and cell counting protocol. Images were acquired by an Olympus CDD camera coupled to an Olympus microscope with a x40 objective, so that final pixel size in a 1360 x 1024 image was 0.32 μm. At least 100 cells were included in the differential cellular

count: macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, and monocytes were separately counted. Epithelial and unidentifiable cells were excluded.

Anesthesia and surgical preparation before acute experiment

Anesthesia was induced with a mixture of intravenous (through the ear vein) pentobarbital (0.30 ml.kg^{-1}) and intramuscular ketamine (0.10 ml.kg^{-1}), and pursued with continuous pentobarbital infusion (0.6 ml.h^{-1}). Anesthetic depth was quarterly evaluated (every 15 minutes) with the monitoring of physiological parameters (respiratory rate, heart rate) and the assessment of reflexes (palpebral reflex, corneal reflex, ear pinch withdrawal reflex and jaw tone). Supplementary anesthetic doses were administrated in case of too light anesthesia (intravenous pentobarbital bolus of 0.03 ml.kg^{-1} and intramuscular ketamine bolus of 0.01 ml.kg^{-1}). At the end of the acute experiment, euthanasia was obtained by an overdose of Dolethal (bolus of 5 ml, Vetoquinol SA, Lure, France).

As previously described [8], the trachea was exposed via a midline incision, paying attention to preserve the integrity of vagal nerves. Rabbits were then tracheotomized and intubated with a steel tracheal cannula inserted caudally, allowing spontaneous breathing. Abdominal muscles electromyograms (EMG) was recorded by bipolar fine wire stainless steel electrodes (A-M Systems, INC, Carlsborg, WA 98324) introduced in either the transversus abdominis or external oblique abdominal muscles. Rectal temperature was continuously monitored with an electrical thermistor (Physiotemp Instruments, YSI 402 Clifton, NJ, USA) and maintained at 38˚C using a heated operating pad, on which rabbits were laid in the supine position.

Breathing pattern and respiratory resistance

The tracheal cannula was connected to a pneumotachograph (Fleisch # 0, Metabo, Hepalinges, Switzerland) to simultaneously record airflow and airway pressure. The flow signal was digitized at 200 Hz. Data was fed into a computer and integrated to volume. Tidal Volume (V_T) and flow were displayed continuously throughout the period of acquisition and were stored on disk for later analysis. Respiratory resistance (Rrs) was measured by an adjustment of the forced oscillation technique, as previously detailed [8, 14, 15], in order to evaluate the exercise induced bronchodilation.

Rhythmic electrical stimulation of muscle contractions (EMC)

EMC was used as a valid model of exercise. We therefore used the validated approach of Cross et al. [16] adapted and formerly described in a previous study in rabbits [8]. Briefly, hindlimbs of anesthetized rabbits were shaved and fitted with stimulating surface electrodes (Dura-Stick Premium, REF 42205, DJO, USA) taped over the skin and connected to an electrical stimulator (Neuro Trac Rehab, Verity Medical LTD, UK). Stimulation allowing rhythmic hindlimb muscles contraction was maintained for 3 or 4 min bout, during which the current intensity was progressively increased from 10 to 30 mA, in order to maintain a sufficient increase in metabolism and corresponding hyperpnea (at least a 30% increase of resting minute-ventilation) [8, 16, 17].

Tracheal stimulation and analysis of the cough reflex

The device designed to stimulate the trachea has been described in detail and validated in previous reports [8, 18–20]. A semi-rigid rotating silastic catheter introduced through the tracheotomy is driven by a small electrical motor (low voltage DC motor 719RE280, MFA/Comodrills, UK) that spins the catheter and rubs the catheter tip on the airway mucosa. The

duration of probing randomly varied from 50 ms, corresponding to almost a single probe rotation, to 1000 ms.

Characterisation of a reference breath (at rest and during exercise) was obtained by averaging V_T and peak expiratory flow ($V'_{E}peak$) on 3 consecutive respiratory cycles prior to tracheal stimulation [8]. Responses to tracheal stimulations were assessed by the change in V_T and $V'_{E}peak$ relative to the reference breath, as previously described [19, 21]. A significant response to tracheal stimulation was considered when the parameter (V_T, $V'_{E}peak$) was situated outside the 99th percentile (i.e. larger than the mean + 3 SD). Cough reflex (CR) was defined by a significant increase in both V_T and $V'_{E}peak$ and expiration reflex (ER) was defined by an isolated increase in $V'_{E}peak$, not preceded by an increase in V_T. A "no response" (NR) pattern was defined by no change in tidal flow and volume. Cough threshold (CT) was defined as the shortest stimulus duration that induced a cough reflex response [21].

Protocol

One data acquisition sequence consisted of a bout of rest followed by electrically induced muscle contractions (EMC) records (i.e. exercise) [8]. After an initial sequence allowing Rrs measurements, each rabbit underwent 2 to 3 sequences (separated by at least 10 min of recovery, i.e. without any stimulation) including tracheal stimulations. Various durations (50 ms, 150 ms, 300 ms, 600 ms, 1000 ms) of tracheal stimulations were randomly delivered at rest, while the animal had been breathing quietly for at least 1 min. All stimulations were applied either completely during inspiration (i.e. 50 ms to 300 ms) or almost starting during inspiration (i.e. 600 ms and 1000 ms). During EMC, 3 to 4 tracheal stimulations (from 50 ms to 1000 ms) were as well randomly delivered at intervals of 1 min.

Data analysis

Statistical analysis was performed using the JMP 9.0.0 package (2010 SAS Institute Inc). Respiratory variables (V_T, minute ventilation V'_E and Rrs) were averaged over the relevant study period: i.e. at rest and during exercise for comparisons between groups.

The incidence and type of response were analysed by χ^2 test or the Fisher's exact test. Analysis of variance (ANOVA) was used for the comparison of the breathing pattern (V_T, $V'_{E}peak$) and respiratory resistance (Rrs). Comparisons of CT values between rest and exercise were performed using nonparametric Wilcoxon signed-rank test. The limit of significance was $p < 0.05$. Data are expressed as mean ± SD.

Results

An overall of 494 tracheal stimulations were performed (271 at rest; 223 at exercise) and analyzed in 18 rabbits (10 OVA and 8 controls).

OVA intradermal skin tests and BAL eosinophil count

OVA intradermal injection challenge was highly positive in OVA rabbits with a mean wheal area of 630 mm^2 ± 297 mm^2 and strictly negative in control rabbits (0 mm^2, $p < 0.0001$). In addition, a significant increase of eosinophils ($p = 0.008$) occurred in BAL fluid in OVA rabbits compared to control ones (Table 1).

Table 1. Wheal surface of the intradermal skin tests, total BAL cell count and BAL eosinophil count of OVA and control rabbits, expressed as mean (Standard Deviation).

Condition	Wheal surface mm2 (SD)	Total BAL cell count (SD)/ml	BAL eosinophil count (SD) %
OVA (n = 10)	630 (297)	1.61 (57) x10^6	26.3 (16)
Control (n = 8)	0 (0)	1.08 (43) x10^6	2.5 (2.5)

BAL: Bronchoalveolar lavage

OVA: Ovalbumin-sensitized rabbits

doi:10.1371/journal.pone.0171862.t001

Breathing pattern and respiratory resistance at rest and during exercise (EMC)

Following rhythmic electrical stimulation of muscle contractions (i.e. exercise), the mean minute ventilation increased from rest, by 36% and 35% in OVA and control rabbits, respectively (Table 2). Concomitantly, the mean reduction in Rrs was 11% (OVA) and 13% (control) (Table 2; Fig 2). No significant statistical differences were found between groups.

Types of ventilatory responses to tracheal stimulation

Three types of response to tracheal stimulation were encountered: CR (Fig 3), ER and NR. Overall stimulations, as stimulations performed at rest and during exercise (EMC) in both (OVA and control) groups are presented in Table 3.

During exercise, in the OVA group, CT remained unchanged in 5 rabbits, decreased in 4 rabbits and increased in 1 rabbit, indicating no modification of the sensitivity of the cough reflex compared to baseline (no significant difference (NS)). For the control group, CT during exercise increased in 4 rabbits and remained unchanged in 4 rabbits, even so leading to a significant decreased sensitivity of the cough reflex compared to baseline ($p = 0.0313$, Table 4).

Discussion

To the best of our knowledge, our study is the first that focused on the influence of exercise on the cough reflex to tracheal mechanical stimulation in OVA-challenged rabbits. The study demonstrates that allergen-induced airway inflammation prevents the physiological exercise-induced decrease of the CR sensitivity, previously demonstrated [8].

Cough is a common symptom in a wide range of respiratory and non-respiratory diseases, but still remains a difficult clinical problem mostly because of the poor understanding of the underlying pathophysiological processes involved. Numerous animal models have been used

Table 2. Minute ventilation and respiratory resistance at baseline and during exercise for OVA and control rabbits.

	Baseline	Exercise *(2&3min)*	p
	Rrs (hPa s L^{-1})		
OVA (n = 10)	16.8 ± 1.9	14.9 ± 2.1	0.0003
Control (n = 8)	17.9 ± 1.4	15.5 ± 1.3	< 0.0001
	V'_E (mL min^{-1})		
OVA (n = 10)	984 ± 232	1338 ± 229	< 0.0001
Control (n = 8)	794 ± 122	1075 ± 216	0.0008

OVA: Ovalbumin-sensitized rabbits

V'_E: minute ventilation

Rrs: respiratory resistance

doi:10.1371/journal.pone.0171862.t002

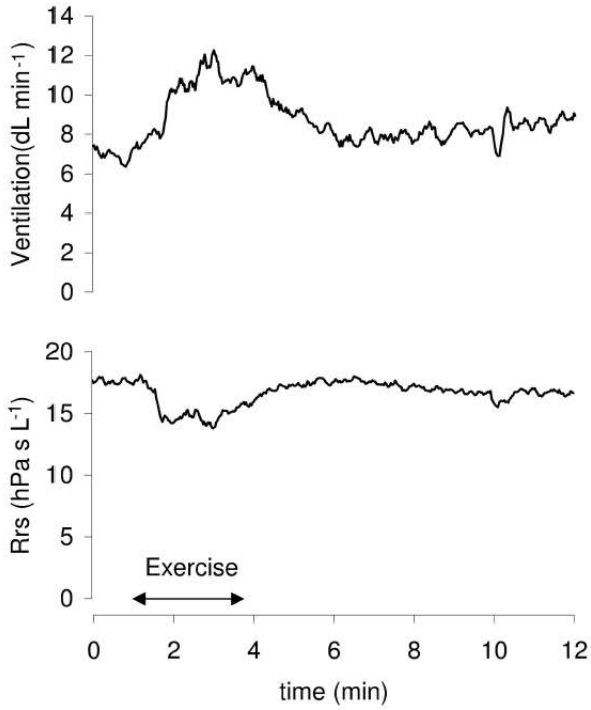


Fig 2. Sequence including rest, exercise and recovery. During electrically induced exercise (horizontal arrow), minute ventilation is increased and respiratory resistance (Rrs) is decreased, indicating concomitant bronchodilation.

doi:10.1371/journal.pone.0171862.g002

to explore the mechanisms of cough but often using irritant compounds (such as citric acid or capsaicin) and rarely dealing with physiological triggers such as exercise is [22–27]. The inflammatory responses shown by the rabbit model, especially in the case of asthma, are comparable with those that occur in humans [28–30]. Indeed, neonatally immunized rabbits exhibit many of the features of human asthma, including airway hyperreponsiveness (AHR) to inhaled antigen [28–30], acute and late-phase airways obstruction [31] and pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment [28, 32], as well as the production of immunoglobulin E (Ig E) antibodies [31]. Since the first rabbit immunisation protocol [33], various antigens (including OVA) have been proposed to allow valuable animal experiment [34]. The OVA model of airway inflammation is characterised by high levels of OVA-specific IgE and eosinophils, a T-cell predominant bronchial inflammatory response, and the development of AHR, which are similar to characteristics of asthma in humans [26]. The rabbit model is also of particular interest because it allows spontaneous breathing (instead of mechanical ventilation for smaller animal models) during anaesthesia, leading to, repeated physiological measurements [34], as well as it shows a similar response to the drugs commonly used in asthmatics [34]. All these similarities between the allergic rabbit model and human asthma provide relevance to this model, therefore allowing the assessment of the modulation of cough during exercise in the present study.

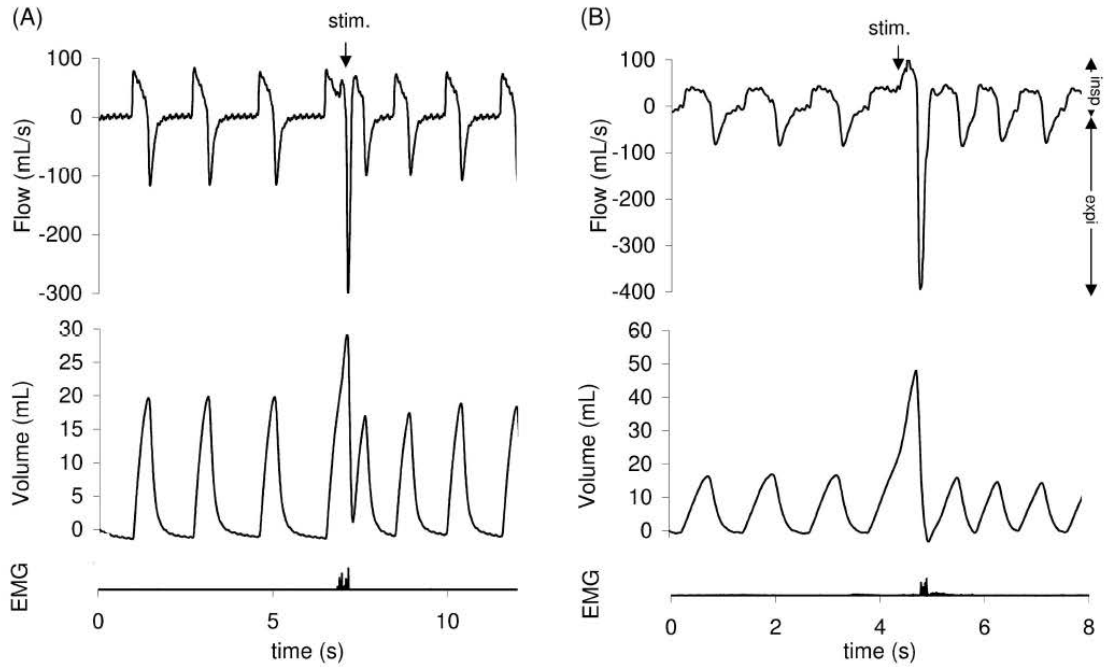


Fig 3. Cough reflex (CR) at rest (A) and during exercise (B). CR is characterized by an increase in both tidal volume (V_T) and peak expiratory flow (V'_{Epeak}). Abdominal muscles electromyogram (EMG) also showed activity on the stimulation breath. The downward arrow indicates the tracheal stimulation. Positive and negative airflow rates indicate inspiration and expiration, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0171862.g003

Exercise represents a quantifiable and reproducible stressor that can be easily modified experimentally [35]. It is also able to trigger various and complex interacting mechanisms within the psycho-neuro-immune-endocrine pathways [36]. Exercise-induced bronchoconstriction (EIB) is common but key aspects of its pathogenesis are still lacking [37]. Regarding to the pathophysiological mechanisms involved, it is generally assumed that exercise-induced asthma/bronchoconstriction involves both osmolar ("airway drying") and vascular ("thermal") modifications of the airways, in addition to parasympathetic stimulation caused by the entrance of fresh air into the respiratory tract [38]. Both hypotheses are based on the marked hyper-ventilation during physical activity, leading to significant water and heat loss through respiration. Increased water loss is responsible for hyper-osmolality of the extracellular fluid

Table 3. Overall tracheal stimulations performed at rest and during exercise (electrically induced muscle contractions) for OVA and control rabbits (expressed as absolute value (percentage)).

	OVA (n = 10)	Control (n = 8)
Total number of stimulations	261 (53%)	233 (47%)
Stimulations at rest	141/261 (54%)	130/233 (56%)
Stimulations during exercise	120/261 (46%)	103/233 (44%)

OVA: Ovalbumin-sensitized rabbits

doi:10.1371/journal.pone.0171862.t003

Table 4. Cough threshold (CT) at rest and during exercise for OVA and control rabbits. Data expressed in ms (mean ± SD).

	OVA (n = 10)	Control (n = 8)	p
Rest-CT (ms)	230 ± 294	62 ± 35	NS (0.1304)
Exercise-CT (ms)	190 ± 184	125 ± 46	NS (0.3463)

OVA: Ovalbumin-sensitized rabbits
CT: Cough threshold

doi:10.1371/journal.pone.0171862.t004

lining the bronchial mucosa [39] further leading to the release of inflammatory mediators from mast cells, eosinophils, neutrophils, and other inflammatory cells, including newly formed eicosanoids [40, 41]. The epithelium may act as a key regulator of the balance of eicosanoids in the airways by both the induction of the release of constrictive eicosanoids and by the downregulation of the release of the relaxant PGE_2 [42]. Several airway TRP ion channels have been shown to sense and react to ambient air temperature opening new windows in the understanding of the pathogenesis in a diversity of airway reactions, particularly cough, appearing in many common respiratory diseases [43].

Only poor information is available regarding to the modulation of cough during human activities [5] but common low-level stimuli such as eating, drinking, talking, laughing, singing or exercising have been shown to cause cough, suggesting the emergence of a new concept (even if little explanation has so far been suggested) where cough is considered as a neuropathic disorder [44]. In the field of exercise (although available information is limited and often contradictory), present knowledge seems to indicate that the various adaptive responses brought into action by physical activity may modulate the CR [5], supporting that cough reflex exhibits plasticity at peripheral and central levels [45]. In healthy subjects, it has been shown that cough threshold to distilled water aerosol was increased during exercise and voluntary isocapnic hyperpnea [7]. Our results confirm a physiological decrease in sensitivity (i.e. increased in cough reflex threshold) of the CR during exercise (compared to sensitivity at rest) in anesthetized rabbits, as previously described [8]. Overall, it appears that cough is depressed (i.e. downregulated) when ventilation increases, at least during isocapnic hyperpnea triggered by exercise.

Exercise-induced cough is frequent in asthmatic patients [9] or even in athletes developing airway inflammation [10], suggesting the potential of exercise to trigger cough. Our study shows an unchanged CR sensitivity during exercise in the OVA sensitized and challenged rabbits in contrast with the decrease of CR in the control animals. The impact of exercise in the modulation of cough is often discussed with respect to the state of contraction/relaxation of airway smooth muscle as a consequence of the numerous adaptive responses (involving neural and mechanical mechanisms) generated during physical activity and principally leading to exercise-induced bronchodilation [14,46,47]. As bronchoconstriction is able to modulate cough by enhancing the CR [48], one might expect that bronchodilation would decrease cough induced by mechanical stimulation of the airways [8]. Indeed, both groups (OVA and Control) showed a similar bronchodilation during exercise as suggested by the significant decrease of respiratory resistance (Table 2). There was also no difference either in the increase of V'_E or the decrease of Rrs between OVA and control rabbits. With regard to this comparable state of hyperventilation and bronchodilation during exercise, the modulation of cough appeared however different between OVA (lack of desensitization) and controls (desensitization). Bronchodilation *per se* unlikely explains the differences in the effect of exercise on the CR. Some human studies have pointed out that bronchodilation may fail to affect CR sensitivity [49], as well as exercise without evidence of bronchodilation may increase cough threshold [7].

Our results highlight the contribution of allergen-induced experimental airway inflammation in the modulation of the CR during exercise. It has been shown that cough is associated with chronic eosinophilic disorders (such as asthma, cough-variant asthma or even eosinophilic bronchitis) [30, 31]. However, the relationship between cough receptor sensitivity and eosinophilic inflammation of the airway in patients with asthma or allergic rhinitis still remains unclear [50]. It is hypothesized that eosinophils in contact with sensory airway nerves [51] cause an eosinophil-dependent neuro-inflammation able to enhance cough [52]. Even the specific mechanisms by which this inflammation modulate the CR have not been established, it however seems that inflammatory mediators, indirectly released, sensitize airway neuronal responses to capsaicin involving the activation of the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) [44, 53]. In a previous study in Brown-Norway rats [37], no control rats with or without exercise showed evidence of Exercise-Induced Bronchoconstriction (EIB) but 80% of the OVA-sensitized rats demonstrated abnormal breath sounds upon exposure to aerosolized OVA and 30% of OVA-sensitized rats exposed only to exercise had abnormal breath sounds. Lung tissue levels of TNF-α, IL-1α, growth-related oncogene/keratinocyte/chemoattractant, and IFN-γ were significantly higher ($P < 0.001$) in the OVA-sensitized group. Most of these cytokines were not altered in the OVA-sensitized rats exposed only to exercise, suggesting a different mechanism of EIB [37].

If the evidence of an airway inflammation in OVA rabbits suggests a modulation of cough at a peripheral sensory nerves level, the contribution of a modulation at a central level should also be questioned. Indeed, the brainstem respiratory network should be considered as a key integrator regarding to the different afferent inputs upstream from triggering defensive airway reflexes. Moreover, coughing and breathing are initiated by neurons situated in very close (even overlapping) areas of the brainstem [54, 55]. Thus, facing a tracheal mechanical stimulation, the central respiratory integrator should trigger the most adapted motor response proper to the prevailing needs of both conditions (i.e exercise and rest) [8, 55]. The decrease of cough during exercise in control rabbits then suggests that the respiratory pattern generator favours an increase of respiratory activity and inhibits airway defensive reflexes, whereas in OVA rabbits the airway inflammation prevents the development of the exercise-driven inhibition of the defensive reflexes. This lack of desensitization of cough during exercise in OVA rabbits would make teleological sense because airways remodelling associated with airway inflammation may be considered as a weak point (facing the potential insult to the airways caused by hyperventilation during exercise [56]), allowing the preservation of defensive reflexes.

Conclusions

Our results confirm a decrease of cough during exercise in control rabbits and suggest for the first time the lack of desensitization in OVA-sensitized and challenged rabbits. This result contributes to explain the higher susceptibility to cough of asthmatics during exercise. Further studies are needed to explore the underlying inflammatory mechanisms contributing to the absence of the CR desensitization physiologically-associated to exercise.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge A-L. Leblanc for her helpful technical assistance.

Author Contributions

Conceptualization: AT BC MP.

Data curation: AT BC MP BD.

Formal analysis: AT BC MP.

Investigation: AT BC MP BD LF CC SDA.

Methodology: AT BC MP BD LF CC SDA.

Project administration: AT BC.

Resources: AT BC MP BD LF CC SDA.

Software: AT BC MP BD.

Supervision: AT BC MP.

Validation: AT BC MP BD.

Visualization: AT BC MP.

Writing – original draft: AT BC MP BD LF CC SDA.

Writing – review & editing: AT BC MP.

References

1. Widdicombe JG. Receptors in the trachea and bronchi of the cat. The Journal of physiology. 1954; 123:71–104. PMID: 13131247
2. Widdicombe JG. Respiratory reflexes from the trachea and bronchi of the cat. The Journal of physiology. 1954; 123:55–70. PMID: 13131246
3. Belvisi MG, Geppetti P. Cough. 7: Current and future drugs for the treatment of chronic cough. Thorax. 2004; 59:438–40. doi: 10.1136/thx.2003.013490 PMID: 15115877
4. Mutolo D, Cinelli E, Iovino L, Pantaleo T, Bongianni F. Downregulation of the cough reflex by aclidinium and tiotropium in awake and anesthetized rabbits. Pulmonary pharmacology & therapeutics. 2016; 38:1–9.
5. Widdicombe J, Fontana G, Gibson P. Workshop—cough: exercise, speech and music. Pulmonary pharmacology & therapeutics. 2009; 22:143–7.
6. Turner DL. Cardiovascular and respiratory control mechanisms during exercise: an integrated view. The Journal of experimental biology. 1991; 160:309–40. PMID: 1960517
7. Lavorini F, Fontana GA, Chellini E, Magni C, Duranti R, Widdicombe J. Desensitization of the cough reflex by exercise and voluntary isocapnic hyperpnea. J Appl Physiol. 2010; 108:1061–8. doi: 10.1152/japplphysiol.00423.2009 PMID: 20093671
8. Poussel M, Bosser G, Varechova S, Demoulin B, Chalon B, Ruckebusch O, et al. Desensitization of the cough reflex during limb muscle contraction in anesthetized rabbits. Pulmonary pharmacology & therapeutics. 2014; 27:96–101.
9. Boulet LP, O'Byrne PM. Asthma and exercise-induced bronchoconstriction in athletes. The New England journal of medicine. 2015; 372:641–8. doi: 10.1056/NEJMra1407552 PMID: 25671256
10. Kennedy MD, Davidson WJ, Wong LE, Traves SL, Leigh R, Eves ND. Airway inflammation, cough and athlete quality of life in elite female cross-country skiers: A longitudinal study. Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2015.
11. Ali S, Metzger WJ, Mustafa SJ. Simultaneous measurement of cyclopentyladenosine-induced contraction and intracellular calcium in bronchial rings from allergic rabbits and it's antagonism. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 1996; 278:639–44. PMID: 8768714
12. Petak F, Hantos Z, Adamicza A, Gality H, Habre W. Development of bronchoconstriction after administration of muscle relaxants in rabbits with normal or hyperreactive airways. Anesthesia and analgesia. 2006; 103:103–9. doi: 10.1213/01.ane.0000221439.87488.08 PMID: 16790635
13. Chambers MA, Williams A, Gavier-Widen D, Whelan A, Hall G, Marsh PD, et al. Identification of a Mycobacterium bovis BCG auxotrophic mutant that protects guinea pigs against M. bovis and hematogenous spread of Mycobacterium tuberculosis without sensitization to tuberculin. Infection and immunity. 2000; 68:7094–9. PMID: 11083835
14. Marchal F, Demoulin B, Schweitzer C, Leblanc AL, Bertin N. Airway response to induced muscular contraction in spontaneously breathing rabbits. Respiratory physiology & neurobiology. 2008; 160:224–31.

15. Schweitzer C, Demoulin B, Varechova S, Poussel M, Marchal F. Neural control of airway to deep inhalation in rabbits. Respiratory physiology & neurobiology. 2011; 177:169–75.
16. Cross BA, Davey A, Guz A, Katona PG, MacLean M, Murphy K, et al. The role of spinal cord transmission in the ventilatory response to electrically induced exercise in the anaesthetized dog. The Journal of physiology. 1982; 329:37–55. PMID: 6292406
17. Haouzi P, Chenuel B. Control of arterial PCO2 by somatic afferents in sheep. The Journal of physiology. 2005; 569:975–87. doi: 10.1113/jphysiol.2005.089649 PMID: 16223767
18. Poussel M, Varechova S, Demoulin B, Chalon B, Schweitzer C, Marchal F, et al. Nasal stimulation by water down-regulates cough in anesthetized rabbits. Respiratory physiology & neurobiology. 2012; 183:20–5.
19. Varechova S, Poussel M, Demoulin B, Chenuel B, Schweitzer C, Marchal F. Within breath ventilatory responses to mechanical tracheal stimulation in anaesthetised rabbits. Pulmonary pharmacology & therapeutics. 2010; 23:397–402.
20. Varechova S, Poussel M, Schweitzer C, Demoulin B, Chenuel B, Marchal F. Stimulus response latency of cough and expiration reflex depends on breathing in the rabbit. Pulmonary pharmacology & therapeutics. 2012; 25:242–7.
21. Varechova S, Demoulin B, Poussel M, Chenuel B, Marchal F. Cough threshold and reactivity to mechanical stimulation of the trachea in the rabbit preliminary observations. Bratislavske lekarske listy. 2011; 112:136–9. PMID: 21452765
22. Jackson DM. The effect of nedocromil sodium, sodium cromoglycate and codeine phosphate on citric acid-induced cough in dogs. British journal of pharmacology. 1988; 93:609–12. PMID: 2836011
23. Schelegle ES, Gershwin LJ, Miller LA, Fanucchi MV, Van Winkle LS, Gerriets JP, et al. Allergic asthma induced in rhesus monkeys by house dust mite (Dermatophagoides farinae). The American journal of pathology. 2001; 158:333–41. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63973-9 PMID: 11141508
24. Duz M, Whittaker AG, Love S, Parkin TD, Hughes KJ. Validation of a digital audio recording method for the objective assessment of cough in the horse. Research in veterinary science. 2010; 89:266–71. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.03.005 PMID: 20363008
25. Liu Q, Fujimura M, Tachibana H, Myou S, Kasahara K, Yasui M. Characterization of increased cough sensitivity after antigen challenge in guinea pigs. Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 2001; 31:474–84.
26. Kamaruzaman NA, Kardia E, Kamaldin N, Latahir AZ, Yahaya BH. The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy. BioMed research international. 2013; 2013:691830. doi: 10.1155/2013/691830 PMID: 23653896
27. Clay E, Patacchini R, Trevisani M, Preti D, Brana MP, Spina D, et al. Ozone-Induced Hypertussive Responses in Rabbits and Guinea Pigs. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2016; 357:73–83. doi: 10.1124/jpet.115.230227 PMID: 26837703
28. Herd CM, Donigi-Gale D, Shoupe TS, Burroughs DA, Yeadon M, Page CP. Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor and leukotriene antagonist (PF 5901) on antigen-induced airway responses in neonatally immunized rabbits. British journal of pharmacology. 1994; 112:292–8. PMID: 8032653
29. Herd CM, Gozzard N, Page CP. Capsaicin pre-treatment prevents the development of antigen-induced airway hyperresponsiveness in neonatally immunised rabbits. European journal of pharmacology. 1995; 282:111–9. PMID: 7498265
30. Bloom JW, Baumgartener-Folkerts C, Palmer JD, Halonen M. Airway cholinergic responsiveness in rabbits in relation to antigen sensitization and challenge. Immunopharmacology. 1988; 15:157–67. PMID: 3292455
31. Shampain MP, Behrens BL, Larsen GL, Henson PM. An animal model of late pulmonary responses to Alternaria challenge. The American review of respiratory disease. 1982; 126:493–8. doi: 10.1164/arrd.1982.126.3.493 PMID: 6889825
32. Marsh WR, Irvin CG, Murphy KR, Behrens BL, Larsen GL. Increases in airway reactivity to histamine and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. The American review of respiratory disease. 1985; 131:875–9. doi: 10.1164/arrd.1985.131.6.875 PMID: 4003939
33. Pinckard RN, Halonen M, Palmer JD, Butler C, Shaw JO, Henson PM. Intravascular aggregation and pulmonary sequestration of platelets during IgE-induced systemic anaphylaxis in the rabbit: abrogation of lethal anaphylactic shock by platelet depletion. J Immunol. 1977; 119:2185–93. PMID: 915295
34. Keir S, Page C. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. Pulmonary pharmacology & therapeutics. 2008; 21:721–30.
35. Hoffman-Goetz L, Pedersen BK. Exercise and the immune system: a model of the stress response? Immunology today. 1994; 15:382–7. doi: 10.1016/0167-5699(94)90177-5 PMID: 7916952

36. Verratti V. Neuroimmune biology of physical exercise. Journal of biological regulators and homeostatic agents. 2009; 23:203–6. PMID: 19828098

37. Kodesh E, Zaldivar F, Schwindt C, Tran P, Yu A, Camilon M, et al. A rat model of exercise-induced asthma: a nonspecific response to a specific immunogen. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2011; 300:R917–24. doi: 10.1152/ajpregu.00270.2010 PMID: 21228339

38. Del Giacco SR, Firinu D, Bjermer L, Carlsen KH. Exercise and asthma: an overview. European clinical respiratory journal. 2015; 2:27984. doi: 10.3402/ecrj.v2.27984 PMID: 26672959

39. Anderson SD, Daviskas E. The mechanism of exercise-induced asthma is. The Journal of allergy and clinical immunology. 2000; 106:453–9. doi: 10.1067/mai.2000.109822 PMID: 10984363

40. Hallstrand TS, Henderson WR Jr. Role of leukotrienes in exercise-induced bronchoconstriction. Current allergy and asthma reports. 2009; 9:18–25. PMID: 19063820

41. Hallstrand TS, Moody MW, Wurfel MM, Schwartz LB, Henderson WR Jr., Aitken ML. Inflammatory basis of exercise-induced bronchoconstriction. American journal of respiratory and critical care medicine. 2005; 172:679–86. doi: 10.1164/rccm.200412-1667OC PMID: 15947280

42. Hallstrand TS. New insights into pathogenesis of exercise-induced bronchoconstriction. Current opinion in allergy and clinical immunology. 2012; 12:42–8. doi: 10.1097/ACI.0b013e32834ecc67 PMID: 22157157

43. Millqvist E. TRP channels and temperature in airway disease-clinical significance. Temperature (Austin). 2015; 2:172–7.

44. Chung KF, McGarvey L, Mazzone SB. Chronic cough as a neuropathic disorder. The Lancet Respiratory medicine. 2013; 1:414–22. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70043-2 PMID: 24429206

45. Bonham AC, Sekizawa SI, Joad JP. Plasticity of central mechanisms for cough. Pulmonary pharmacology & therapeutics. 2004; 17:453–7; discussion 69–70.

46. Fontana GA, Pantaleo T, Lavorini F, Bongianni F, Mannelli M, Bridge PD, et al. Handgrip-induced airway dilation in asthmatic patients with bronchoconstriction induced by MCh inhalation. J Appl Physiol. 2002; 93:1723–30. doi: 10.1152/japplphysiol.00326.2002 PMID: 12381760

47. Marchal F, Evrot E, Schweitzer C, Demoulin B, Poussel M, Varechova S. Bronchodilation induced by muscular contraction in spontaneously breathing rabbits: neural or mechanical? Respiratory physiology & neurobiology. 2012; 180:311–5.

48. Widdicombe J. Airway receptors. Respiration physiology. 2001; 125:3–15. PMID: 11240149

49. Fujimura M, Sakamoto S, Kamio Y, Matsuda T. Effects of methacholine induced bronchoconstriction and procaterol induced bronchodilation on cough receptor sensitivity to inhaled capsaicin and tartaric acid. Thorax. 1992; 47:441–5. PMID: 1386691

50. Brozmanova M, Calkovsky V, Plevkova J, Bartos V, Plank L, Tatar M. Early and late allergic phase related cough response in sensitized guinea pigs with experimental allergic rhinitis. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca. 2006; 55:577–84.

51. Kingham PJ, McLean WG, Sawatzky DA, Walsh MT, Costello RW. Adhesion-dependent interactions between eosinophils and cholinergic nerves. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology. 2002; 282:L1229–38. doi: 10.1152/ajplung.00278.2001 PMID: 12003778

52. Gu Q, Wiggers ME, Gleich GJ, Lee LY. Sensitization of isolated rat vagal pulmonary sensory neurons by eosinophil-derived cationic proteins. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology. 2008; 294:L544–52. doi: 10.1152/ajplung.00271.2007 PMID: 18178677

53. Sikand P, Premkumar LS. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. The Journal of physiology. 2007; 581:631–47. doi: 10.1113/jphysiol.2006.118620 PMID: 17363391

54. McGovern AE, Davis-Poynter N, Farrell MJ, Mazzone SB. Transneuronal tracing of airways-related sensory circuitry using herpes simplex virus 1, strain H129. Neuroscience. 2012; 207:148–66. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.01.029 PMID: 22306285

55. Bolser DC, Poliacek I, Jakus J, Fuller DD, Davenport PW. Neurogenesis of cough, other airway defensive behaviors and breathing: A holarchical system? Respiratory physiology & neurobiology. 2006; 152:255–65.

56. Larsson K, Tornling G, Gavhed D, Muller-Suur C, Palmberg L. Inhalation of cold air increases the number of inflammatory cells in the lungs in healthy subjects. The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 1998; 12:825–30.

Annexe 3

PO 077. Influence of ovalbumine sensitization on the down-regulation of cough during exercise in rabbits

Angelica Tiotiu, Laurent Foucaud, Bruno Demoulin, Silvia Varechova, Bruno Chenuel, Mathias Poussel
EA 3450 DevAH – Development, Adaptation and Disadvantage, Cardio-Respiratory Regulations and Motor Control, Lorraine, France

Introduction: The 'cough centre' exhibits plasticity at the sensor and the integration levels leading to modulation
of the reflex, but little is known about interactions between cough and exercise. On a clinical point of view, cough is a major symptom of asthma frequently experienced during exercise. Our study was designed to determine whether exercise is able to modulate the cough reflex (CR) of ovalbumine (OVA) sensitized rabbits.

Materials and methods: Ten OVA rabbits and eight controls were studied. Exercise was mimicked by electrically induced muscular contractions. Tracheal stimulation (performed at rest and during exercise) was mechanically delivered via a catheter. Broncho-alveolar lavage (BAL) and OVA intradermal challenge were performed to evaluate inflammation.

Results: An overall of 494 tracheal stimulations were analysed (271 at rest; 223 at exercise). OVA rabbits showed higher total cell count (P = 0.04) and percentage of eosinophil count (P = 0.008) in BAL fluid compared to controls. Minute ventilation between rest and exercise increased from 36 and 35% in OVA and control rabbits respectively (P = NS). Control rabbits showed a decreased sensitivity of the CR during exercise compared to baseline (P = 0.0313) whereas the sensitivity of the CR was unchanged (P = NS) between both conditions (i.e. rest and exercise) in OVA rabbits.

Conclusion: Our results support a down-regulation of cough during exercise in control rabbits that appeared to be abolished (i.e. absence of down-regulation) in OVA rabbits. The inflammation present in OVA rabbits may be involved (at a central and/or sensor levels) in this different (i.e. compared to controls) cough modulation during exercise.

Acta Physiol 2016, 217 (Suppl. 708), 3–158

FEPS & FPS AWARD



This award is dedicated to Angelica...TIOTIU... by FEPS & FPS

Title of the Presentation :

Influence - - - - - - - - rabbits.

JOINT MEETING OF THE FEDERATION OF EUROPEAN PHYSIOLOGICAL SOCIETES & THE FRENCH PHYSIOLOGICAL SOCIETY

PARIS 2016

The President of FEPS
Pr Markus HECKER

The President of FPS
Pr Georges LEFTHERIOTIS

JULY 1ST 2016

RESUME

Introduction : La toux est un symptôme fréquent dans l'asthme, en particulier à l'effort mais peu des choses sont connus quant aux mécanismes impliqués. L'objectif de cette étude a été d'établir le rôle de l'exercice dans la modulation du réflexe de toux (RT) sur un modèle de lapin anesthésié en ventilation spontanée, présentant une inflammation éosinophilique des voies aériennes.

Méthode : Nous avons étudié 10 lapins sensibilisés à l'ovalbumine (OVA) et 8 lapins contrôles. La réponse ventilatoire à la stimulation mécanique trachéale (ST) a été analysée pour chaque lapin en conditions de repos et à l'exercice pour quantifier l'incidence et la sensibilité de la toux. Le lavage bronchioloalaveolaire (LBA) et le comptage cellulaire a été réalisé pour vérifier la présence d'une inflammation à éosinophiles chez les lapins sensibilisés à l'OVA. Pour reproduire l'exercice, des contractions musculaires au niveau des pattes arrière ont été induites par stimulation électrique (CME).

Résultats : Au total, 494 ST ont été réalisées, 261 en repos et 233 à l'exercice. Le taux d'éosinophiles dans le LBA a été retrouvé significativement plus élevé chez les lapins sensibilisés à l'OVA (*vs* contrôles, p=0.008). La CME a permis une augmentation similaire de l'ordre de 35% de la ventilation minute chez les lapins sensibilisés à l'OVA et chez les lapins contrôles par rapport au repos. La sensibilité du RT a été retrouvée significativement diminuée à l'exercice par rapport au repos pour les lapins contrôles (p=0.0313) contrairement aux lapins sensibilisés à l'OVA pour lesquels elle reste inchangée.

Conclusion : Le phénomène de "down-regulation" du RT à l'exercice décrit chez les lapins contrôles n'a pas été observé chez les lapins sensibilisés à l'OVA. D'autres études sont nécessaires afin d'établir le rôle spécifique de l'inflammation bronchique sur la disparition du phénomène de "down-regulation" de la toux à l'exercice chez les patients asthmatiques.

Mots clés : réflexe de toux, stimulation trachéale, exercice, sensibilisation, lapin

ABSTRACT

Introduction: Cough is a major symptom of asthma frequently experienced during exercise but little is known about interactions between cough and exercise. The goal of our study was to clarify the potential modulation of the cough reflex (CR) by exercise in a spontaneously breathing anaesthetized animal model of airway eosinophilic inflammation.

Materials & methods: Ten ovalbumin (OVA) sensitized rabbits and 8 controls were studied. The ventilatory response to direct (TS) performed both at rest and during exercise was determined to quantify the incidence and the sensitivity of the CR. Broncho-alveolar lavages (BAL) and cell counts were performed to assess the level of the airway inflammation following OVA-induced sensitization. Exercise was mimicked by electrically induced hindlimb muscular contractions (EMC).

Results: Among 494 TS were performed, 261 at rest and 233 at exercise. The OVA sensitized rabbits have a higher level of eosinophil (p=0.008) in BAL. EMC increased minute ventilation by 36% in OVA rabbits *vs* 35% in control rabbits, compared to rest values. The sensitivity of the CR decreased during exercise compared to baseline in control rabbits (p=0.0313) while it remained unchanged in OVA rabbits.

Conclusion: The down-regulation of the CR during exercise in control rabbits was abolished in OVA rabbits. The precise role of airway inflammation in this lack of CR downregulation needs to be further investigated but it might contribute to the exercise-induced cough in asthmatics.

Keywords: Cough reflex; Mechanical stimulation; Exercise; Ovalbumin; Rabbit