



HAL
open science

Reflexe de toux et sa modulation par la stimulation nasale par l'eau chez le lapin anesthésié

Mathias Poussel

► **To cite this version:**

Mathias Poussel. Reflexe de toux et sa modulation par la stimulation nasale par l'eau chez le lapin anesthésié. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0181 . tel-01751106

HAL Id: tel-01751106

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751106v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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>

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

Mathias POUSSEL

**REFLEXE DE TOUX ET SA MODULATION PAR LA STIMULATION
NASALE PAR L'EAU CHEZ LE LAPIN ANESTHÉSIÉ**

01 12 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Christian STRAUS PU-PH, Hôpital Universitaire Pitié-Salpêtrière, Paris

M. Sam BAYAT PU-PH, Université de Picardie Jules Verne, Amiens

Examineurs :

M. Bruno CHENUÉL PU-PH, Université de Lorraine, Nancy (Directeur)

Mme. Silvia VARECHOVA MCU-PH, Université de Lorraine, Nancy

*« Voyager, c'est bien utile, ça fait travailler l'imagination.
Tout le reste n'est que déceptions et fatigues.
Notre voyage à nous est entièrement imaginaire. Voilà sa force.*

*Il va de la vie à la mort.
Hommes, bêtes, villes et choses, tout est imaginé.
C'est un roman, rien qu'une histoire fictive.
Littré le dit, qui ne se trompe jamais.*

*Et puis d'abord tout le monde peut en faire autant.
Il suffit de fermer les yeux.*

C'est de l'autre côté de la vie. »

Louis Ferdinand Céline
Voyage au bout de la nuit

« Mehr Licht... »

Johann Wolfgang von Goethe

REMERCIEMENTS

A mes directeurs de thèse

Monsieur le Professeur Bruno CHENUÉL

Professeur de Physiologie

Ce travail vient consolider encore un peu plus notre entreprise.

Merci pour ton constant soutien, ta sincérité et ton ouverture d'esprit.

Merci au Professeur et surtout Merci à l'Ami.

Mme le Docteur Silvia VARECHOVA

Maître de Conférences des Universités de Physiologie

Merci pour m'avoir accompagné dans ce travail.

Merci pour ton implication, tes conseils et tes remarques pertinentes et constructives.

A mes rapporteurs de thèse

Monsieur le Professeur Christian STRAUS
Professeur de Physiologie

&

Monsieur le Professeur Sam BAYAT
Professeur de Physiologie

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

A la mémoire de mon Grand-Père, Colonel Edouard POUSSEL (1922-2005),

Chevalier de la Légion d'Honneur.

Pour ces inoubliables moments à Ventabren.

An meine Oma,

dein Goldener Junge wird ich für immer bleiben.

A ma femme Cécile,

ta présence à mes côtés m'est chaque jour un peu plus indispensable.

A mon fils Louis,

ma lumière.

A ma fille Jeanne,

mon étoile.

A mon père,

pour l'essentiel : l'Education, l'Escrime et la Médecine.

An meine Mutter,

für alles was man braucht um sich wohl zu fühlen.

A ma sœur Astrid.

A mes beaux parents.

A mes Maîtres d'Armes,

Jean-Paul & Maurice.

A mes frères d'Armes,

Jean-Pascal, Jonathan et Stanislas.

A mes compagnons de DESC de Médecine du Sport,

Jean, Julien, Emilien, Pierre, Laure, Antoine et tous les autres.

A l'ensemble du Service des Explorations de la Fonction Respiratoire et de l'Aptitude à l'Exercice du CHRU de Nancy.

A mes amis.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION

LA TOUX

A. LES RÉFLEXES DE DÉFENSE RESPIRATOIRE : RÉFLEXE DE TOUX ET RÉFLEXE EXPIRATOIRE **17**

1. DESCRIPTION DES DIFFÉRENTES PHASES DU RÉFLEXE DE TOUX	18
1.1. PHASE INSPIRATOIRE	18
1.2. PHASE COMPRESSIVE	19
1.3. PHASE EXPIRATOIRE	20
2. MÉCANIQUE DU RÉFLEXE DE TOUX	21

B. ORGANISATION GÉNÉRALE DU RÉFLEXE DE TOUX **23**

1. LES TRAVAUX FONDATEURS DE J. WIDDICOMBE	23
2. INDIVIDUALISATION DES AFFÉRENCES NERVEUSES RÉGULANT LA TOUX CHEZ LE COCHON D'INDE : FIBRES A-Δ OU « RÉCEPTEUR DE LA TOUX »	25
3. RARs (RAPIDLY ADAPTING PULMONARY STRETCH RECEPTORS) INTRA-PULMONAIRES	28
4. LES FIBRES C	30
5. TERMINAISONS CENTRALES DES AFFÉRENCES NERVEUSES DES VOIES AÉRIENNES ET PULMONAIRES	33

C. MODULATION DU RÉFLEXE DE TOUX : RÔLE DES AFFÉRENCES NASALES ET RÉFLEXE DE PLONGÉE **35**

1. AFFÉRENCES NASALES ET MODULATION DU RÉFLEXE DE TOUX	35
1.1. SENSIBILISATION DU RÉFLEXE DE TOUX ET RHINITE CHRONIQUE : ÉVIDENCES CLINIQUE ET EXPÉRIMENTALES	36
1.2. RÔLE DES AFFÉRENCES NASALES DANS LA MODULATION DU RÉFLEXE DE TOUX	38
1.3. DÉSENSIBILISATION DU RÉFLEXE DE TOUX ET AFFÉRENCES NASALES	40
2. LE RÉFLEXE DE PLONGÉE	42

ETUDE PRELIMINAIRE

A. RÉPONSE VENTILATOIRE À LA STIMULATION TRACHÉALE MÉCANIQUE DISCRIMINANTE CHEZ LE LAPIN ANESTHÉSIÉ **47**

1. INTRODUCTION	47
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	48
2.1. ANESTHÉSIE & PRÉPARATION CHIRURGICALE	48
2.2. ACQUISITION DES SIGNAUX ET VARIABLES VENTILATOIRES	49
2.3. STIMULATION TRACHÉALE ET PROTOCOLE	50
2.4. ANALYSE DES DONNÉES	50
3. RÉSULTATS	51

3.1. INCIDENCE ET TYPES DE RÉPONSES	51
3.2. ANALYSE QUANTITATIVE DES RÉPONSES	52
4. DISCUSSION	52

ETUDE

A. INTRODUCTION	56
B. MATÉRIEL ET MÉTHODES	58
1. ANESTHÉSIE ET PRÉPARATION CHIRURGICALE	58
1.1. ANESTHÉSIE	58
1.2. PRÉPARATION CHIRURGICALE	58
2. ACQUISITION DES SIGNAUX	60
3. VARIABLES VENTILATOIRES	60
4. STIMULATION TRACHÉALE	60
5. STIMULATION NASALE	62
6. ELECTROMYOGRAPHIE DES MUSCLES ABDOMINAUX	63
7. PROTOCOLE	63
8. ANALYSE DES DONNÉES	64
C. RÉSULTATS	66
D. DISCUSSION	72
E. CONCLUSION	78

CONCLUSION

REFERENCES

LISTE DES ABREVIATIONS

AR : Absence de Réponse

aRE : Réflexe expiratoire atténué

ARNm : Acide ribonucléique messenger ARNm

ATP : Adénosine TriPhosphate

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide

ET : Ecart Type

5-HT : 5- Hydroxytryptamine

nTS : Noyau du tractus solitaire

PA : Potentiel d'Action

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

RARs : Rapidly Adapting Pulmonary stretch Receptors

RE : Réflexe Expiratoire

RT : Réflexe de Toux

RT-PCR : Retrotranscriptase-PCR

SARs : Slowly Adapting Pulmonary stretch Receptors

TE : Temps expiratoire

Ti : Temps inspiratoire

TRP : Transient Receptor Potential

TRPA1 : Transient Receptor Potential Ankyrin 1

TRPV : Transient Receptor Potential Vanilloid

V'E_{pic} : Pic de débit expiratoire

V_T : Volume courant

INTRODUCTION

Depuis la découverte des centres respiratoires dans le tronc cérébral (pont et bulbe rachidien) au début du 19^{ème} siècle, l'intérêt porté à l'étude du contrôle de la ventilation et des réflexes de défense respiratoire n'a cessé de croître. Dès 1840, Williams est l'un des premiers à décrire plus précisément le réflexe de toux en provoquant un puissant effort expiratoire associé à une fermeture de glotte, par l'insertion de son doigt dans le larynx d'un chien non anesthésié (Widdicombe, 2006a).

Sur le plan clinique, la toux est l'un des motifs les plus fréquents de consultation médicale. Aux Etats-Unis, la toux chronique représente 10 à 38% des consultations ambulatoires pour un pneumologue tandis qu'en Grande-Bretagne, le nombre de prescriptions d'antitussifs atteint 3 millions/an, soit un budget annuel de 2,8 millions d'euros. La toux peut être le symptôme de très diverses pathologies respiratoires telles que l'asthme ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) mais pas seulement, avec l'exemple du reflux gastro-oesophagien. Dans ces situations cliniques, elle peut être aiguë ou chronique, et plus particulièrement chez l'enfant, la toux est considérée comme un équivalent de maladie asthmatique. Si le praticien aborde la toux comme un unique symptôme dont la finalité est la protection des voies aériennes et des poumons, le physiologiste intéressé par les mécanismes physiopathologiques qui sont à l'origine de ce réflexe, décrit plusieurs entités distinctes telles que le réflexe de toux (RT) et le réflexe expiratoire (RE) (Fontana and Widdicombe, 2007; Korpas, 1972) en fonction de la préexistence ou non d'un brève période d'inspiration initiale.

La toux est un acte réflexe, qui repose sur le trépied classique : récepteurs, centres coordinateurs et effecteurs, reliés entre eux par respectivement des voies afférentes et des voies efférentes (Figure 1). Ces réflexes de défense respiratoire, dont la fonction première est d'éliminer des voies aériennes les sécrétions et les corps étrangers, sont principalement déclenchés à partir d'une stimulation du larynx,

de la trachée ou des bronches proximales. Les stimuli à l'origine d'une toux sont variés : stimulation mécanique trachéale, accumulation de sécrétions, aspiration, particules solides, capsaïcine, bradykinine, ainsi que les modifications à l'origine d'une altération du pH ou de la tonicité du liquide bronchique. On distingue plusieurs types de récepteurs sensitifs comme les « Slowly Adapting Pulmonary stretch Receptors » ou SARs, les « Rapidly Adapting Pulmonary stretch Receptors » ou RARs et les fibres C. Les voies afférentes sont essentiellement vagues et gagnent le tronc cérébral par la racine dorsale de la moelle avant de pénétrer dans le tronc cérébral pour se projeter dans le bulbe vers le noyau du tractus solitaire. Il existe de nombreuses connexions corticales ou avec les noyaux des neurones respiratoires et il semble qu'un centre de la toux existerait à proximité du complexe pré-Boetzingier. Les voies efférentes empruntent le nerf phrénique pour le diaphragme, les nerfs spinaux pour les muscles expiratoires et les nerfs laryngés pour la glotte. Les nombreuses afférences nerveuses des voies aériennes (supérieures et inférieures) ainsi que celles du médiastin, des muscles respiratoires et de la paroi thoracique participent à la régulation de la toux (seuil et intensité). Néanmoins, ce sont les afférences vagues, innervant très majoritairement les voies aériennes intra et extra-pulmonaires, qui participent le plus souvent à la régulation de la toux (Chung and Widdicombe, 2009).

Dans une première partie, nous aborderons successivement les différentes phases de la toux ainsi que les différences entre réflexe de toux et réflexe expiratoire, les bases physiologiques de ces réflexes de défense respiratoire, et enfin le rôle des afférences nasales et du réflexe de plongée dans la modulation de cette réponse défensive. Dans une seconde partie, nous détaillerons les différentes étapes de notre travail : le premier consistant en l'élaboration d'un modèle animal autorisant la distinction d'une réponse défensive propre selon le moment de la stimulation au sein du cycle respiratoire, et le second étudiant la réponse défensive à une stimulation trachéale mécanique dans un contexte de stimulation nasale. Nous développerons plus particulièrement les résultats obtenus sur notre modèle animal original, reproduisant une toux aiguë suite à une stimulation trachéale ponctuelle, dans différentes conditions de stimulation nasale. Enfin, nous confronterons ces

données expérimentales animales aux données obtenues dans la littérature afin d'envisager les perspectives pratiques de nos résultats.

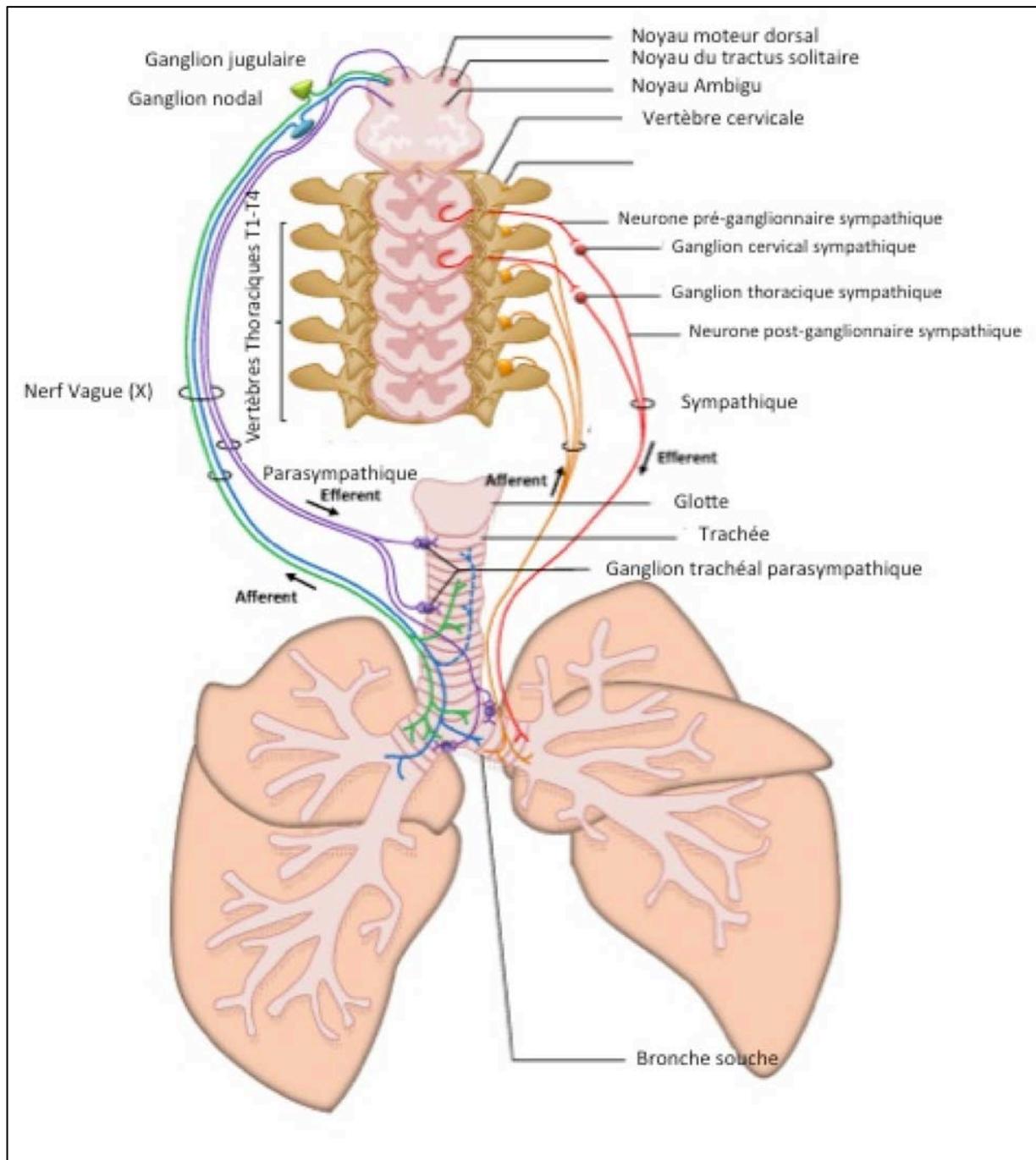


Fig 1 (d'après (Grace et al., 2013)): Représentation schématique de l'innervation des voies aériennes. Le nerf vague contient des afférences sensorielles composées 1 - des fibres C (en vert) innervant les voies aériennes supérieures et inférieures, faisant relais dans le ganglion jugulaire avant de se projeter au niveau du noyau du tractus solitaire, 2 - des fibres C (bleu) innervant les voies aériennes inférieures et les bronches, faisant relais dans le ganglion nodal et 3 - des fibres A- δ (bleu ; ligne brisée) innervant les voies aériennes supérieures et se projetant également au niveau du noyau du tractus solitaire. Le nerf vague contient également des éférences parasympathiques (violet) : Les neurones pré-ganglionnaires parasympathiques (noyau moteur dorsal et noyau ambigu) faisant relais avec les ganglions trachéaux parasympathiques (tonus bronchomoteur ; mucus). Les voies aériennes inférieures et les bronches sont également innervées par des afférences (orange) faisant relais au niveau de la moelle thoracique (T1-T4). Les neurones pré-ganglionnaires et post-ganglionnaires sympathiques (rouge) innervent également les voies aériennes (tonus bronchomoteur).

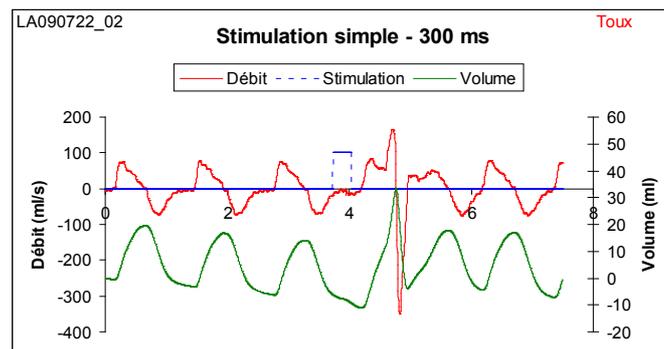
LA TOUX

A. Les réflexes de défense respiratoire : réflexe de toux et réflexe expiratoire

L'appellation « Toux » recouvre en fait bien souvent des réponses ventilatoires différentes justifiant la nécessité de donner une définition précise de ce qui est considéré comme un réflexe de toux (RT). Ainsi, il convient de le distinguer du réflexe expiratoire (RE) (Figure 2, données personnelles).

Le RT est constitué de 3 phases : une première inspiratoire, suivie d'une expiration contre glotte fermée appelée « phase compressive », et se termine par une phase expulsive contemporaine de l'ouverture soudaine de la glotte (McCool and Leith, 1987). Le RE n'est en revanche constitué que des 2 dernières phases du RT, i.e., absence de phase inspiratoire initiale (Widdicombe and Fontana, 2006).

A



B

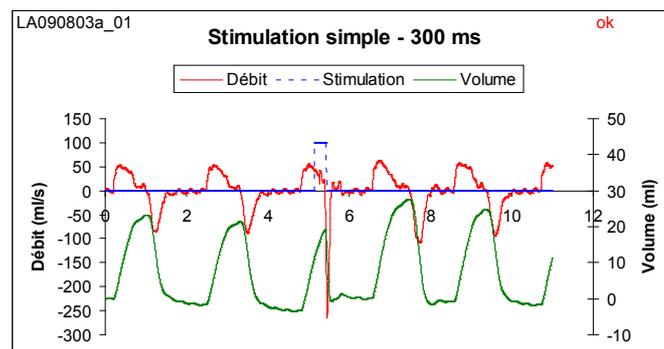


Fig 2: Réponses ventilatoires à une stimulation trachéale mécanique d'une durée de 300 ms. **A:** Réflexe de toux (RT) caractérisé par une augmentation concomitante du volume courant et du débit ventilé. **B:** Réflexe expiratoire (RE) caractérisé par une augmentation du débit ventilé, non précédée d'une augmentation du volume courant.

La différence entre RT et RE ne se limite pas à cette simple description mais intéresse également la finalité, les voies physiologiques impliquées ainsi que les mécanismes de modulations de ces 2 réponses défensives. La fonction de ces 2 réflexes est en réalité diamétralement opposée. En effet, la phase inspiratoire du RT autorise l'entrée importante d'air dans les poumons afin d'augmenter encore un peu plus la force de la phase expulsive afin de l'optimiser. 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. Le RE - du fait de l'absence de phase inspiratoire - détient une finalité propre en prévenant l'entrée de corps étrangers et de particules dans l'arbre trachéo-bronchique.

Plusieurs données suggèrent également que ces 2 réflexes présentent une modulation physiologique différente. Pour exemples : l'activation du réflexe de Hering-Breuer (via 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 CO₂ dans le sang artériel inhibe le RT mais n'affecte pas le RE (Tatar et al., 1986) ; chez le nouveau né, le RE apparaît plus tôt que le RT (Korpas and Kalocsayova, 1973); les agents anesthésiques inhibent plus fortement le RE que le RT (Nishino et al., 1996). L'action des agents pharmacologiques est également différente selon le réflexe considéré. Ainsi, la codéine n'a aucun effet sur le RE aux posologies usuelles, capables en revanche d'inhiber le RT (Korpas, 1972).

1. Description des différentes phases du réflexe de toux

1.1. Phase inspiratoire

Le premier événement de la phase inspiratoire consiste en la contraction des muscles abducteurs du cartilage aryénoïde à l'origine d'une ouverture complète de la glotte facilitant ainsi l'inhalation d'air (Sant'Ambrogio et al., 1997). Le volume d'air inhalé ainsi que le temps de cette phase inspiratoire peuvent être extrêmement variables. Lorsqu'il est demandé à un sujet sain de réaliser volontairement une toux, la durée de la phase inspiratoire varie de 0,45 à 1 sec (moyenne = 0,75 sec) et le

volume inspiré se situe entre 0,09 et 0,53 L (moyenne = 0,39L) avec une corrélation positive entre ces 2 variables (Yanagihara et al., 1966). Lorsque la consigne est de réaliser volontairement une toux aussi violente que possible, la durée de la phase inspiratoire passe alors en moyenne à 0,65 sec et le volume d'air inspiré à 2,5L (Ross et al., 1955). Toutefois, il n'existe que peu de données concernant la régulation de ce volume inspiratoire lors de la phase inspiratoire du réflexe de toux. Il semblerait néanmoins que plus le volume inspiré est important, plus la force développée à la phase explosive est importante. En effet, lorsque les volumes inspirés sont élevés, les muscles expiratoires se trouvent dans une situation optimale pour générer des pressions intrathoraciques et abdominales autorisant une plus grande efficacité de la toux. Par ailleurs, la distension pulmonaire occasionnée par une inspiration profonde est à l'origine d'une activation de certains récepteurs pulmonaires pouvant faciliter la toux via des mécanismes centraux (Hanacek et al., 1984).

1.2. Phase compressive

La fermeture de la glotte signe le début de la phase compressive de la toux. La contraction des muscles expiratoires contre la glotte fermée entraîne une augmentation importante des pressions abdominale, pleurale, alvéolaire et sous-glottique. De façon contemporaine à l'augmentation de la pression pleurale, le gaz alvéolaire se voit comprimer et le volume pulmonaire diminué. La fermeture de la glotte est la principale différence entre la phase compressive du RT et celle du RE. En effet, lors du RE il existe également une augmentation importante des pressions abdominale et intrathoracique à l'origine d'une compression du gaz alvéolaire alors que la glotte reste ouverte (partiellement) et ce en raison des propriétés résistives de l'arbre trachéo-bronchique. Lors de la phase compressive, la contraction des muscles expiratoires est accompagnée de la contraction du diaphragme ainsi que des autres muscles inspiratoires permettant ainsi une contribution supplémentaire au développement de pressions pleurale et alvéolaire positives (Tomori and Widdicombe, 1969).

Bien que la fermeture de glotte ne se produise que pour une très brève durée (de l'ordre de 0,2 sec), l'augmentation de la pression alvéolaire (même si elle peut être très variable) peut être considérable. En effet, à la fin de cette phase compressive, la pression alvéolaire peut excéder les 20kPa (205 cmH₂O), soit 50% à 100% au delà de la pression pouvant être atteinte lors des phases explosives à glotte ouverte (Arora and Gal, 1981; Lavietes et al., 1998). L'augmentation de pression alvéolaire est ainsi voisine de 100kPa/sec. En application de la loi de Boyle-Mariotte, et à considérer un volume pulmonaire de 5L à la fin de la phase inspiratoire avec une pression alvéolaire de 20kPa à la fin de la phase compressive, la réduction de volume pulmonaire résultante d'un tel réflexe est d'environ 1L soit une vitesse de variation du volume pulmonaire de 5L/sec. Cette importante augmentation de la pression pleurale lors de la phase compressive (par rapport à celle observée en l'absence de fermeture de glotte) semblerait liée à un réflexe augmentant l'activité des muscles agonistes et diminuant celle des antagonistes, et/ou à l'optimisation de la force des muscles expiratoires (Von and Isshiki, 1965). A l'image des autres muscles squelettiques, la force développée par les muscles expiratoires est proportionnelle à leur longueur. Il en résulte un indéniable avantage mécanique contribuant à optimiser la force développée lors de la phase compressive de la toux. La fermeture de la glotte empêche la diminution du volume pulmonaire (exception faite de la réduction de volume engendrée par la compression) permettant ainsi aux muscles expiratoires de produire une contraction d'intensité maximale selon la position (i.e. longueur) optimale atteinte en fin de phase inspiratoire. Par ailleurs, du fait de la faible variation de volume pulmonaire lors de la phase compressive, le raccourcissement des fibres musculaires expiratoires est minime, permettant de considérer la contraction des muscles expiratoires comme presque isométrique.

1.3. Phase expiratoire

C'est durant cette phase de la toux que le drainage des voies aériennes survient. Cette phase débute par une active et rapide (20-40 msec) abduction des cartilages aryténoïdes. L'ouverture de la glotte au début de l'expiration est associée à des oscillations passives du gaz exhalé ainsi que des tissus, à l'origine du son caractéristique de la toux. La pression des voies aériennes proximales chute

rapidement pour se rapprocher de la pression atmosphérique, alors que les pressions pleurales et alvéolaires continuent d'augmenter pour une courte durée de l'ordre de 0,5 sec. La durée totale de la phase expiratoire est variable, mais se situe généralement entre 0,5 et 1 sec (Fontana et al., 1999; Yanagihara et al., 1966).

Chez un sujet réalisant volontairement un effort de toux maximal débutant à un volume pulmonaire proche de la capacité pulmonaire totale, le débit expiratoire produit par la toux peut atteindre 10L/sec (Knudson et al., 1974), et les voies aériennes proximales intrathoraciques peuvent se collaber. Cette compression des voies aériennes est à l'origine d'un rapide mais bref déplacement du volume gazeux à des débits considérables, dont la durée avoisine les 30 msec (Knudson et al., 1974). A l'issue de cette première composante de la phase expulsive, les débits de gaz diminuent à environ 50% du débit de pointe de la toux. Ces débits peuvent alors persister pour une durée plus longue pouvant aller jusqu'à la moitié de la durée de la phase expiratoire (Fontana et al., 1999; Yanagihara et al., 1966). Débit et volume pulmonaires décroissent ensuite exponentiellement avec une constante de temps proche de 0,5 sec.

La violente activité des muscles expiratoires lors de la phase expulsive peut avoir des effets délétères, à l'image des traumatismes du larynx et voies aériennes, des fractures costales, ou encore de barotraumatismes (Irwin et al., 1998).

2. Mécanique du réflexe de toux

Les très fortes pressions intrathoraciques générées lors de la contraction (quasi isométrique) des muscles expiratoires lors de la phase compressive de la toux, chutent soudainement lors de l'ouverture de la glotte contemporaine de la phase expulsive. Comme mentionné plus haut, la pression va alors rapidement tendre vers la pression atmosphérique alors que les pressions pleurale et alvéolaire vont continuer à augmenter (ou du moins rester stables) pour encore une courte période. La contraction persistante des muscles expiratoires autorise ainsi une transmission optimale de la force musculaire générée vers les structures pleurale et

alvéolaire. Du fait de l'élasticité du parenchyme pulmonaire, la pression alvéolaire reste toujours supérieure à la pression pleurale, alors que dans le même temps, la pression péri-bronchique reste sensiblement proche de la pression pleurale (Macklem and Wilson, 1965). A l'ouverture de la glotte, la pression au sein des voies aériennes va ensuite diminuer progressivement au fur et à mesure que l'air est vidangé depuis les alvéoles vers les voies aériennes proximales. A un certain point de l'arbre trachéo-bronchique (point d'égalité des pressions), la pression décroissante au sein des voies aériennes va venir égaler la force de rappel élastique du parenchyme pulmonaire. En ce point d'égalité des pressions, les voies aériennes intra-thoraciques se voient alors divisées en 2 segments (en série). L'un en amont de ce point (i.e. jusqu'aux alvéoles pulmonaires) où la pression au sein des voies aériennes reste supérieure à la pression péri-bronchique et les voies aériennes restent béantes. L'autre en aval de ce point d'égalité des pressions où la pression au sein des voies aériennes tend à être inférieure à la pression péri-bronchique et les voies aériennes tendent à se collaber (Figure 3). A l'issue de l'effort expiratoire initial maximal de la toux, les éventuels efforts expiratoires supplémentaires vont accentuer encore un peu plus la compression de ce segment d'aval, et n'auront pas d'effet sur le segment d'amont.

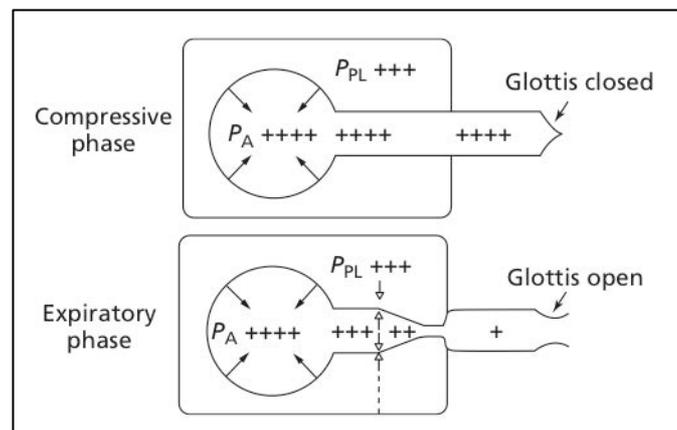


Fig 3 : Description des principaux événements lors de la toux. Lors de la phase compressive, la contraction des muscles expiratoires augmente la pression pleurale (PPL) qui devient ainsi fortement positive. La pression alvéolaire (PA) reste toujours supérieure à la PPL du fait de la force de rappel élastique du parenchyme pulmonaire (flèches). Tant que la glotte reste fermée, la pression intra-bronchique est sensiblement identique à la PA dans l'ensemble des voies aériennes. A l'ouverture de la glotte au début de la phase expiratoire, l'air se déplace d'abord rapidement en suivant le gradient de pression des alvéoles vers la bouche. Ainsi, à un certain point de l'arbre trachéo-bronchique (point

d'égaies pressions), la pression intra-bronchique et la PPL deviennent égales. En amont de ce point, les voies aériennes restent ouvertes alors qu'en aval, elles tendent à se collaber (Knudson et al., 1974).

B. Organisation générale du réflexe de toux

La toux est un réflexe de défense respiratoire principalement déclenché à partir du larynx, de la trachée et des bronches proximales. Les stimuli à l'origine d'une toux sont nombreux : stimulation mécanique trachéale, accumulation de sécrétions, aspiration, particules, capsaïcine, bradykinine, ainsi que les modifications à l'origine d'une altération du pH ou de la tonicité de liquide broncho-alvéolaire. Les nombreuses afférences nerveuses des voies aériennes (supérieures et inférieures) ainsi que celles du médiastin, des muscles respiratoires et de la paroi thoracique participent à la régulation de la toux (seuil et intensité). Néanmoins, ce sont les afférences vagales, innervant très majoritairement les voies aériennes intra et extra-pulmonaires, qui participent le plus souvent à la régulation de la toux. Nous décrivons ici les propriétés physiologiques, morphologiques et pharmacologiques des différentes afférences nerveuses vagales impliquées dans la toux.

1. Les travaux fondateurs de J. Widdicombe

En 1954, Widdicombe est le premier à décrire précisément les caractéristiques des afférences vagales impliquées dans la régulation de la toux (Widdicombe, 1954a, b, c). Initialement, 2 types d'afférences répondant à une stimulation mécanique à type d'inflation pulmonaire sont décrites chez le chat. Parmi ces afférences, la majorité s'adapte lentement vis à vis d'une inflation pulmonaire continue d'où la dénomination en tant que « Slowly Adapting Pulmonary stretch Receptors » ou SARs. Parmi ces SARs, seulement 19% répondent également à une déflation pulmonaire. La plupart des SARs peuvent être activés par une stimulation mécanique appliquée au parenchyme pulmonaire. En revanche la stimulation (distension) trachéale et bronchique n'est pas à même d'activer les SARs suggérant une localisation dans les voies aériennes périphériques et le parenchyme pulmonaire

(alvéoles et bronchioles). Le second type décrit s'adapte quant à lui rapidement à une inflation pulmonaire continue d'où sa dénomination en tant que « Rapidly Adapting Pulmonary stretch Receptors » ou RARs. Parmi ces RARs, 80% répondent également à une déflation pulmonaire.

L'utilisation de cathéters sectorisés permet à Widdicombe de réaliser une stimulation mécanique (distension) sélective au sein des voies aériennes. Il lui est ainsi possible de stimuler sélectivement le parenchyme pulmonaire, la trachée ou encore les différentes générations bronchiques. Cette étude autorise la localisation plus précise des différentes afférences. 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 permet la description d'un groupe hétérogène d'afférence nerveuses.

Ce groupe est composé de 3 types de récepteurs distincts. Le premier représente la moitié de ces récepteurs trachéo-bronchiques et se caractérise par une activité régulière de décharge en réponse à une inflation et une déflation pulmonaire modérée. L'adaptation vis à vis de la stimulation mécanique (inflation et déflation) de ce groupe est variable, mais la plupart s'adaptent lentement prenant ainsi la dénomination de SARs trachéo-bronchiques. La localisation des ces SARs trachéo-bronchiques se révèle être essentiellement bronchique (90%). L'activité de ces récepteurs n'est pas modifiée par l'application locale de procaïne et faiblement inhibée par la vapeur d'éther. Ils ne répondent également que faiblement à la stimulation mécanique du mucus des voies aériennes.

Les 2 autres types de récepteurs trachéo-bronchiques sont identifiés comme des RARs et des récepteurs intermédiaires. Les RARs trachéo-bronchiques présentent une activité essentiellement lors des phases dynamiques de stimulation (inflation ou déflation) et tous s'adaptent très rapidement au stimulus. Ces RARs répondent préférentiellement à la déflation (vs inflation). La plupart des RARs trachéo-bronchiques (90%) sont localisés dans la trachée et la carène. L'application locale de procaïne inhibe l'activité de ces RARs, de même que la vapeur d'éther.

Ces récepteurs répondent fortement à la stimulation mécanique du mucus des voies aériennes. Les récepteurs intermédiaires quant à eux, présentent des caractéristiques communes aux SARs et aux RARs. Une différence majeure permet néanmoins de les individualiser du fait d'une diminution progressive d'activité en réponse à la répétition des stimulations mécaniques (inflations et déflations). Une autre caractéristique propre à ces récepteurs intermédiaires réside dans la capacité du dioxyde de soufre à les sensibiliser vis à vis d'une inflation ou déflation. Ces récepteurs se répartissent de façon homogène dans la trachée, la carène et les bronches.

Les travaux princeps de Widdicombe ont ainsi permis la description d'au moins 4 types de récepteurs pulmonaires et des voies aériennes : Les SARs pulmonaires, les SARs trachéo-bronchiques, les RARs trachéo-bronchiques et les récepteurs intermédiaires. Widdicombe décrit par la suite un autre type de récepteur : les RARs intra-pulmonaires dont les caractéristiques seront abordées plus loin dans ce manuscrit (Mills et al., 1969; Sellick and Widdicombe, 1969, 1971; Widdicombe et al., 1962). Les conclusions de ces travaux sont que les RARs trachéo-bronchiques et les récepteurs intermédiaires sont impliqués dans la régulation de la toux provoquée par une stimulation mécanique et chimique. Ces conclusions n'ont à ce jour jamais été réfutées.

2. Individualisation des afférences nerveuses régulant la toux chez le cochon d'Inde : fibres A- δ ou « récepteur de la toux »

Le cochon d'Inde est l'espèce la plus fréquemment utilisée dans les expérimentations animales étudiant la toux. Ce modèle autorise l'étude de la toux aussi bien sur animal vigile qu'anesthésié (Belvisi and Bolser, 2002; Karlsson and Fuller, 1999; Lewis et al., 2007), ce qui n'est pas forcément aussi évident chez d'autres espèces (chats, chiens). Le cochon d'Inde présente également l'avantage de tousser en réponse aux mêmes stimuli (capsaïcine, bradykinine, acide, stimulation mécanique) capables de provoquer une toux chez l'Homme. En effet, certaines espèces (souris, rats) semblent dépourvues de réflexe de toux et ne se

prêtent ainsi pas ou difficilement à l'expérimentation animale (Belvisi and Bolser, 2002; Kamei et al., 1993; Ohi et al., 2004; Tatar et al., 1996; Tatar et al., 1997). De nombreuses équipes de recherche travaillent ainsi sur ce modèle animal de toux et ont permis une évolution considérable des connaissances physiopathologiques et pharmacologiques sur la toux à partir des études chez le cochon d'Inde (Bolser et al., 1991; Bolser et al., 1994; Bolser et al., 1997; Canning et al., 2004; Kollarik and Undem, 2002; Undem et al., 2002). La mise au point d'un modèle de cochon d'Inde anesthésié permettant de déclencher une toux par une stimulation électrique, mécanique ou par l'application locale d'acide au niveau du larynx ou de la trachée a permis plus récemment de préciser encore un peu plus les afférences impliquées dans la régulation de la toux (Canning et al., 2004). Ainsi, l'application locale de capsaïcine ou de bradykinine sur la muqueuse trachéale de ces animaux anesthésiés ne provoque pas de réflexe de toux. De plus, la section du nerf récurrent inhibe la toux habituellement provoquée par la stimulation du larynx et de la partie proximale de la trachée. En revanche, la section du nerf laryngé supérieur est sans conséquence sur le réflexe de toux. Il en résulte que les 3 types connus d'afférences nerveuses trachéales et laryngées (i.e. SARs trachéo-bronchiques, RARs trachéo-bronchiques et récepteurs intermédiaires) projettent des axones à destination de ces régions (i.e. trachée, larynx) via le nerf récurrent. De plus, ces afférences répondent toutes aux stimuli acide et mécanique bien qu'avec des sensibilités différentes (Kollarik and Undem, 2002; Ricco et al., 1996; Undem et al., 2004). Comme mentionné précédemment, la capsaïcine et la bradykinine ne permettent pas sur ce modèle de déclencher une toux, suggérant un rôle primordial des afférences nerveuses insensibles à la capsaïcine issues du ganglion nodal (Myers et al., 2002; Ricco et al., 1996). Par ailleurs, l'incapacité du nerf laryngé supérieur à préserver un réflexe de toux suite à la section du nerf récurrent plaide en défaveur d'une implication des afférences provenant du ganglion jugulaire. De plus, très peu de neurones provenant du ganglion nodal se projettent aux voies aériennes via le nerf laryngé supérieur alors que la moitié des neurones issus du ganglion jugulaire (et à destination du larynx et de la partie proximale de la trachée) se projettent à ces voies aériennes via le nerf laryngé supérieur. L'ensemble de ces données permet de conclure que les afférences nerveuses insensibles à la capsaïcine du ganglion nodal

et innervant la trachée et le larynx sont nécessaires et suffisantes pour initier un réflexe de toux chez le cochon d'Inde anesthésié (Canning et al., 2004).

Ces neurones du ganglion nodal innervant la trachée, le larynx et la plupart des bronches du cochon d'Inde ont été caractérisés comme des RARs en se basant sur leurs caractéristiques de réponse à une stimulation mécanique (McAlexander et al., 1999; Myers et al., 2002). La comparaison des propriétés physiologiques de ces afférences avec les récepteurs intra-pulmonaires innervant les voies aériennes et les poumons a permis de mieux caractériser ces afférences régulant la toux. Parmi les afférences intra-pulmonaires, 2 types sont identifiés selon qu'ils s'adaptent lentement ou rapidement à une pression positive (distension) appliquée au niveau de la trachée. Tout comme les afférences nerveuses trachéales régulant la toux, ces 2 types de récepteurs innervant les voies aériennes intra-pulmonaires et les poumons ont des corps cellulaires dans le ganglion nodal. Mais contrairement aux récepteurs trachéo-bronchiques dont les vitesses de conduction sont proches de 5 m s^{-1} , les vitesses de conduction de ces récepteurs intra-pulmonaires sont approximativement de 16 m s^{-1} . D'autres différences (sur la contraction de la musculature lisse des voies aériennes, sur l'activation de récepteurs à l'ATP) permettent ainsi de conclure que ces afférences régulant la toux à partir de la trachée et du larynx sont bien distinctes des RARs, SARs et fibres-C des voies aériennes intra-pulmonaires et du parenchyme pulmonaire (Canning et al., 2004). Des travaux complémentaires incluant des études électrophysiologiques et immunohistochimiques ont permis d'identifier les terminaisons périphériques des récepteurs à la toux localisées dans la trachée et les bronches du cochon d'Inde (Canning et al., 2006b). Ces récepteurs à la toux se terminent au niveau des voies aériennes à la jonction entre l'épithélium et la musculature lisse et adoptent une position circonférentielle dans la matrice extra-cellulaire. Ces terminaisons émettent de très nombreuses ramifications au sein de la musculature lisse. Des structures semblables ont été décrites dans d'autres espèces mais leur identification en tant que récepteurs à la toux reste incertaine (De Proost et al., 2007; Yamamoto et al., 1995; Yu, 2005). Des études immunohistochimiques ont confirmé l'expression sélective de transporteurs $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ et $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ dans ces récepteurs à la toux chez le cochon d'Inde (Canning et al., 2006b; Mazzone et al., 2006). Plus récemment, des canaux sodiques insensibles à la Tetrodotoxine ont

été identifiés dans ces récepteurs à la toux (Kwong et al., 2008). Des analyses pharmacologiques suggèrent que ces derniers régulateurs de flux et de gradients ioniques, ainsi que les canaux Cl^- et K^+ voltage dépendants, sont indispensables à la régulation de la réponse de ces récepteurs à la toux, vis à vis de stimuli chimiques et mécaniques (Canning, 2007; Canning et al., 2006a; Fox et al., 1995; McAlexander and Udem, 2000).

3. RARs (Rapidly Adapting Pulmonary stretch Receptors) intra-pulmonaires

Cette dénomination de RARs provient de la description initiale de ces récepteurs des voies aériennes et pulmonaires activés lors de la phase dynamique d'une inflation pulmonaire mais rapidement quiescents (à l'inverse des SARs) lors de la phase statique de l'inflation (Knowlton and Larrabee, 1946; Widdicombe, 1954a). Néanmoins cette caractérisation en tant que récepteurs « d'adaptation rapide » peut prêter à confusion. En effet la description d'une afférence nerveuse comme étant soit « d'adaptation rapide » ou « d'adaptation lente » se base sur sa réponse à un stimulus donné mais n'implique pas pour autant une même adaptation (i.e. rapide ou lente) au regard d'autres stimuli (Canning et al., 2004; Widdicombe, 1954a; Yu, 2000, 2005). Ainsi, il est décrit des SARs d'adaptation rapide vis à vis de certains stimuli (Bergren and Peterson, 1993). A l'inverse, il existe des RARs (du fait de l'adaptation rapide à une inflation pulmonaire) qui s'adaptent très lentement à une déflation pulmonaire, une contraction des muscles lisses des voies aériennes, ou à d'autres stimuli (Armstrong and Luck, 1974; Bergren, 1997; Ho et al., 2001; Mills et al., 1969; Mills and Widdicombe, 1970; Sellick and Widdicombe, 1969, 1971). Sous cette dénomination de RARs, il est actuellement admis de ne considérer que les récepteurs intra-pulmonaires « d'adaptation rapide » à une inflation pulmonaire.

Dans la plupart des espèces, les RARs intra-pulmonaires présentent une activité lors de l'inspiration. En revanche, l'activité basale de ces RARs est très variable selon les espèces. De manière générale, et lors d'une ventilation spontanée de repos, les RARs sont nettement moins actifs que les SARs et plus actifs que les

fibres C. Les RARs sont également activés (directement ou indirectement) par d'autres stimuli mécaniques tels que la contraction des muscles lisses des voies aériennes, l'œdème pulmonaire, la diminution de la compliance pulmonaire, le collapsus pulmonaire, ou l'application d'une pression négative dans la lumière des voies aériennes. La réponse des RARs vis à vis de la contraction de la musculature lisse suggère une forte intrication de ces récepteurs avec ces muscles lisses. Cependant, la preuve d'une telle intrication fait actuellement encore défaut car aucune étude morphologique n'a, à ce jour, permis de localiser précisément les terminaisons périphériques de ces RARs.

L'activation des RARs intra-pulmonaires est à l'origine d'une part d'un bronchospasme associé à une sécrétion de mucus via une activation parasympathique réflexe, et d'autre part 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). En revanche, l'activation des RARs n'est pas capable d'initier un réflexe de toux et l'ensemble des stimuli mécaniques (i.e. contraction des muscles lisses des voies aériennes, œdème pulmonaire, diminution de la compliance pulmonaire, collapsus pulmonaire, pression négative dans la lumière des voies aériennes) connus pour activer ces RARs n'est pas capable de provoquer une toux, que se soit chez les animaux anesthésiés ou vigiles (Canning et al., 2006b). A l'inverse, les stimuli capables de provoquer une toux (comme la capsaïcine, la bradykinine, l'acide) n'activent que très faiblement, voire pas du tout les RARs (Armstrong and Luck, 1974; Bergren, 1997; Coleridge and Coleridge, 1984; Ho et al., 2001; Mohammed et al., 1993). L'implication des RARs dans la modulation même de la toux est actuellement incertaine. L'œdème pulmonaire, stimulus activant les RARs (et également les fibres C pulmonaires) non seulement ne provoque pas de toux mais semble au contraire l'inhiber (Korpas et al., 1993; Polacek et al., 1986; Sellick and Widdicombe, 1969). Chez l'homme, il ne semble pas exister de franche corrélation entre fonction pulmonaire et réponse à un agent tussigène. Chez l'asthmatique par exemple, la réponse à un test de provocation de la toux (seuil, intensité) est semblable à celle d'un sujet non asthmatique (Dicpinigaitis, 2007). De même, l'administration d'une thérapeutique bronchodilatatrice ou

bronchoconstrictrice n'a quasiment pas d'effet sur la toux (provoquée) alors que ces traitements modifient fortement le tonus musculaire lisse des voies aériennes ainsi que (très vraisemblablement) l'activité des RARs (Fujimura et al., 1993; Fujimura et al., 1992). Les données chez l'animal ne retrouvent également qu'une faible corrélation entre la susceptibilité d'un stimulus à provoquer une toux et l'existence d'un bronchospasme. Pour exemple, la substance P (bronchoconstrictrice) n'est pas capable de déclencher une toux et est sans effet sur la toux provoquée par l'acide citrique (El-Hashim and Amine, 2005). Des résultats similaires ont été retrouvés chez le cochon d'Inde où une activation des RARs par l'histamine est sans effet sur la toux. Chez le chien en revanche, si l'histamine n'est pas capable de déclencher une toux, cet agent bronchoconstricteur est capable d'augmenter la toux faisant suite à une stimulation mécanique des voies aériennes (House et al., 2004). L'interprétation de ces nombreuses données (pouvant parfois sembler contradictoires) n'est pas évidente, mais souligne l'influence (vraisemblablement considérable) des conséquences (modification des variables respiratoires, 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). Au regard des données exhaustives concernant les RARs, il semble que ces récepteurs interviennent plus comme des modulateurs de la toux sans pour autant jouer un rôle primordial dans la genèse d'un tel réflexe.

4. Les fibres C

Les fibres C, caractérisées par une vitesse de conduction de l'ordre de 2 m s^{-1} , constituent la majorité des afférences vagales à destination des voies aériennes. Ces fibres C peuvent être activées par différents stimuli 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). La plupart des fibres C innervant les poumons et les voies aériennes expriment le récepteur TRPV 1 (Transient Receptor Potential Vanilloid) (Caterina et al., 1997) dont la capsaïcine

permet l'activation. Il ne faut pour autant pas en conclure que la réponse à la capsaïcine est une caractéristique définissant la fibre C. Pour preuve, il a été décrit des fibres C chez le chien, le rat et la souris non activées par la capsaïcine (Coleridge and Coleridge, 1984; Ho et al., 2001; Kollarik et al., 2003). De plus, et ce peut être du fait des conséquences de l'activation des organes effecteurs par les fibres C (déclenchant sécrétion de mucus, contraction de la musculature lisse des voies aériennes, modification de la ventilation), d'autres afférences nerveuses (tout particulièrement les RARs intra-pulmonaires) répondent à la capsaïcine (Bergren, 1997; Mohammed et al., 1993; Morikawa et al., 1997). L'absence de réponse à une stimulation mécanique ou encore l'activité basale des fibres C ne permet également pas de les différencier des autres types d'afférences nerveuses bronchopulmonaires. Si les fibres C répondent moins fortement à la stimulation mécanique, elles peuvent toutefois être activées par une stimulation mécanique ponctuelle ou encore par une inflation pulmonaire. L'activité basale des fibres C peut également parfois être assez proche de celle des RARs intra-pulmonaires (Coleridge and Coleridge, 1984; Fox et al., 1993; Lee and Pisarri, 2001; Ricco et al., 1996).

Les fibres C ont été décrites au niveau des voies aériennes et des poumons de presque toutes les espèces. Dans la trachée du cochon d'Inde et du rat, les terminaisons de ces fibres C 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 Udem, 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 ainsi que dans les voies aériennes périphériques du cochon d'Inde (Dey et al., 1990; Lamb and Sparrow, 2002; Watanabe et al., 2006; Yamamoto et al., 1998). Des terminaisons de ces fibres C ont également été décrites au niveau de la microcirculation et de la musculature lisse des voies aériennes. Cependant il existe encore actuellement peu de données concernant la localisation bien précise des terminaisons des fibres C au niveau des voies aériennes intra-pulmonaires et des poumons (Baluk et al., 1992; McDonald et al., 1988; Paintal, 1973).

Les stimuli chimiques les plus aptes à activer les fibres C bronchopulmonaires (incluant la capsaïcine, la bradykinine, et certains acides) sont également à même de déclencher une toux chez des sujets humains conscients ainsi que chez des animaux conscients (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; Laloo et al., 1995; Leung et al., 2007; Trevisani et al., 2004). L'ensemble de ces données laissent ainsi à penser que les fibres C jouent un rôle majeur dans la toux (Canning et al., 2006b).

Il existe cependant des données contradictoires quant au rôle des fibres C dans la toux, comme en témoigne l'incapacité des stimuli activant sélectivement les fibres C à provoquer une toux chez l'animal anesthésié (Canning et al., 2006a; Canning et al., 2004; Karlsson et al., 1993; Tatar et al., 1994; Tatar et al., 1988). L'anesthésie n'a que peu d'effet sur la toux provoquée par une stimulation mécanique ou acide des voies aériennes et ne modifie pas l'activation des fibres C (ni des réflexes dépendants des fibres C), et jusqu'à présent, la capsaïcine et la bradykinine se sont toujours révélées être inefficaces pour déclencher un réflexe de toux chez l'animal anesthésié (Canning et al., 2006a; Coleridge and Coleridge, 1984; Tatar et al., 1988). Il convient ainsi peut être d'envisager que ces stimuli activant sélectivement les fibres C ne parviennent pas à déclencher une toux lors d'une anesthésie. Les fibres C partagent beaucoup de caractéristiques avec les nocicepteurs somatosensoriels, et une explication pourrait être que lors d'une anesthésie, l'objectif principal est de limiter au maximum les sensations et les réflexes associés à l'activation des nocicepteurs, d'où cette incapacité à déclencher une toux.

D'autres données remettent fortement en question le rôle des fibres C dans la toux, comme le fait que l'activation des fibres C peut parfois inhiber la toux chez l'animal anesthésié, ou encore le fait que certains stimuli des fibres C ne parviennent pas à déclencher de toux chez des sujets humains et des animaux vigiles (Tatar et al., 1994; Tatar et al., 1988). Ces effets des fibres C d'apparence opposés sur la toux peuvent néanmoins être expliqués en prenant en considération les différents types de fibres C décrits (Coleridge and Coleridge, 1984; Kollarik et al., 2003; Udem et al., 2004). Chez le 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., 2005; Udem 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). Dans ces derniers travaux, l'application locale de capsaïcine et de bradykinine sur la muqueuse trachéale a montré une augmentation de la sensibilité à déclencher une toux vis à vis d'un stimulus tussigène. La suite de ces travaux a 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 est à l'origine d'une inhibition de la toux. En effet, l'activation sélective des fibres C nodales par l'adénosine ou la 2 – méthyl – 5 – hydroxytryptamine 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.

Les résultats d'autres études conduites chez d'autres espèces animales retrouvent également cette notion que les différents types de fibres C peuvent avoir des effets opposés sur la toux (Belvisi and Bolser, 2002; Lee and Pisarri, 2001; Ohi et al., 2004; Tatar et al., 1994; Tatar et al., 1988).

5. Terminaisons centrales des afférences nerveuses des voies aériennes et pulmonaires

La plupart des travaux s'intéressants aux projections centrales de ces différentes afférences nerveuses des voies aériennes ont été réalisés chez le chat et le rat. Les fibres C bronchopulmonaires et les RARs se projettent essentiellement et souvent de façon bilatérale 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 quant à eux se projettent essentiellement 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). Néanmoins, il n'existe que de très rares études concernant les éventuelles interactions entre ces différents sites essentiellement du fait d'une méthodologie extrêmement contraignante pour mener de telles études physiologiques.

Les travaux princeps de J. Widdicombe constituent une base essentielle de nos connaissances concernant les afférences nerveux impliquées dans la toux. Cependant, la nomenclature initialement utilisée pour décrire ces afférences a été par la suite prise en défaut à l'origine parfois de confusions. L'implication des fibres C dans la toux ne semble plus faire de doute du fait de leurs propriétés pharmacologiques et de la capacité de ces fibres à provoquer une toux chez les animaux et les sujets humains éveillés. Le rôle des mécanorécepteurs laryngés, trachéaux et bronchiques, activés par une stimulation mécanique et chimique (acide) est également bien documenté. Ce qui fait actuellement encore défaut est un nom pour ces derniers candidats (mécanorécepteurs). Alors qu'ils s'adaptent rapidement à une stimulation mécanique, ils partagent également des caractéristiques physiologiques avec d'autres afférences nerveuses comme les RARs. La dénomination en tant que « récepteurs à la toux » pourrait être proposée à condition néanmoins que cette dénomination ne désigne pas uniquement ces afférences. Des études complémentaires sont encore nécessaires afin de combler certaines zones d'ombre notamment concernant les afférences nerveuses et les interactions centrales régulant la toux.

C. Modulation du réflexe de toux : Rôle des afférences nasales et réflexe de plongée

La toux est le plus fréquent des symptômes respiratoires, et le reflux gastro-oesophagien, la maladie asthmatique ou encore les pathologies des voies aériennes supérieures sont les principales causes de toux chronique (Morice et al., 2004). En dépit des avancées majeures dans la description physiologique du réflexe de toux, persiste toutefois des controverses quant à certains mécanismes sous-jacents (Birring, 2011). Si la genèse du réflexe de toux est exclusivement attribuée aux neurones du nerf vague (dont les corps cellulaires se situent au niveau des ganglions jugulaire et nodal), ce réflexe fait également preuve d'une plasticité (Canning and Mori, 2011) aussi bien au niveau périphérique que central et impliquant des afférences vagales et extra-vagales. Cette plasticité peut prendre deux formes : une sensibilisation (ou « up-regulation ») ou une désensibilisation (ou « down-regulation ») du réflexe de toux. Une sensibilisation du réflexe de toux correspond à un réflexe exacerbé (dans son intensité, dans sa composante temporelle) ou survenant pour un stimulus habituellement non-tussigène chez un sujet sain. Une désensibilisation du réflexe de toux correspondant à l'inverse à une atténuation du réflexe compromettant la fonction de protection du système respiratoire. Les pathologies nasales (à l'instar d'autres pathologies) sont susceptibles de moduler le réflexe de toux aussi bien dans le sens d'une sensibilisation que d'une désensibilisation.

1. Afférences nasales et modulation du réflexe de toux

L'intérêt tout particulier du rôle des afférences nasales quant à la modulation du réflexe de toux vient du constat principalement clinique de l'association fréquente d'une toux chronique à l'atteinte des voies aériennes supérieures, et plus spécifiquement en cas de rhinite chronique.

1.1. Sensibilisation du réflexe de toux et rhinite chronique : évidences cliniques et expérimentales

En effet, selon les différentes études une affection des voies aériennes supérieures est retrouvée comme cause de toux chronique chez environ 20 à 40% des patients adressés à un centre spécialisé dans la prise en charge de la toux (Morice et al., 2004; Pratter, 2006). Une étude de cohorte longitudinale a même démontré que la rhinite était un facteur de risque indépendant pour développer une toux chronique (Guerra et al., 2005).

Si ce constat clinique est largement documenté par des études épidémiologiques (Bende and Millqvist, 2012; Guerra et al., 2005), les mécanismes sous-tendant cette association entre rhino-sinusite et toux ne sont que partiellement élucidés. L'une des hypothèses longtemps avancée pour expliquer la toux chez le sujet présentant une rhinite est le jetage postérieur. Le mucus s'écoulant dans les régions pharyngo-laryngés pourrait stimuler certaines afférences nerveuses à l'origine d'un réflexe de toux (Irwin et al., 1998). Néanmoins, cette hypothèse est loin d'être pleinement convaincante (Morice, 2004). En effet, le jetage postérieur est une situation clinique fréquente voire assez banale, et la toux n'est rapportée que dans une faible proportion chez ces sujets (O'Hara and Jones, 2006). De même, parmi les patients dont la toux est attribuée à une atteinte naso-sinusienne, environ 20% d'entre eux n'ont absolument aucun jetage postérieur. Cette unique théorie mécanistique (jetage postérieur) ne semble pas permettre d'expliquer la complexité de l'association entre la toux et les affections naso-sinusiennes (Pratter, 2006; Tatar et al., 2009).

La modulation du réflexe de toux dans ces atteintes des voies aériennes supérieures se fait principalement dans le sens d'une sensibilisation du réflexe. Si certains travaux princeps (Irwin et al., 1998) suggéraient que la stimulation des afférences nasales (par un processus pathologique localisé au niveau de la cavité nasale et/ou des sinus) avait pour conséquence directe le déclenchement d'un réflexe de toux, cette hypothèse n'a cependant jamais été formellement confirmée. En effet, de nombreux travaux ont depuis été réalisés comme la stimulation directe

des afférences nasales sur mes modèles animaux ou chez l'homme (capsaïcine, histamine) (Plevkova et al., 2004a; Plevkova et al., 2004b) ou encore des études sur des modèles expérimentaux de rhinite induite (Brozmanova et al., 2008). Dans ces travaux, la réponse directe à la stimulation nasale n'est jamais un réflexe de toux, mais seulement un réflexe d'éternuement.

Ce double constat (1. Association toux et atteinte naso-sinusienne & 2. Absence de réflexe de toux en tant que réponse directe à une stimulation nasale), doit ainsi trouver son explication par d'autres mécanismes spécifiques aussi complexes et nombreux soient-ils. A ce jour, plusieurs hypothèses sont avancées comme une éventuelle propagation inflammatoire systémique ou encore la microaspiration de particules inflammatoires (Braunstahl and Fokkens, 2003). Par ailleurs, de nombreux éléments suggèrent le rôle considérable de la neuro-plasticité centrale et périphérique (Tatar et al., 2009).

La rhinite allergique est un exemple de pathologie autorisant une meilleure compréhension de la sensibilisation du réflexe de toux en cas d'atteinte rhinologique. Il a ainsi été démontré une sensibilisation du réflexe de toux chez des sujets porteurs de rhinite allergique et ce tout particulièrement en période pollinique (Pecova et al., 2005). Le seuil de la toux déterminé au cours d'un test de provocation (capsaïcine/acide citrique) est également significativement plus bas (selon l'analyse des variables C2 et C5, i.e. concentration de l'agent tussigène provoquant respectivement 2 et 5 efforts de toux) chez les sujets atteints de rhinite chronique vs sujets sains (Pecova et al., 2008). La sensibilité du réflexe de toux est également corrélée à l'intensité des symptômes rapportés et la prise de corticostéroïdes par voie nasale a fait la preuve d'une baisse de sensibilité du réflexe. Il a également été montré une sensibilisation du réflexe de toux en dehors de la saison pollinique chez ces patients souffrants de rhinite allergique, pouvant s'expliquer par l'activation répétée des afférences nasales. La répétition des expositions allergéniques chez ces patients pourrait entraîner un état inflammatoire avec libération de médiateurs à l'origine d'une sensibilisation du réflexe de toux.

Les données issues des modèles animaux de rhinite allergique (induite par l'ovalbumine) confirment les résultats retrouvés chez l'homme, avec une plus grande sensibilité du réflexe par ailleurs corrélée à l'existence et l'intensité des symptômes nasaux (Brozmanova et al., 2008). Sur ce modèle animal, les thérapeutiques anti-inflammatoires locales (corticostéroïdes, anti-leukotriènes) retrouvent également une normalisation de la sensibilité du réflexe ainsi qu'une atténuation significative des symptômes (Brozmanova et al., 2005). Toujours sur ce modèle animal de rhinite allergique, l'administration nasale de mésocaïne est capable d'inhiber la sensibilisation du réflexe de toux suggérant fortement le rôle des afférences nasales dans les mécanismes de sensibilisation (Plevkova et al., 2009a). Enfin, les médiateurs inflammatoires libérés lors de la réaction allergique (aussi bien précoce que retardée) sont connus pour activer (histamine, badykinine) et sensibiliser (prostaglandine, leukotriène) les afférences nerveuses trigéminées (Taylor-Clark et al., 2005).

Tous ces éléments suggèrent ainsi le rôle tout particulier des afférences nasales dans la modulation du réflexe de toux.

1.2. Rôle des afférences nasales dans la modulation du réflexe de toux

Dans la littérature scientifique (principalement en langue anglo-saxonne), les terminaisons des afférences trigéminées innervant la muqueuse nasale sont classiquement appelées « gate-keepers » (dont une traduction pourrait être « gardien du temple »), dans la mesure où elles sont les premières à détecter les substances pénétrants les voies aériennes supérieures (Panneton et al., 2010a). Ces fibres nerveuses peuvent être classées en différentes catégories en fonction de la taille, la myélinisation, ou encore les propriétés de mécano-, thermo- ou chimiosensibilité (Taylor-Clark et al., 2005), et certaines d'entre elles sont capables de déclencher une réponse réflexe de défense respiratoire. Parmi ces dernières (fibres capables de déclencher un réflexe de défense respiratoire), certaines expriment des récepteurs membranaires Transient Receptor Potential (TRP) retrouvés au niveau des afférences trigéminées.

Ces TRP sont des canaux ioniques et constituent une famille de protéines capables de répondre à de très nombreux stimuli, et dont la distribution dans les différents tissus et organes est quasiment ubiquitaire. Ces TRP sont constitués de 6 domaines protéiques transmembranaires formant un pore perméable aux cations. Les 3 principales classes de TRP sont : TRPC, TRPM et TRPV (Clapham, 2003; Montell et al., 2002a; Montell et al., 2002b) auxquelles viennent s'ajouter TRPP, TRPML et TRPN. Plus récemment, un TRP-like répondant au froid (température inférieure à 19°C) a été décrit et une dénomination en tant que TRPA1 proposée (Jaquemar et al., 1999; McKemy et al., 2002; Nilius et al., 2007; Peier et al., 2002). Il existe des incertitudes quant au rôle précis des ces TRP (Grace et al., 2013; Lee et al., 2013). Leur localisation au niveau de la membrane plasmique des neurones et d'autres cellules ainsi que les très nombreuses données utilisant pléthore de stimulations différentes suggèrent que ces canaux ioniques répondent à des stimuli chimiques et physiques. Les TRP sont des structures moléculaires utilisées par les organismes vivants (du lombric à l'être humain) et sont capables de répondre à des stimuli aussi variés que l'osmolarité, le chaud ou le froid (Lee et al., 2011) ou encore le sucré ou l'amer. De plus, leur localisation intracellulaire (réticulum endoplasmique) (Kurai et al., 2004) ainsi que des données sur la régulation cellulaire des flux ioniques suggèrent un rôle de ces TRP en tant que régulateur de l'homéostasie des ions Ca^{2+} (Clapham, 2003; Montell, 1997).

En raison de l'expression de ces récepteurs TRP au niveau des afférences trigéminées, plusieurs travaux se sont intéressés aux interactions possibles entre l'activation de ces récepteurs et la modulation de la toux. Une première étape a consisté en l'étude des effets de l'administration nasale de capsaïcine/histamine sur le réflexe de toux provoqué soit par un agent chimique tussigène (via les fibres jugulaires exprimant le TRPV1) soit par la stimulation mécanique du mucus des voies aériennes (via les fibres nodales A- δ insensibles à la capsaïcine). L'histamine et la capsaïcine (agoniste sélectif des TRPV1) sont capables de stimuler directement des populations d'afférences nasales. L'activation de ces afférences nasales est également à l'origine de réflexes d'axones avec libération rétrograde de tachykinines (Substance P) et donc d'une stimulation supplémentaire de ces mêmes afférences.

Ainsi, l'administration nasale de capsaïcine permet une forte activation des afférences nerveuses nasales pouvant facilement être utilisé comme modèle expérimental.

Comme suggéré par certaines études chez l'homme (Plevkova et al., 2004a; Plevkova et al., 2004b), l'administration nasale de capsaïcine n'est pas capable de déclencher un réflexe de toux, mais sensibilise ce réflexe (déclenché par la stimulation des voies aériennes inférieures) chez le chat anesthésié. Il en est exactement de même (sensibilisation du réflexe de toux) avec l'administration intra-nasale d'histamine. Selon la quantité de capsaïcine intra-nasale administrée, le nombre d'efforts de toux peut augmenter de 60 à 80% (Plevkova et al., 2006). Sur la base des travaux de B. Canning et S. Mazzone (Mazzone and Canning, 2002) en faveur d'une convergence des afférences impliquées dans la toux et la bronchoconstriction au niveau du noyau du tractus solitaire, il est légitime de faire l'hypothèse que la sensibilisation du réflexe de toux dans les atteintes nasosinusiennes répond également à une composante intégrative centrale (Plevkova et al., 2010).

Les récepteurs TRPA1 sont des canaux ioniques plus récemment identifiés (Geppetti et al., 2010; Grace and Belvisi, 2011; Jaquemar et al., 1999; Nilius et al., 2007) et souvent coexprimés avec le TRPV1 au niveau d'afférences nerveuses somatosensorielles impliquées dans la douleur et l'inflammation neurogène (Bautista et al., 2006; Caterina et al., 1997; Story et al., 2003). Ces TRPV1 sont par ailleurs très largement exprimés au niveau des afférences trigéminées. Contrairement aux TRPV1, l'activation de ces TRPA1 n'est pas capable de sensibiliser le réflexe de toux (Buday et al., 2012).

1.3. Désensibilisation du réflexe de toux et afférences nasales

La plupart des données disponibles dans la littérature retrouvent une sensibilisation du réflexe de toux à partir des afférences nasales (inflammation nasale, stimulation des afférences trigéminées) (Brozmanova et al., 2008; Pecova et

al., 2005; Plevkova et al., 2004a; Plevkova et al., 2004b). Toutefois, certaines données suggèrent également une désensibilisation de la toux.

Depuis de très nombreuses années, le menthol est utilisé comme traitement symptomatique de la toux. Toutefois les mécanismes d'action précis du menthol ne sont connus que depuis peu (Wise et al., 2012) et impliquent très probablement les afférences nasales trigéminées exprimant le récepteur TRPM8 de façon abondante. L'inhalation ou l'application locale sur la peau de menthol produit une sensation caractéristique de fraîcheur en rapport avec une activité agoniste des récepteurs TRPM8 (canaux ioniques) (Patel et al., 2007). Tout comme les récepteurs TRPV1, les TRPM8 sont exprimés au niveau d'un certain nombre d'afférences nerveuses impliquées dans la reconnaissance des différentes sensations thermiques. Cependant, à la différence des TRPV1 dont le seuil d'activation thermique se situe vers 43°C (i.e. au chaud), les TRPM8 sont activés pour des températures comprises entre 8 et 28 °C (McKemy et al., 2002). Le menthol inhibe la toux chez l'homme ainsi que chez l'animal (Laude et al., 1994; Morice et al., 1994). L'exposition répétée et prolongée au menthol semble être responsable d'une désensibilisation des réponses nociceptives (incluant celle déclenchée par l'exposition à la capsaïcine) (Cliff and Green, 1994; Green and McAuliffe, 2000), support d'un potentiel antitussif de mécanisme périphérique en cas d'expression des TRPM8 au niveau des neurones impliqués dans la toux (i.e. fibres C bronchopulmonaires exprimant le TRPV1). Par ailleurs, en plus d'activer les TRPM8, le menthol est également capable d'inhiber les canaux TRPA1 (Macpherson et al., 2006). Sachant que les TRPA1 sont souvent co-exprimés avec les TRPV1 (Story et al., 2003), le blocage des TRPA1 exprimés au niveau des voies aériennes peut être à l'origine d'une importante diminution d'activité des récepteurs sensibles à la capsaïcine, et tout particulièrement lors de l'augmentation d'activité observée en cas d'inflammation bronchique. Une étude a pu montrer que le menthol peut directement agir sur la musculature lisse bronchique en induisant une bronchodilatation (Wright et al., 1997). Cette bronchodilatation peut ainsi avoir un effet antitussif en diminuant l'activité des RARs en réponse à un agent bronchoconstricteur. En effet, l'inhalation de β -agonistes a un effet antitussif chez l'homme et chez l'animal (Bolser et al., 1995; Horiuchi et al., 1995). En outre, le menthol peut inhiber la toux via un mécanisme d'action centrale comme le suggère la

suppression de la douleur induite par l'application cutanée de capsaïcine en cas de co-application avec le menthol. Il semble que cette action centrale repose sur la mise en jeu de mécanismes glutaminergiques au niveau de la moelle épinière (Proudfoot et al., 2006).

2. Le réflexe de plongée

Les oiseaux ainsi que les mammifères plongeurs sont capables d'évoluer en immersion pour des durées très variables allant de quelques secondes à plusieurs minutes (de 20 secondes pour le canard à plus de 30 minutes pour le cachalot). La profondeur de ces plongées est également très variable comprise entre 2 mètres (canard) et presque 600 m (cachalot). Chez l'homme, le record d'apnée statique est de 11 minutes et 35 secondes (Stéphane Mifsud, 2009), et le record d'apnée dynamique avec palmes de 273 mètres (Goran Colak, 2011). Les 2 principales problématiques sont ainsi l'évolution dans un environnement avec un stock limité d'oxygène et des pressions hydrostatiques augmentées. Dans ce contexte, le réflexe de plongée constitue l'une des plus puissantes réponses du système nerveux autonome. En effet, ce réflexe peut être à l'origine d'une altération majeure du comportement du système cardio-respiratoire et surpassant volontiers de nombreux autres réflexes visant au maintien de l'homéostasie. Dans la plupart des espèces, le réflexe de plongée consiste en une apnée, une bradycardie et une vasoconstriction périphérique. Ces ajustements du système nerveux autonome sont usuellement dénommés comme réflexe de plongée car il sont tout particulièrement évidents chez les mammifères marins plongeurs. Toutefois, ces ajustements sont également retrouvés (à un moindre degré) chez tous les mammifères y compris chez l'humain (Butler and Jones, 1997).

Les premières descriptions des réflexes à point de départ nasal remontent à 1870 (Kratschmer, 2001), mais ce n'est que plus récemment que ces réflexes ont fait l'objet d'une attention plus particulière (Angell James and Daly Mde, 1969; Gorini et al., 2010; Panneton et al., 2010b; Schaller, 2004) bien que les zones d'ombre demeurent encore nombreuses quant aux mécanismes physiologiques sous-jacents. Le réflexe de plongée correspond ainsi à la survenue brutale d'une bradycardie extrême (via le système parasympathique et pouvant aller jusqu'à l'asystolie), d'une

apnée et d'une vasoconstriction périphérique (via le système sympathique) (Butler and Jones, 1982; Davis et al., 2004; Ferretti, 2001; Foster and Sheel, 2005; Kooyman et al., 1981). La finalité de ce réflexe est la préservation d'une quantité suffisante d'oxygène dans le sang lors d'une immersion et de limiter la perfusion sanguine aux 2 principaux organes vitaux : le cœur et le cerveau. Ce réflexe de plongée apparaît très tôt dans le développement et semble constituer un système de secours pour les mammifères contre l'hypoxie au moment de la naissance (Singer, 1999). Après la naissance, l'intensité de ce réflexe diminue chez l'humain (Goksoy et al., 2002) mais semble également impliqué comme agent causal de la mort subite du nourrisson (Leiter and Bohm, 2007; Lobban, 1991). Le support physiologique le plus probable à ce réflexe serait que les terminaisons nerveuses sensorielles du nerf trijumeau transmettent au niveau central un message nerveux via le ganglion de Gasser, constituant la composante afférente de cet arc réflexe (Schaller, 2004). Une très probable intégration centrale avec communication du message au noyau moteur du nerf vague représenterait le support de la réponse cardiovasculaire de ce réflexe de plongée (Lang et al., 1991). Si les manifestations périphériques de ce réflexe de plongée ont fait l'objet de nombreuses études (Butler and Jones, 1997; Panneton et al., 2012), il n'en est pas de même concernant les mécanismes centraux. Ces derniers mécanismes sont difficile à étudier, et font le plus souvent appel à des expérimentations animales où le réflexe de plongée est provoqué par immersion contrainte de l'espèce animale (Drummond and Jones, 1979; Dykes, 1974a, b; Hill et al., 1987; Jobsis et al., 2001; Panneton et al., 2010b). L'une des principales limites de ce modèle d'immersion forcée est qu'il semble exister des arguments suggérant que la réponse hémodynamique diffère selon le caractère volontaire ou contraint de l'immersion (Drummond and Jones, 1979; Jobsis et al., 2001; Panneton et al., 2010b). En raison de ces difficultés méthodologiques, il est ainsi fréquent d'aborder de la même manière le réflexe de plongée et le réflexe trigémino-cardiaque qui présentent d'indéniables similitudes tant sur les voies mises en jeu que sur la réponse déclenchée, i.e. apnée, bradycardie et vasoconstriction périphérique. Dans ces études, l'immersion se voit remplacée par la stimulation de la muqueuse nasale soit par des vapeurs irritantes (Gieroba et al., 1994; McCulloch and Panneton, 1997; McRitchie and White, 1974; Panneton et al., 2010b) ou encore par une stimulation

électrique. Ces dernières préparations expérimentales offrent ainsi une meilleure maîtrise des conditions d'étude et des variables mesurées.

Le stimulus initial à l'origine de ce réflexe de plongée n'est à ce jour pas clairement identifié même s'il semble acquis que ce stimulus active les terminaisons nerveuses trigéminées (Butler and Jones, 1997) et plus particulièrement le nerf éthmoïdal antérieur (branche issue du nerf ophtalmique du trijumeau) assurant l'innervation de la muqueuse nasale et d'une partie de la face (McCulloch et al., 1999; Panneton et al., 2006; Panneton et al., 2000). Ainsi la stimulation électrique de ce nerf éthmoïdal antérieur est à l'origine d'une réponse réflexe similaire à celle observée chez le mammifère plongeur (McCulloch et al., 1999; Rozloznik et al., 2009) alors que l'anesthésie de la muqueuse nasale inhibe cette réponse (Yavari et al., 1996). Si l'immersion dans l'eau est systématiquement à l'origine d'un réflexe de plongée (Panneton et al., 2010b), il n'en est pas de même en cas de stimulation par du sérum physiologique ou encore par une solution de glucose isotonique faisant ainsi de l'hypoosmolarité un candidat de choix quant à l'initiation du réflexe de plongée. Les fibres C non myélinisées ainsi que certaines fibres myélinisées de petit diamètre représentent la plupart des fibres innervant la muqueuse nasale, pour donner ensuite naissance au nerf éthmoïdale antérieur (Biedenbach et al., 1975; Cauna et al., 1969; Finger et al., 1990; Wallois et al., 1993; Wallois et al., 1992). Ces fibres sont ainsi très certainement impliquées dans le réflexe de plongée, essentiellement dans sa composante hémodynamique comme cela a pu être démontré lors de la stimulation nasale par des vapeurs irritantes (Rybka and McCulloch, 2006).

Peu d'études sont actuellement disponibles concernant voies impliquées au niveau central même s'il semble que la boucle du réflexe de plongée soit intrinsèque au bulbe rachidien et à la moelle épinière. En effet, le réflexe de plongée n'est pas ou peu modifié chez des animaux décérébrés (Butler and Jones, 1982, 1997; Panneton et al., 2010b; White et al., 1975) ou dans des préparations expérimentales de section ponto-médullaire (Panneton et al., 2012). Dans ce récent travail (Panneton et al., 2012), la stimulation (vapeurs irritantes) de la muqueuse nasale de rats anesthésiés

a été étudiée avant et après section ponto-médullaire. Cette section s'accompagne d'une augmentation de la fréquence cardiaque de repos ainsi que de la pression artérielle moyenne sans influencer sur la ventilation. Cependant, les réponses engendrées par la stimulation de la muqueuse nasale ne sont pas différentes avant et après section complète, avec une chute de fréquence cardiaque toujours significative, une durée d'apnée identique. Toutefois, les interconnexions entre les afférences trigéminées et le système nerveux autonome ne sont pas clairement identifiées. Il semble exister des preuves de projections trigéminées indirectes vers le centre vagal (A1) et le centre vasoconstricteur du bulbe (C1) via la formation réticulée (Esser et al., 1998). Les données anatomiques et physiologiques disponibles suggèrent néanmoins que le noyau du tractus solitaire ne joue pas un rôle central dans l'activation du système nerveux sympathique faisant suite à la stimulation de la muqueuse nasale dans la mesure où l'inhibition d'activité de ce noyau du tractus solitaire n'entraîne aucune altération d'activation du système sympathique par la stimulation nasale (McCulloch et al., 1999). Ces projections trigéminées vers le noyau du tractus solitaire pourraient en revanche avoir un rôle quant à la réponse ventilatoire (apnée) ou parasympathique (bradycardie) du réflexe de plongée. Des projections trigéminées vers les neurones respiratoires du complexe Böttinger semblent également exister mais aucune preuve n'existe à jour quant à l'activation de ces neurones respiratoires suite à la stimulation de la muqueuse nasale (McCulloch et al., 1999).

ETUDE PRELIMINAIRE

A. Réponse ventilatoire à la stimulation trachéale mécanique discriminante (en fonction de son application dans le cycle respiratoire Inspiration/expiration) chez le lapin anesthésié

A. Réponse ventilatoire à la stimulation trachéale mécanique discriminante chez le lapin anesthésié

1. Introduction

La stimulation mécanique de la muqueuse trachéo-bronchique est capable de déclencher une réponse ventilatoire réflexe caractéristique, principalement basée sur un puissant effort expiratoire destiné à expulser l'air ainsi que des agents potentiellement néfastes. Cet effort expiratoire peut survenir en tant que composante d'un réflexe de toux (RT) ou de façon isolée lors d'un réflexe expiratoire (RE). Cette distinction entre RT et RE est fondamentale que ce soit pour des raisons physiologiques ou cliniques. En effet, même si ces deux réflexes semblent proches du fait de l'effort expiratoire, ils se distinguent toutefois par des fonctions (Korpas, 1972; Korpas and Tatar, 1972) et des voies différentes. Par exemple, le RE fait preuve d'une plus grande constance que le RT en cas d'anesthésie profonde (Korpas, 1972) ou lors du sommeil (Sullivan et al., 1979; Sullivan et al., 1978) et d'une plus faible sensibilité aux traitements codéinés (Vovk et al., 2007). Ces différences doivent ainsi être considérées dans le cadre de la prise en charge des patients porteurs d'une toux chronique. Il existe par ailleurs des éléments suggérant que la réponse ventilatoire à une stimulation mécanique des voies aériennes est de nature différente selon que la stimulation survient à l'inspiration ou à l'expiration. Lors de la ventilation, les caractéristiques mécaniques des voies aériennes, le niveau d'activation des mécanorécepteurs (poumon et voies aériennes) et l'activité des neurones respiratoires centraux varient périodiquement avec le volume pulmonaire (Jonzon et al., 1986; Sant'Ambrogio et al., 1988; Yu et al., 1987). Les changements de volumes pulmonaires étant connus pour impacter certaines des propriétés (structure et fonction) du poumon (Wirtz and Dobbs, 2000), il y a fort à penser qu'ils puissent également affecter les mécanismes de transduction sous-jacents ainsi que la réponse ventilatoire à une stimulation mécanique.

La plupart des modèles expérimentaux utilisent une stimulation mécanique des voies aériennes s'effectuant sur plusieurs cycles respiratoires successifs et ne considèrent qu'occasionnellement la nature de la réponse (i.e. différence entre RT et RE). Si certains travaux suggèrent que le RE serait plus fréquent en cas de stimulation mécanique débutant lors de l'expiration (Nishino and Honda, 1986; Poliacek et al., 2008), il n'existe pas d'élément permettant de statuer formellement quant à la nature de la réponse ventilatoire vis à vis d'une stimulation mécanique discriminante au sein du cycle respiratoire. Cette information pourrait être renseignée à envisager un modèle autorisant une stimulation mécanique discriminante isolée soit exclusivement à l'inspiration, soit à l'expiration.

L'objectif principal de cette étude préliminaire a ainsi été de déterminer si la stimulation mécanique trachéale discriminante est capable de déclencher une réponse ventilatoire (i.e. RT et/ou RE), et si la nature de la réponse défensive est liée au moment de la stimulation (i.e. inspiration – expiration).

2. Matériel et méthodes

Huit lapins de type Néo-Zélandais adultes (4,205 – 5,075 kg), anesthésiés et trachéotomisés ont été étudiés.

2.1. Anesthésie & préparation chirurgicale

L'induction de l'anesthésie est réalisée avec un mélange d'uréthane (N° CAS : 51-79-6) à la posologie de 500 mg kg⁻¹ et d'alpha-chloralose (N° CAS : 15879-93-3) à la posologie de 50 mg kg⁻¹. Après asepsie rigoureuse (peau nettoyée avec de l'alcool) du site de ponction, l'injection intra-veineuse du mélange anesthésique est effectuée à l'aide d'un cathéter placé dans la veine auriculaire marginale. La profondeur du niveau d'anesthésie est vérifiée toutes les 30 minutes. Après rasage de la fourrure en région cervicale antérieure, la trachée est abordée par une incision sagittale médiane des tissus cutanés puis dissection minutieuse des tissus sous cutanés et musculaires afin de respecter les nerfs vagues à proximité immédiate. La

trachée est partiellement sectionnée transversalement sur les $\frac{3}{4}$ de sa section et chaque lapin est 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. Cette préparation chirurgicale autorise une expérimentation en ventilation spontanée. La température corporelle est enregistrée en continu grâce à un thermomètre électronique (Physitemp Instruments, YSI 402 Clifton, NJ, USA) inséré dans le rectum, et maintenue entre 38.5 et 39.6 °C par l'utilisation de bouillottes chauffantes. La fréquence cardiaque est mesurée en continu à partir du signal d'électrocardiogramme provenant d'un cardioscope à 3 dérivations.

L'hébergement, l'anesthésie et la chirurgie réalisés sur ces animaux au cours de cette expérimentation sont en accord avec la directive 86/609/CEE du 24 novembre 1986 du Conseil de l'Union Européenne concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. L'application de cette directive se fait sous l'autorité du « Ministère de l'Agriculture et de la Pêche » et du « Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche » et sous supervision des « Services Vétérinaires Départementaux de Meurthe et Moselle ».

2.2. Acquisition des signaux et variables ventilatoires

L'acquisition des signaux analogiques est réalisée au moyen d'un système PowerLab 30 series (ADInstruments, ML880 PowerLab 16/30). La fréquence d'acquisition est de 160 Hz. Les données, une fois numérisées, sont ensuite stockées sur un disque puis ultérieurement analysées à l'aide du logiciel LabChart7-Pro (ADInstruments, v 7.1).

Le débit ventilé est mesuré au niveau de la canule de trachéotomie par un pneumotachographe de Fleisch # 0 (Metabo, Hepalinges, Switzerland), puis intégré pour obtenir le volume. Les volumes et débits pulmonaires sont enregistrés en continu cycle à cycle durant la totalité de l'expérimentation.

2.3. Stimulation trachéale et protocole

Un cathéter semi-rigide silastic® (1,2 mm, OD Metric) est introduit dans la canule de trachéotomie, et descendu le long de la paroi jusqu'à déclencher une quinte de toux. Cette position du cathéter est généralement atteinte 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. L'extrémité supérieure du cathéter est reliée à un moteur électrique rotatif (low voltage DC motors 719RE280, MFA/Comodrills, UK) assurant une rotation d'environ 60 tours min⁻¹. Lors de son activation, la rotation du moteur entraîne la rotation du cathéter dont l'extrémité libre provoque une stimulation mécanique trachéale. Les caractéristiques du moteur permettent d'obtenir un démarrage (temps de montée) et un arrêt (temps de descente) presque immédiats, autorisant un signal de stimulation mécanique considéré comme rectangulaire et ainsi de sélectionner précisément la durée de stimulation souhaitée. Cette durée de stimulation est fixée à 150 ms : suffisamment longue pour entraîner une réponse défensive respiratoire et suffisamment brève pour permettre une discrimination de la stimulation au sein du cycle respiratoire, i.e. au temps inspiratoire (T_I) ou au temps expiratoire (T_E). Le signal électrique du moteur rotatif est transmis à un ordinateur de façon concomitante aux signaux respiratoires permettant une identification immédiate du moment du cycle respiratoire durant lequel la stimulation est souhaitée.

Les stimulations trachéales sont réalisées alors que l'animal respire calmement et de façon régulière depuis au moins 1 min. Les stimulations sont réalisées à l'inspiration et à l'expiration. Environ 20 stimulations sont réalisées sur chaque lapin.

2.4. Analyse des données

Le cycle respiratoire dans lequel survient la stimulation trachéale est comparé visuellement avec les cycles précédant quant à une modification du volume courant (V_T) et du pic de débit expiré ($V'E_{pic}$). Le réflexe de toux (RT) est défini par une augmentation significative du volume courant (V_T) et du pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) et le réflexe expiratoire (RE) par une augmentation isolée du pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) non précédée d'une augmentation du volume courant (V_T). 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 ($V'E_{pic}$).

L'analyse statistique des données est réalisée avec le logiciel SYSTAT 11. Un test du Khi 2 (ou un test de Fisher en cas de faible taille de l'échantillon) a été utilisé concernant l'incidence et le type de réponse faisant suite à une stimulation trachéale mécanique. Une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour l'analyse quantitative des différents paramètres ventilatoires (V_T , T_I , T_E et $V'E_{pic}$). Le seuil de significativité retenu est $p < 0,05$. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm Ecart Type.

3. Résultats

3.1. Incidence et types de réponses

Suite à la stimulation trachéale mécanique, 3 types de réponses sont retrouvés :

- Le réflexe de toux isolé (RT)
- Le réflexe expiratoire isolé (RE)
- La réponse mixte débutant par un RE

Sur les 155 stimulations réalisées, 63 (41%) sont délivrées à l'inspiration et 92 (59%) à l'expiration. L'incidence des RT, RE et réponses mixtes est respectivement de 40 (26%), 32 (21%) et 11 (7%), et 72 stimulations (46%) n'ont pas déclenché de réponse. La nature des réponses n'est pas la même selon que la stimulation survient à l'inspiration ou à l'expiration ($p < 0,0001$). Les RT sont plus fréquents lorsque la stimulation survient à l'inspiration (37/63 ; 59%) par rapport à l'expiration (3/92 ; 3%).

Les RE sont en revanche plus fréquents à l'expiration (25/92 ; 27%) qu'à l'inspiration (7/63 ; 11%) de même que l'absence de réponse est plus fréquente à l'expiration (53/92 ; 58%) qu'à l'inspiration (16/63 ; 30%). Une réponse mixte débutant par un RE n'est observée qu'exclusivement lors de la stimulation en expiration (11/92 ; 12%). Ainsi, le RT isolé est presque exclusivement observé lors de la stimulation en inspiration (37/40 vs 3/40 à l'expiration, $p < 0,0001$), le RE isolé lors de l'expiration (25/32 vs 7/32 à l'inspiration), et la réponse mixte uniquement à l'expiration (11/11). Par ailleurs, les réponses comprenant un RT (RT isolé et réponse mixte débutant par un RE) surviennent principalement à l'inspiration (37/51 ; 73%) par rapport à l'expiration (14/51 ; 27% ; $p = 0,005$) alors que les réponses comprenant un RE (RE isolé et réponse mixte débutant par un RE) surviennent essentiellement à l'expiration (36/43 ; 84%) par rapport à l'inspiration (7/43 ; 16% ; $p < 0,001$).

3.2. Analyse quantitative des réponses

Le RT – comparé au cycle sans réponse ventilatoire à la stimulation trachéale mécanique – se caractérise par une augmentation significative des V_T et $V'E_{pic}$ ainsi qu'une diminution des T_E ($p < 0,0001$) et T_{TOT} ($p < 0,001$) et une augmentation du rapport V_T/T_{TOT} ($p < 0,0001$).

4. Discussion

Cette étude est la première à montrer qu'une brève stimulation trachéale mécanique discriminante est capable de déclencher une réponse ventilatoire dont la nature est très fortement corrélée au moment du cycle respiratoire favorisant un RT lorsque la stimulation survient à l'inspiration et un RE à l'expiration.

Rares sont les travaux démontrant que le RT aussi bien que le RE peuvent être déclenchés de façon reproductible par une stimulation trachéale (Nishino and Honda, 1986; Poliacek et al., 2008). En effet, la distinction entre RT et RE est très souvent ignorée (Widdicombe and Fontana, 2006), et le RE est bien souvent

assimilé à une variante du RT (Widdicombe and Fontana, 2006), alors que les mécanismes impliqués sont différents. Deux études (expérimentation animale) ont récemment étudié la réponse ventilatoire à une stimulation trachéale mécanique prolongée (> 5 sec), retrouvant une réponse comprenant un RE dans 54% des cas chez le lapin (Tatar et al., 2008) et dans 68% des cas chez le chat (Poliacek et al., 2008). Dans ces travaux, le RE survient préférentiellement en début de stimulation dans le cadre d'une réponse mixte et n'est qu'exceptionnellement décrit de façon isolée (Tatar et al., 2008). A l'inverse, notre travail montre qu'une brève stimulation trachéale est capable de provoquer principalement un RE isolé et plus occasionnellement une réponse mixte débutant par un RE. Des réponses isolées (RT ou RE) sont observées dans plus de la moitié des stimulations, contrastant avec les quintes de toux classiquement décrites en réponse à des stimulation mécaniques beaucoup plus longues (5 – 20 sec) (Bolser et al., 1999; Fontana and Widdicombe, 2007). L'autre principal résultat de notre étude est que le moment où survient la stimulation trachéale au cours du cycle respiratoire conditionne fortement la nature de la réponse défensive ventilatoire déclenchée. De façon générale, les stimulations réalisées lors de l'inspiration sont plus à même de provoquer une réponse défensive. De plus, le RT isolé n'est déclenché presque qu'exclusivement à l'inspiration, et le RT dans le cadre d'une réponse mixte est également principalement observé à l'inspiration. A l'inverse, le RE (isolé ou dans le cadre d'une réponse mixte) est plus fréquemment observé quand la stimulation survient à l'expiration.

Cette nette différence d'incidence des RT et des RE selon que la stimulation survient à l'inspiration ou à l'expiration ne peut théoriquement être expliquée que par les caractéristiques du stimulus mécanique, le niveau d'activation des mécanorécepteurs broncho-pulmonaires ainsi que par leurs connexions au niveau du noyau du tractus solitaire et par conséquent les mécanismes d'intégration au niveau de la commande centrale de la respiration.

Les modifications de pression au niveau de la paroi trachéale lors des mouvements respiratoires sont vraisemblablement à l'origine d'une modification d'activation des mécanorécepteurs des afférences impliquées (Syntichaki and Tavernarakis, 2004). Ainsi, le niveau d'activation à l'inspiration favoriserait la

survenue d'un réflexe de toux, à l'image des résultats retrouvés dans notre travail. Cependant, il est également démontré que les RARs répondent plus aux variations de pressions dans le temps qu'à l'intensité de la pression (Widdicombe, 2006b) comme en témoigne l'absence d'activité lors d'une immobilisation (quel que soit le niveau d'intensité du stimulus mécanique appliqué). Ce dernier point est également retrouvé dans notre travail dans la mesure où les RT et RE ne sont observés qu'au moment de la stimulation trachéale (i.e. lors de la rotation du cathéter) et qu'exceptionnellement au décours (i.e. après la fin de la rotation du cathéter).

Ce travail montre ainsi une différence de réponse défensive selon que la stimulation trachéale mécanique survient à l'inspiration ou à l'expiration. Ce résultat suggère peut être que la commande nerveuse centrale joue un rôle d'intégration des différentes afférences provenant des RARs, des fibres A- δ ainsi que des autres mécanorécepteurs pouvant déclencher et faciliter la toux (Bolser et al., 2006; Bonham et al., 2004; Shannon et al., 2004). Un exemple de cette intégration pourrait être la modulation de la réponse défensive à une stimulation mécanique des voies aériennes par les SARs. L'implication de mécanismes centraux est également confortée au regard de l'inhibition du RT (fréquence et intensité) par la codéine alors que cette dernière substance n'a que très peu d'effet sur le RE. L'intégration centrale est ainsi très certainement capable de transformer les messages afférents en des réponses motrices complexes bien distinctes que sont le RT et le RE.

La conclusion de ce premier travail est que la stimulation mécanique trachéale discriminante au sein du cycle respiratoire favorise la survenue du RT à l'inspiration et celle du RE à l'expiration. Ces résultats autorisent ainsi une approche plus fine de ces différentes réponses défensives et suggèrent bien l'implication de mécanismes différents à l'origine du RT et du RE. Par ailleurs, la nature différente de la réponse ventilatoire selon le moment du cycle auquel survient la stimulation souligne également très certainement le rôle des variations d'activation des mécanorécepteurs au cours de la respiration ainsi que l'importance de l'intégration centrale. Ce travail préliminaire est à la base du second travail présenté ci-après.

ETUDE

***Stimulation nasale par l'eau et désensibilisation du réflexe de toux
chez le lapin anesthésié***

A. Introduction

La toux peut être déclenchée par la stimulation chimique ou mécanique des différents récepteurs du nerf vague. Sa fonction première est le drainage trachéo-bronchique en assurant la clairance du mucus endogène d'une part et l'expulsion des particules exogènes inhalées et déposées dans l'arbre trachéo-bronchique d'autre part. Les afférences vagales trachéo-bronchiques participent ainsi pleinement à assurer cette fonction de défense. Néanmoins, les afférences nerveuses vagales ne se distribuent pas exclusivement aux territoires trachéo-bronchiques pouvant être à l'origine d'un réflexe de toux, sans systématiquement répondre à sa fonction physiologique première de défense. C'est le cas par exemple d'un réflexe de toux déclenché suite à la stimulation d'afférences vagales non trachéo-bronchiques comme sa branche auriculaire. De la même manière, les voies aériennes respiratoires ne sont pas exclusivement innervées par le nerf vague, et la stimulation irritative des voies aériennes n'entraîne pas nécessairement un réflexe de toux. Ainsi, la stimulation des terminaisons nerveuses trigémინées de la muqueuse nasale saine peut déclencher des réponses défensives variées mais n'incluant pas le réflexe de toux. A l'inverse, dans des conditions expérimentales d'inflammation nasale, on peut observer une sensibilisation du réflexe de toux comme cela a été démontré en cas de rhinite (Brozmanova et al., 2008; Plevkova et al., 2004a; Plevkova et al., 2004b; Tatar et al., 2009). S'il existe dans la littérature de nombreuses données témoignant d'une sensibilisation possible du réflexe de toux à partir de messages à point de départ nasal, très peu nombreuses sont les données allant dans le sens d'une désensibilisation de ce réflexe intégrant une action au niveau de cette même muqueuse nasale. De telles informations sont cependant nécessaires afin de permettre une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans une telle désensibilisation.

L'instillation d'eau au niveau de la muqueuse nasale peut provoquer une apnée dont la finalité est d'empêcher toute pénétration de liquide au sein des voies aériennes (Angell James and Daly Mde, 1969). D'un point de vue téléologique (i.e. finalité), l'application d'un tel stimulus à l'entrée des voies aériennes (capable d'inhiber la ventilation, i.e. apnée) devrait également avoir un effet sur le réflexe de

toux en l'inhibant. En effet, le réflexe de toux est constitué de 3 phases distinctes : une première inspiratoire, suivie d'une expiration forcée contre glotte fermée également appelée phase compressive, et se termine par une phase expulsive contemporaine de l'ouverture soudaine de la glotte. Cette séquence de 3 phases consécutives confère à ce réflexe sa fonction de drainage trachéo-bronchique en assurant la clairance du mucus et des particules inhalées. La phase inspiratoire est absolument fondamentale car elle autorise une entrée importante d'air dans les poumons afin d'augmenter la force d'expulsion et ainsi d'optimiser la phase expulsive (Fontana and Widdicombe, 2007). Ainsi, à imaginer l'instillation nasale d'eau, la phase inspiratoire du réflexe de toux serait responsable d'une aspiration délétère de liquide vers les voies aériennes, raison pour laquelle il semblerait légitime d'envisager une inhibition du réflexe de toux dans de telles conditions. A l'inverse, le réflexe expiratoire n'est lui constitué que des 2 dernières phases du réflexe de toux (i.e. absence de phase inspiratoire initiale) lui conférant une finalité propre en prévenant toute entrée de corps étrangers ou de particules au sein de l'arbre trachéo-bronchique (Korpas, 1972; Korpas and Tatar, 1972 ; Widdicombe and Fontana, 2006). En cas d'instillation nasale d'eau, ce dernier réflexe devrait quant à lui ne pas être inhibé car empêchant l'inondation des voies aériennes respiratoires.

A notre connaissance, la littérature disponible ne rapporte pas de données sur l'interaction entre l'apnée induite par une stimulation de la muqueuse nasale et les réflexes de défense respiratoire représentés par les réflexes de toux et expiratoire. L'objectif de cette étude a donc été de déterminer si une stimulation trachéale mécanique est capable de déclencher un réflexe de défense respiratoire (reflexes de toux ou expiratoire) lors d'une apnée provoquée par l'instillation d'eau au niveau de la muqueuse nasale. Un modèle animal précédemment développé et validé, autorisant l'étude de la réponse ventilatoire à une stimulation trachéale mécanique, a été utilisé (Varechova et al., 2011; Varechova et al., 2010). L'hypothèse de travail étant une désensibilisation de la toux durant cette apnée.

B. Matériel et méthodes

Douze lapins de type Néo-Zélandais adultes ($3,57 \pm 1,15$ kg), anesthésiés et trachéotomisés ont été étudiés.

1. Anesthésie et préparation chirurgicale

1.1. Anesthésie

L'induction de l'anesthésie est réalisée avec un mélange d'uréthane (N° CAS : 51-79-6) à la posologie de 500 mg kg^{-1} et d'alpha-chloralose (N° CAS : 15879-93-3) à la posologie de 50 mg kg^{-1} . Après asepsie rigoureuse (peau nettoyée avec de l'alcool) du site de ponction, l'injection intra-veineuse du mélange anesthésique est effectuée à l'aide d'un cathéter placé dans la veine auriculaire marginale. La profondeur du niveau d'anesthésie est vérifiée toutes les 30 minutes en s'assurant de la disparition des réflexes cornéen et de pincement de l'oreille, témoins d'une anesthésie de profondeur moyenne. En cas d'anesthésie légère (i.e, réflexe cornéen, modification notable du rythme ventilatoire, cri), des doses supplémentaires du mélange sont administrées.

1.2. Préparation chirurgicale

Après rasage de la fourrure en région cervicale antérieure, la trachée est abordée par une incision sagittale médiane des tissus cutanés puis dissection minutieuse des tissus sous cutanés et musculaires afin de respecter les nerfs vagues à proximité immédiate. La trachée est partiellement sectionnée transversalement sur les $\frac{3}{4}$ de sa section et chaque lapin est 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 4-A, B). La partie proximale de la trachée est quant à elle ligaturée. Une aspiration trachéo-bronchique est enfin réalisée afin

d'évacuer des voies aériennes la présence éventuelle de sang lié au temps chirurgical (section trachéale essentiellement). Cette préparation chirurgicale autorise une expérimentation en ventilation spontanée.

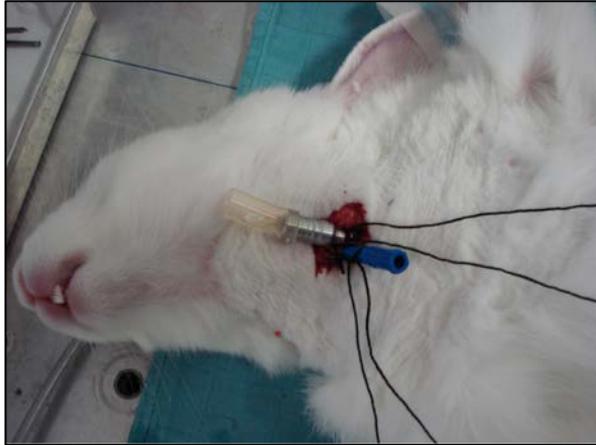
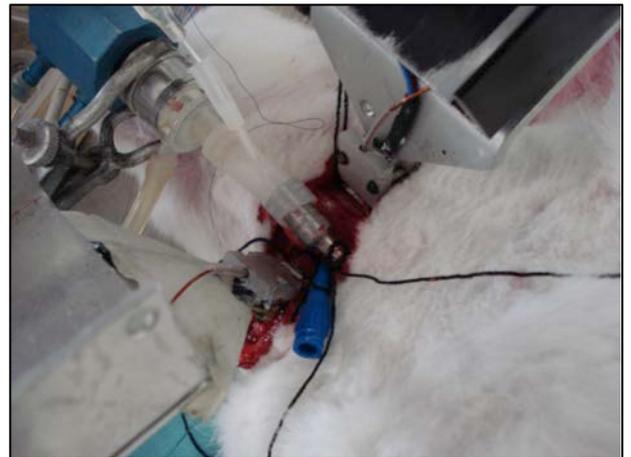


Fig 4-A: Canule de trachéotomie en place dans la trachée du lapin.

Fig 4-B: Canule de trachéotomie connectée au moteur rotatif et au pneumotachographe.



L'hypothermie tendant à accroître la profondeur de l'anesthésie durant une procédure chirurgicale, la température corporelle est enregistrée en continu grâce à un thermomètre électronique (Physitemp Instruments, YSI 402 Clifton, NJ, USA) inséré dans le rectum, et maintenue entre 38.5 et 39.6 °C par l'utilisation de bouillottes chauffantes.

La fréquence cardiaque est mesurée en continu à partir du signal d'électrocardiogramme provenant d'un cardioscope à 3 dérivation.

L'hébergement, l'anesthésie et la chirurgie réalisés sur ces animaux au cours de cette expérimentation sont en accord avec la directive 86/609/CEE du 24 novembre 1986 du Conseil de l'Union Européenne concernant le rapprochement des dispositions législatives, règlementaires et administratives des Etats membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. L'application de cette directive se fait sous l'autorité du « Ministère de l'Agriculture et de la Pêche » et du « Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche » et sous supervision des « Services Vétérinaires Départementaux de Meurthe et Moselle ».

2. Acquisition des signaux

L'acquisition des signaux analogiques est réalisée au moyen d'un système PowerLab 30 series (ADInstruments, ML880 PowerLab 16/30). La fréquence d'acquisition est de 200 Hz, et la résolution de l'échantillonnage de 16 bits. Les données, une fois numérisées, sont ensuite stockées sur un disque puis ultérieurement analysées à l'aide du logiciel LabChart7-Pro (ADInstruments, v 7.1).

3. Variables ventilatoires

La préparation chirurgicale autorise la ventilation spontanée sur la totalité du temps d'expérimentation. Le débit ventilé est mesuré au niveau de la canule de trachéotomie par un pneumotachographe de Fleisch # 0 (Metabo, Hepalinges, Switzerland), puis intégré pour obtenir le volume. Les volumes et débits pulmonaires sont enregistrés en continu cycle à cycle durant la totalité de l'expérimentation.

4. Stimulation trachéale

Un cathéter semi-rigide silastic[®] (0,7 mm, OD Metric) est introduit dans la canule de trachéotomie, et descendu le long de la paroi jusqu'à déclencher une quinte de toux. Cette position du cathéter est généralement atteinte 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 donnée après chaque expérimentation par vérification autopsique des lésions macro et microscopiques de la trachée. L'extrémité supérieure du cathéter est reliée à un moteur électrique rotatif (low voltage DC motors 719RE280, MFA/Comodrills, UK) assurant une rotation d'environ 60 tours min⁻¹. Lors de son activation, la rotation du moteur entraîne la rotation du cathéter dont l'extrémité libre provoque une stimulation mécanique trachéale (Figure 5). Les caractéristiques du moteur permettent d'obtenir un démarrage (temps de montée) et un arrêt (temps de descente) presque immédiats, autorisant un signal de stimulation mécanique considéré comme rectangulaire et ainsi de sélectionner précisément la durée de stimulation souhaitée. Cette durée de stimulation est fixée à 300 ms : suffisamment longue pour entraîner une réponse défensive respiratoire et suffisamment brève pour permettre une discrimination de la stimulation au sein du cycle respiratoire, i.e. au temps inspiratoire (TI) ou au temps expiratoire (TE). Le signal électrique du moteur rotatif est transmis à un ordinateur de façon concomitante aux signaux respiratoires permettant une identification immédiate du moment du cycle respiratoire durant lequel la stimulation est souhaitée.

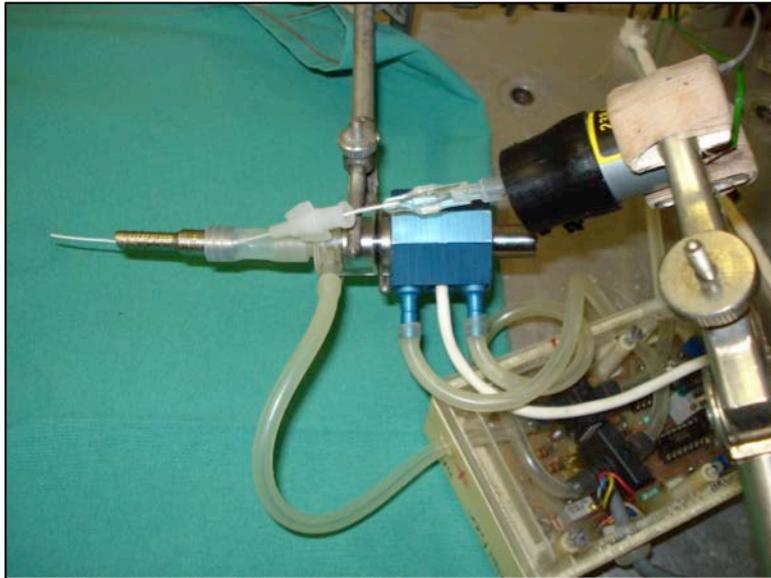


Fig 5: Moteur rotatif et cathéter permettant la stimulation trachéale mécanique.

5. Stimulation nasale

L'extrémité d'un cathéter semi-rigide silastic® (1,3 mm, OD Metric) est introduite dans la narine de l'animal pour être positionnée jusqu'à une profondeur approximative comprise entre 5 et 10 mm. L'introduction du cathéter se fait lentement en veillant à éviter d'entrer en contact avec la paroi nasale. L'instillation est alors réalisée de façon continue dans cette position jusqu'à obtenir une réponse ventilatoire, pour une durée maximale de 10 s ou un volume liquidien maximal de 5 mL (en cas d'absence de réponse ventilatoire). Afin de prévenir toute contamination laryngée par le fluide instillé, les épaules de l'animal sont légèrement surélevées de sorte que la tête du lapin se trouve toujours en position discrètement décline. Ainsi, le drainage du liquide instillé se fait essentiellement par les narines (homo ou controlatérales). En cas de réponse défensive de type éternuement soit au moment de l'insertion nasale du cathéter soit de façon contemporaine du début de l'instillation, la stimulation trachéale mécanique est retardée des quelques secondes jusqu'à obtenir un état stable.

Dans le cadre de notre expérimentation, l'apnée est définie comme un allongement visible du temps expiratoire (TE) correspondant au minimum à un doublement du TE par rapport au TE basal de référence observée sur la minute précédant l'instillation. A la suite de chaque instillation, une aspiration des cavités nasales est réalisée afin d'assurer un drainage optimal du liquide administré

antérieurement. Les stimulations liquidiennes sont réalisées chez chaque animal avec du sérum salé isotonique (ne provoquant pas d'apnée) ainsi que de l'eau distillée (apnée).

6. Electromyographie des muscles abdominaux

Une électromyographie des muscles abdominaux a été réalisée sur 3 lapins au moyen d'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.

7. Protocole

Seuls les lapins capables d'une réponse défensive au moment de l'insertion du cathéter dans la trachée suite au temps chirurgical et à l'installation de la trachéotomie ont été conservés pour l'analyse des données. Chez ces animaux, l'ensemble des stimulations trachéales est ensuite systématiquement réalisé alors que l'animal respire calmement et de façon régulière depuis au moins 1 min. Le protocole considère pour chaque lapin 3 conditions distinctes : i- ventilation spontanée au repos (condition contrôle), ii- instillation nasale de sérum salé isotonique et iii- instillation nasale d'eau distillée. Pour les 2 premières conditions (i, ii), l'ensemble des stimulations trachéales a systématiquement été réalisé lors de l'expiration (TE). Pour la dernière condition (iii), les stimulations trachéales ont systématiquement été réalisées lors de l'apnée provoquée. Les stimulations trachéales contrôles (i) sont réalisées tout au long de la manipulation afin de s'assurer de la persistance d'une réponse défensive aux différents temps de l'expérimentation. Pour chaque lapin, au moins 2 stimulations en condition contrôle (i) sont réalisées en début de manipulation, après instillation d'eau distillée (iii) et après instillation de sérum physiologique (ii). Suite à la réalisation de 2 premières stimulations trachéales contrôles (i), l'instillation nasale d'eau distillée (iii) et de

sérum physiologique (ii) est réalisée de façon randomisée avec au moins 2 stimulations trachéales dans chacune de ces 2 conditions (ii et iii).

8. Analyse des données

Un cycle respiratoire de référence ($_{ref}$) est déterminé au repos dans les conditions basales avant chaque stimulation trachéale (i) ou avant chaque instillation (ii et iii) . Ce cycle de référence est calculé en réalisant la moyenne sur 3 cycles consécutifs de chacun des paramètres ventilatoires suivants : Volume courant (V_T), temps inspiratoire (T_I) et expiratoire (T_E) et pic de débit expiré ($V'E_{pic}$). Pour chacun des paramètres est également calculé l'écart-type (ET) permettant de renseigner la variabilité des ces paramètres au cours de la ventilation spontanée. Ainsi, une réponse défensive significative à une stimulation trachéale mécanique ($_{stim}$) est définie par une réponse dont les paramètres ventilatoires considérés sont en dehors du 99^{ème} percentile, i.e. supérieur à la moyenne + 3 ET. Ce cycle de référence est calculé en conditions basales avant chaque stimulation trachéale et pour chacune des 3 conditions expérimentales (i, ii et iii) afin de permettre la comparaison entre les paramètres ventilatoires faisant immédiatement suite à la stimulation trachéale ($_{stim}$) et ceux calculés du cycle de référence ($_{ref}$) précédant cette même stimulation trachéale.

Le réflexe de toux (RT) est ainsi définit par une augmentation significative du volume courant (V_T) et du pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) et le réflexe expiratoire par une augmentation isolée du pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) non précédée d'une augmentation du volume courant (V_T) :

➤ RT :	$V_{T_{stim}} > V_{T_{ref}} + 3 ET$
	$V'E_{pic_{stim}} > V'E_{pic_{ref}} + 3 ET$
➤ ER :	$V_{T_{stim}} < V_{T_{ref}} + 3 ET$

$$\mathbf{V'E_{pic\ stim} > V'E_{pic\ ref} + 3 ET}$$

Durant les apnées (iii), de brefs efforts expulsifs comparables à ceux caractérisant le réflexe expiratoire ont été observés, mais avec un pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) nettement atténué à ces dernières réponses défensives. Le pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) est alors soit comparable à celui du cycle de référence, soit inférieur à ce dernier, définissant un réflexe expiratoire atténué (aRE). 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 ($V'E_{pic}$) par rapport au cycle de référence précédent.

➤ AR :

$$\mathbf{V_{Tref} - 3 ET < V_{Tstim} < V_{Tref} + 3 ET}$$
$$\mathbf{V'E_{pic\ ref} - 3 ET < V'E_{pic\ stim} < V'E_{pic\ ref} + 3 ET}$$

L'analyse statistique des données est réalisée avec le logiciel JMP 9.0.0 (2010 SAS Institute Inc) permettant des comparaisons des différentes données aussi bien qualitatives que quantitatives. Un test du Khi 2 (ou un test de Fisher en cas de faible taille de l'échantillon) a été utilisé concernant l'incidence et le type de réponse faisant suite à une stimulation trachéale mécanique dans les différentes conditions (i, ii, iii). Une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour l'analyse quantitative des différents paramètres ventilatoires (V_T , T_I , T_E et $V'E_{pic}$). Le seuil de significativité retenu est $p < 0,05$. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ET.

C. Résultats

Un total de 171 stimulations trachéales a été réalisé. Ces stimulations permettent la description de 5 types de réponses distinctes :

- Le réflexe de toux isolé (RT)
- Le réflexe expiratoire isolé (RE)
- La réponse mixte (i.e réflexe expiratoire prolongé d'un ou plusieurs réflexe de toux)
- Le réflexe expiratoire atténué (aRE)
- L'absence de réponse (AR)

Chaque animal s'est vu délivré $6 \pm 0,3$ stimulations trachéales en condition contrôle (i), $5,3 \pm 0,8$ stimulations suite à l'instillation nasale d'eau distillée (iii) et $2,8 \pm 0,4$ stimulations suite à l'instillation nasale de sérum salé isotonique (ii). La comparaison des paramètres ventilatoires (V_T , T_I , T_E et $\dot{V}'E_{pic}$) de référence dans les 3 conditions (i, ii, iii) ne retrouve aucune différence significative. De même l'absence de réponse (AR) à la stimulation trachéale mécanique est comparable dans les 3 conditions : contrôle (18%), sérum physiologique (21%) et eau distillée (17%). Ces résultats sont présentés dans le tableau 1.

Condition	Contrôle	Sérum salé	Eau
n	73	34	64
Caractéristiques du cycle respiratoire de référence			
$T_{I\ ref}$ (msec)	693 ± 134	718 ± 117	753 ± 188
$T_{E\ ref}$ (msec)	1678 ± 1112	1900 ± 1316	1669 ± 485
$V_{T\ ref}$ (ml)	22.5 ± 4.6	20.9 ± 5.5	21.5 ± 4.7
$\dot{V}'E_{peak.ref}$ (ml/sec)	76.1 ± 17.1	68.4 ± 21	75.8 ± 15.3

Nature des réponses expulsives suite à la stimulation trachéale			
RT	1 (1 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
RE	31 (43 %)	14 (41 %)	52* (81 %)
Réponse mixte	28 (38 %)	13 (38 %)	1* (2%)
AR	13 (18 %)	7 (21%)	11 (17 %)

Tableau 1 : Caractéristiques du cycle respiratoire de référence et nature des réponses expulsives suite à la stimulation trachéale. (*) $p < 0.0001$ vs contrôle ou serum salé.

Soixante treize stimulations ont été réalisées au repos dans la condition contrôle (i). En réponse à ces stimulations, ont été observés : un réflexe expiratoire (RE) dans 43% des cas (Figure 6), une réponse mixte dans 38 % des cas – correspondant à un RE prolongé d'un seul ou de 2 RT (respectivement 71 et 29 %) – (Figure 7). Le réflexe de toux n'a pu être observé qu'à une seule reprise (Tableau 1). Cette même répartition de la nature des réponses à la stimulation trachéale mécanique est observée lors de l'instillation de sérum physiologique (ii). Sur les 34 stimulations délivrées, 41 % des réponses défensives sont des RE, et 38 % des réponses mixtes - RE prolongé d'un seul ou de 2 RT (respectivement 69 et 31 %) – (Figure 8).

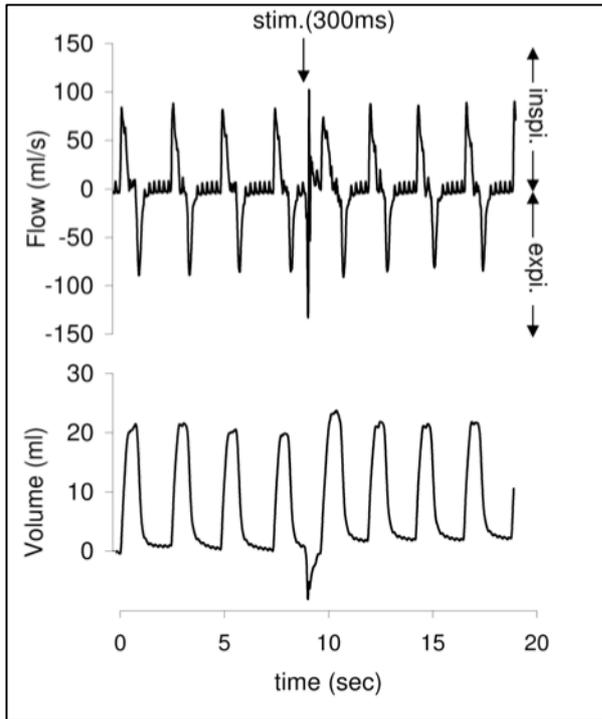
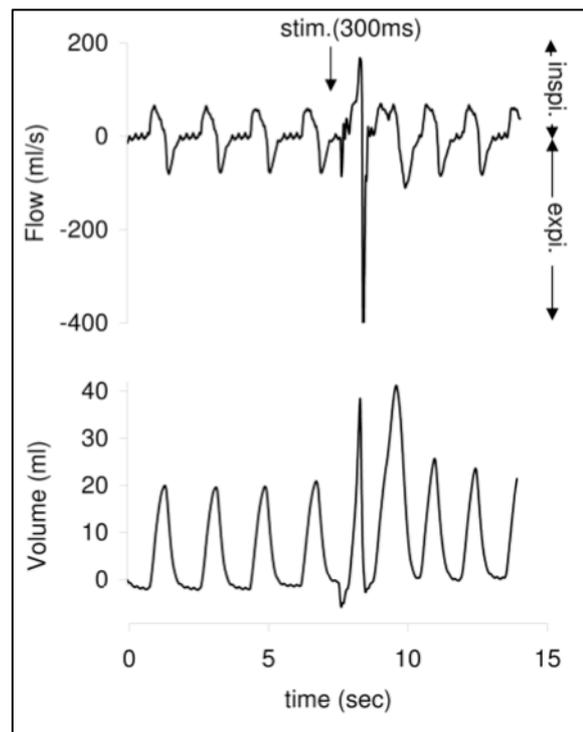


Fig 6: Réflexe expiratoire (RE) caractérisé par une augmentation significative du pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) non précédée d'une augmentation du volume courant (V_T). La flèche indique le début de la stimulation trachéale.

Fig 7: Réponse mixte débutant par un réflexe expiratoire (RE), suivi de 2 réflexes de toux (RT). Le RE est caractérisé par une augmentation du pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) non précédée d'une augmentation du volume courant (V_T). Le RT est caractérisé par une augmentation du volume courant (V_T) et du pic de débit expiré ($V'E_{pic}$). La flèche indique le début de la stimulation trachéale.



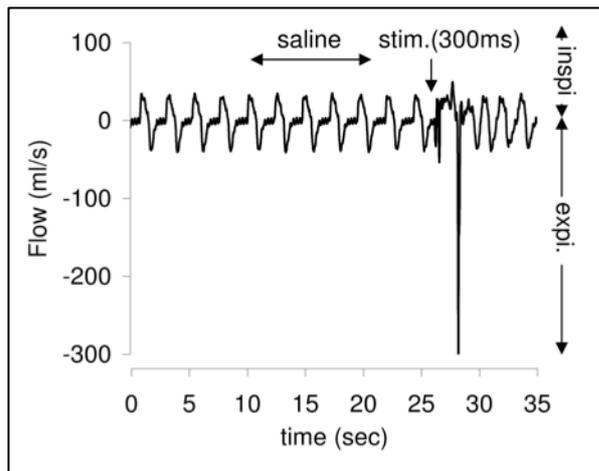


Fig 8: Réponse mixte débutant par un réflexe expiratoire (RE), suivi d'un réflexe de toux (RT), suite à l'instillation de serum sale.

L'instillation nasale d'eau distillée provoque systématiquement la survenue d'une apnée de durée néanmoins variable (Figures 9 et 10). Sur l'ensemble des instillations nasales dans cette condition (iii), la durée moyenne d'apnée est de $5,8 \pm 2,5$ s. Aucun réflexe de toux (RT) n'est observé. En revanche, 81% des réponses sont des réflexes expiratoires. L'analyse quantitative réalisée permet toutefois de caractériser plus précisément ces réflexes expiratoires en distinguant clairement la présence d'une majorité (52%) de réflexes expiratoires atténués (aRE – Figure 10-B). Le pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) de ces aRE est en effet nettement inférieur à ceux observés dans les conditions i et ii (Tableau 2). Dans certains cas, l'amplitude du pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) mesuré était très fortement diminué questionnant la nature même de la réponse de défense respiratoire entre réflexe expiratoire atténué (aRE) et absence de réponse (AR). La réalisation d'enregistrements électromyographiques sur 3 lapins montre toutefois que la présence d'un pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) aussi faible soit il, est systématiquement associé à une contraction des muscles expiratoires témoignant ainsi d'une réponse défensive de type aRE et non d'une AR (Figure 10). Seulement 2 % des stimulations ont provoqué des réponses mixtes (Tableau 1).

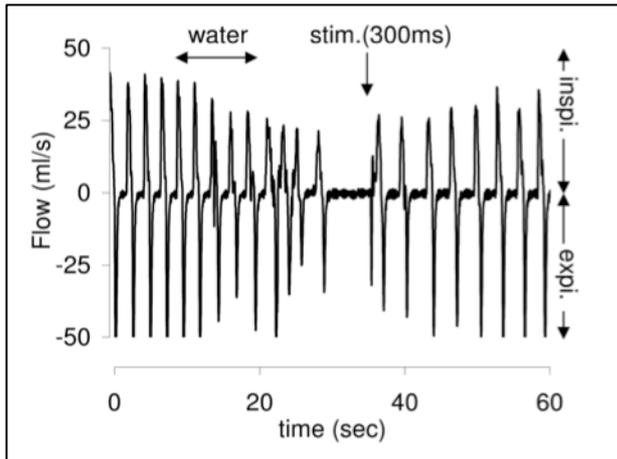


Fig 9: Réflexe expiratoire atténué (aRE) lors de l'apnée suite à l'instillation d'eau distillée.

Au total, il a été observé plus de réflexes expiratoires (RE) et moins de réponses mixtes ($p < 0,0001$) lors de l'instillation d'eau distillée que dans les 2 autres conditions : contrôle (i) et sérum physiologique (ii) (Tableau 1). Néanmoins, la plupart des réflexes expiratoires (RE) observés suite à l'instillation d'eau distillée correspondent à des RE atténués (aRE). Cette dernière réponse (i.e. aRE) n'est d'ailleurs observée que dans la condition iii (eau distillée) (Tableau 2). Le pic de débit expiré ($V'E_{pic}$) des réflexes expiratoires est également plus faible ($p < 0,0001$) quand cette réponse défensive est observée suite à l'instillation d'eau distillée (vs i et ii) (Tableau 2). L'incidence des réponses défensives comprenant un réflexe de toux (i.e. réflexe de toux isolé et réponse mixte) est plus faible ($p < 0,0001$) en cas d'instillation d'eau distillée (iii) que dans les 2 autres conditions (i, ii) (Tableau 1).

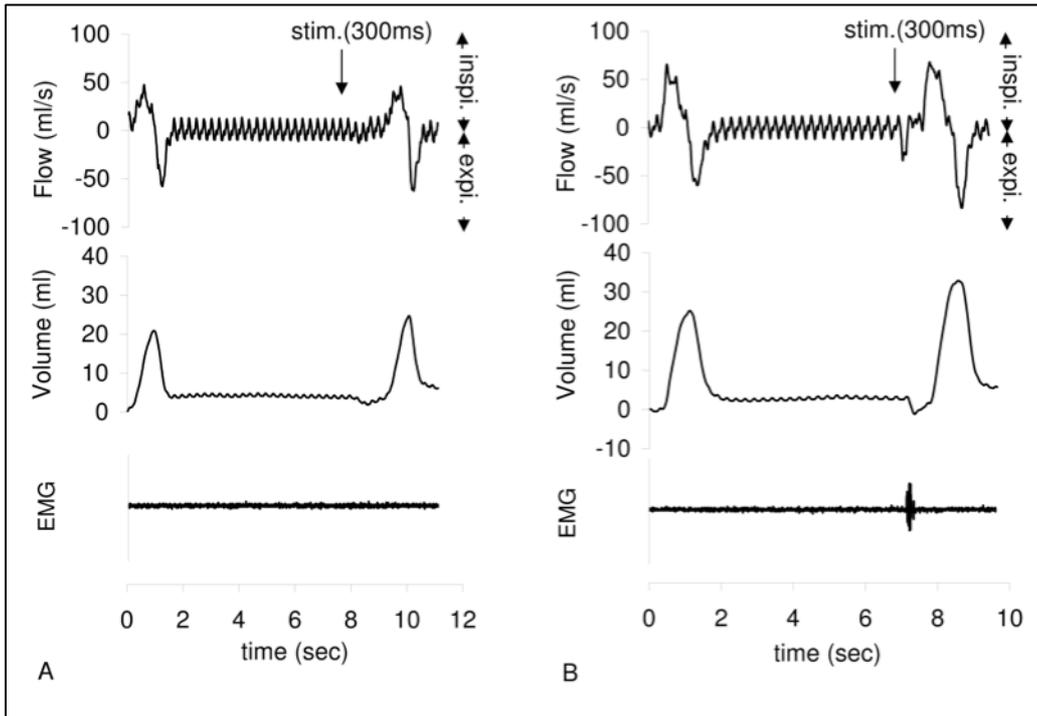


Fig 10 (A-B): **A** – Absence de réponse (AR) suite à une stimulation trachéale mécanique lors de l'apnée. L'AR est caractérisée par l'absence de modification du volume courant (V_T) et du pic de débit expiré ($V'_{E_{pic}}$) par rapport au cycle de référence. **B** - Réflexe expiratoire atténué (aRE) lors de l'apnée suite à l'instillation d'eau distillée. L'enregistrement électromyographique des muscles abdominaux permet de distinguer l'AR du aRE en objectivant une activité des muscles respiratoires expiratoires lors de l'aRE (B), absente en cas d'AR (A).

Condition	Contrôle	Sérum salé	Eau
RE / aRE	31 / 0	14 / 0	19 / 33*
$\dot{V}_{E_{peak}}$ (ml/sec)	89.8 ± 29.9	87.8 ± 37.8	55.8 ± 24.5*
n	31	14	52

Tableau 2 : Caractéristiques des réflexes expiratoires suite à la stimulation trachéale dans les 3 conditions. (*) $p < 0.0001$ vs contrôle ou serum salé.

D. Discussion

La toux est l'expression d'une intégration médullaire de messages afférents, provenant de différents récepteurs et cheminant par l'intermédiaire du nerf vague (Widdicombe et al., 2011). Il a été démontré que le réflexe de toux est capable d'une certaine plasticité que se soit au niveau des récepteurs périphériques impliqués (Carr and Lee, 2006) ou encore au niveau intégratif supérieur (Bonham et al., 2004). Les afférences nerveuses localisées dans la muqueuse nasale ne sont pas capables de déclencher une toux, mais ce réflexe de défense respiratoire peut être sensibilisé dans des conditions expérimentales de rhinite chez l'animal (Brozmanova et al., 2008). De façon similaire chez l'homme, la rhinite mais surtout la rhinopharyngite sont des états pathologiques classiquement pourvoyeurs de toux chronique (Chung and Pavord, 2008; Pratter, 2006). Ainsi, la plupart des données disponibles dans la littérature suggèrent que les afférences nerveuses nasales jouent un rôle dans le sens d'une sensibilisation de la toux du fait d'un état inflammatoire local de la muqueuse (Plevkova et al., 2009b; Plevkova et al., 2004a; Plevkova et al., 2004b; Tatar et al., 2009 ; Taylor-Clark et al., 2005). En revanche, et contrairement aux autres sites (comme la bouche, le pharynx, les voies aériennes ou encore les poumons) également capables d'une désensibilisation de la toux, il n'existe pas de preuve disponible à ce jour démontrant une éventuelle désensibilisation de la toux à partir d'informations en provenance de la muqueuse nasale (Widdicombe et al., 2011).

L'apnée provoquée par l'instillation d'eau distillée au niveau de la muqueuse nasale est associée à une importante dépression de la réponse tussive suite à la stimulation trachéale mécanique chez le lapin. Dans notre étude, le temps expiratoire (TE) a systématiquement été utilisé pour définir les conditions de référence quant au moment de la stimulation trachéale. En effet, un précédent travail réalisé au sein de notre équipe sur ce modèle animal de toux a pu montrer la très forte relation entre la nature de la réponse défensive à la stimulation trachéale (RT, RE) et le moment du cycle respiratoire auquel la stimulation survient (Ti, TE). Le principal résultat de cette étude étant que le réflexe de toux survient préférentiellement en cas de stimulation trachéale au Ti, alors que le réflexe expiratoire survient préférentiellement lorsque la

stimulation est délivrée au TE (Varechova et al., 2011; Varechova et al., 2010). Notre choix de stimulation trachéale au TE est ainsi propice au déclenchement d'une réponse défensive de type réflexe expiratoire. Les caractéristiques mécaniques des voies aériennes et celles du parenchyme pulmonaire ainsi que le niveau d'activation des différents mécanorécepteurs sont également très proches en apnée et lors du TE, justifiant d'autant notre choix d'une stimulation au TE. En effet, les RARs des voies aériennes et pulmonaires sont activés lors de la phase dynamique d'une inflation pulmonaire (Sant'Ambrogio and Widdicombe, 2001; Widdicombe, 2003) puis rapidement quiescents lors de la phase statique de cette inflation (Figure 11). Ainsi, il a été démontré dans la plupart des espèces, une activité de ces récepteurs lors de l'inspiration (McAlexander et al., 1999) avec en revanche une activité basale (i.e. apnée ou TE) extrêmement faible. L'activité des SARs est quant à elle minimale et comparable en apnée ou lors de l'expiration (Figure 12). A la lumière des ces connaissances, la stimulation trachéale mécanique a systématiquement été délivrée au TE dans les 3 conditions (i, ii, iii) afin de s'assurer d'un état d'activation des RARs et des SARs comparable et d'optimiser la pertinence des comparaisons des réponses tussives dans ces 3 conditions.

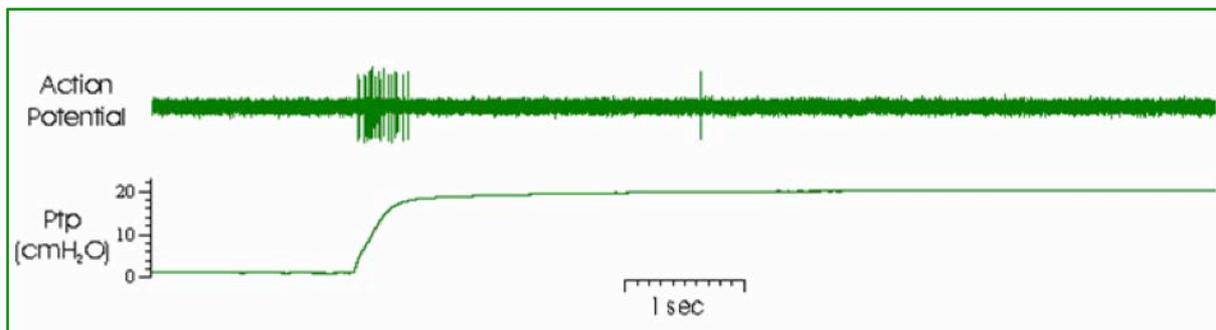


Fig 11: Activité électrique (technique de la fibre unique permettant l'enregistrement des potentiels d'action) des RARs. L'activité des RARs est fortement augmenté par une inflation pulmonaire, puis s'adapte rapidement à cette inflation continue persistante (données personnelles).

Un réflexe de toux isolé n'a été observé qu'exceptionnellement (1%) lors des stimulations trachéales en condition contrôle (i). En revanche, en considérant les réflexes de toux faisant suites à un réflexe expiratoire dans le cadre des réponses

mixtes, le réflexe de toux a été observé dans presque 40% (Tableau 1) des cas en condition contrôle (i), mais également suite à l'instillation de sérum physiologique (ii).

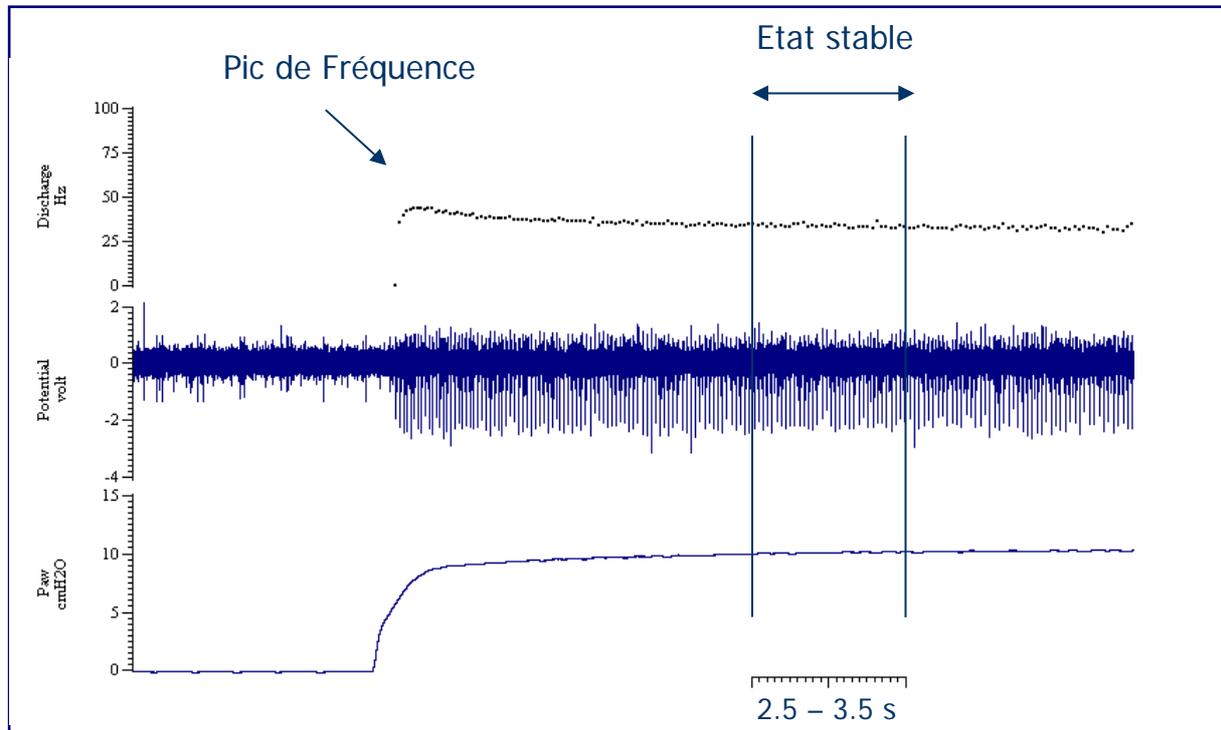


Fig 12: Activité électrique des SARs (technique d'enregistrement de la fibre unique). L'activité électrique des SARs augmente fortement lors d'une inflation pulmonaire et reste élevée tant que l'état d'inflation perdure (données personnelles).

Suite à l'instillation d'eau distillée (iii), le réflexe de toux est considérablement inhibé que ce soit en tant que réflexe de toux isolé (absent) ou bien même en tant que composante d'une réponse mixte. En effet, ce réflexe de toux (RT isolé et RT dans le cadre d'une réponse mixte) n'est observé que dans 2% des cas en condition iii. L'incidence de la toux (RT isolé et RT dans le cadre d'une réponse mixte) est ainsi significativement plus faible ($p < 0,0001$) suite à l'instillation nasale d'eau distillée (iii) qu'en condition contrôle (i) et suite à l'instillation de sérum physiologique. L'incidence de la toux n'est en revanche pas différente entre les conditions i (contrôle) et ii (sérum physiologique). Ces résultats suggèrent ainsi fortement que la considérable inhibition de la toux dans la condition iii est liée à l'apnée et/ou à l'hypo-osmolarité du stimulus (eau distillée) appliqué au niveau de la muqueuse nasale. Contrastant avec cette forte inhibition du réflexe de toux, l'instillation nasale d'eau distillée ne semble pas avoir d'effet sur l'incidence du réflexe expiratoire comme le suggère l'absence de

différence entre les 3 conditions. Néanmoins, l'analyse quantitative autorisée par le modèle animal développé permet d'individualiser l'existence d'une réponse défensive de type réflexe expiratoire atténué (aRE). La considération de cette réponse (aRE) est alors le reflet d'une inhibition non pas de l'incidence du réflexe expiratoire, mais de l'intensité de l'effort expulsif de cette réponse défensive (Tableau 2) suite à l'apnée provoquée par l'instillation d'eau distillée (iii).

Les processus intégratifs au niveau de la commande centrale de la respiration jouent un rôle absolument essentiel quant à la modulation (inhibition/activation) de la réponse défensive réflexe des voies aériennes. L'inhibition de l'intensité de l'effort expulsif du réflexe expiratoire lors de l'apnée faisant suite à l'instillation nasale d'eau distillée est en faveur d'une désensibilisation au niveau des centres supérieurs de la toux. Nombreuses sont les preuves suggérant que les signaux afférents dont l'origine sont les cavités nasales, sont impliquées dans l'apnée déclenchée par l'instillation d'eau distillée (Butler and Jones, 1997; Furilla and Jones, 1986). Par ailleurs, les voies nerveuses trigéminées sont très vraisemblablement celles empruntées pour véhiculer ces signaux, et l'hypo-osmolarité serait le principal stimulus à l'origine d'un tel signal. En effet, l'eau semble jouer un rôle majeur quant à la survenue de l'apnée, très probablement du fait de récepteurs localisés au niveau de certaines terminaisons nerveuses libres de la muqueuse nasale. Le message afférent est ensuite essentiellement véhiculé par le nerf éthmoïdal antérieur issu de la branche ophtalmique du nerf trijumeau (Panneton et al., 2010b). Ces fibres représentent donc le premier rempart quant à une éventuelle intrusion vers les voies aériennes supérieures et sont ainsi à l'origine d'un signal d'alarme dans cette circonstance (Panneton et al., 2006). Contrairement à la plupart des études réalisant une stimulation électrique de la muqueuse nasale (souvent à l'origine d'un important délabrement de la muqueuse), nous avons fait le choix d'une stimulation par de l'eau distillée (iii) et du sérum physiologique (ii). Ce choix révèle ainsi toute l'importance de l'hypo-osmolarité dans la stimulation des afférences du nerf trijumeau à l'origine de l'apnée provoquée par l'instillation d'eau distillée. De plus, les projections cérébrales trijéminales à proximité de la région du noyau du tractus solitaire (Dutschmann and Herbert, 1996; McCulloch et al., 1999) ont une influence sur ces neurones impliqués dans le rythme respiratoire et la toux (Canning and Mori, 2010;

Mazzone et al., 2011). Ainsi, en réponse à un même stimulus trachéal mécanique lors de l'instillation d'eau distillée (iii) ou de sérum physiologique (ii), et à niveau d'activation comparable des récepteurs RARs et SARs, la commande centrale de la respiratoire semble prioriser sa réponse motrice (Bolser et al., 2006), et fait le choix de privilégier les réponses défensives de type réflexe expiratoire (RE et aRE) par rapport à celles comprenant un réflexe de toux (RT isolé et RT dans le cadre d'une réponse mixte). Cela laisse ainsi à penser que lors de l'apnée, l'option retenue par les centres supérieurs est celle d'une inhibition de la réponse défensive respiratoire (i.e. aRE à la place du RE, et une plus faible incidence des réponses défensives comprenant un RT) suggérant une désensibilisation de la toux. Néanmoins, malgré un positionnement légèrement déclive de l'animal lors de ces expérimentations associé à l'aspiration systématique du liquide (sérum physiologique et eau) résiduel des fosses nasales après chaque instillation, il ne peut pas être formellement écarté un passage laryngé des fluides instillés. Par conséquent il est tout à fait possible d'envisager une contribution (toutefois sporadique) des fibres du nerf laryngé supérieur dans le déclenchement des réflexes observés.

Cette hypothèse d'une désensibilisation du réflexe de toux est en accord avec les résultats d'autres études (Furilla and Jones, 1986; Plevkova et al., 2004a; Plevkova et al., 2004b; Tatar et al., 2009) dans lesquelles il a pu être démontré que la convergence centrale d'afférences nerveuses de topographies différentes peut être à l'origine d'une sensibilisation de la toux (suite à l'administration intra-nasale de capsaïcine par exemple). Dans notre travail, (à l'inverse d'une sensibilisation déjà décrite dans la littérature), l'apnée est à l'origine d'une désensibilisation des réflexes de défense respiratoire, suggérant un mécanisme d'action commun dans lequel certaines terminaisons centrales des afférences nasales font synapse (directement ou indirectement) avec les neurones impliqués dans la réponse tussive. Ainsi, à partir d'une stimulation à point de départ nasal (tout comme cela peut être le cas pour des messages provenant d'autres localisations), certains messages sont capables de sensibiliser les réflexes de défense respiratoire, alors que d'autres sont à l'origine d'une désensibilisation.

L'instillation d'eau distillée au sein des cavités nasales est à l'origine d'une apnée dans notre travail. Il est donc théoriquement envisageable qu'à la fois les chémorécepteurs centraux et périphériques aient été stimulés par l'apparition progressive d'une hypoxémie et d'une hypercapnie (Jones et al., 1982). Ces modifications gazométriques constituent ainsi des variables supplémentaires, susceptibles d'interagir au niveau central en plus des signaux provenant des afférences nasales et trachéales. Ainsi, la durée de l'apnée pourrait considérablement influencer la réponse défensive motrice suite à la stimulation trachéale mécanique. Dans notre étude, la stimulation trachéale a systématiquement été délivrée dans les suites immédiates de l'apparition de l'apnée. Toutefois, la stimulation trachéale a occasionnellement été délivrée après des durées d'apnée plus longues et aucune conséquence sur la réponse défensive (nature, intensité) n'a alors été observée. Ainsi, dans la mesure de nos conditions expérimentales, les chémorécepteurs centraux et périphériques n'interfèrent vraisemblablement pas de façon majeure dans les processus d'intégration centrale à l'origine des réponses défensives respiratoires observées.

E. Conclusion

En conclusion, le travail réalisé a retrouvé que l'apnée déclenchée par l'instillation nasale d'eau distillée est à l'origine d'une désensibilisation des réflexes de défense respiratoire faisant suite à une stimulation trachéale mécanique. Cette désensibilisation affecte la réponse défensive aussi bien dans sa nature que dans son intensité comme le suggère d'une part la diminution de l'incidence des réponses comprenant un RT, et d'autre part la diminution de l'intensité du RE (i.e aRE à la place d'un RE). Ces 2 réponses défensives (i.e. RT et RE) sont des réflexes ancestraux très puissants dont la finalité est la protection des voies aériennes vis à vis d'une inhalation d'agents potentiellement délétères (particules, liquides) pour l'organisme. La désensibilisation objectivée par les résultats de notre étude revêt un sens téléologique dans la mesure où la phase initiale inspiratoire du RT représente une composante indéniablement délétère lors d'une plongée en apnée car ouvrant la possibilité d'une noyade. Cependant, nos connaissances quant aux régions précises d'intégration centrale ainsi que sur la nature exacte des signaux impliqués dans ces mécanismes d'interaction sont encore imparfaites et nécessitent des investigations complémentaires.

CONCLUSION

Le réflexe de plongée constitue l'une des plus puissantes réponses du système nerveux autonome, pouvant être à l'origine d'une altération majeure du comportement du système cardio-respiratoire et surpassant volontiers de nombreux autres réflexes visant au maintien de l'homéostasie. Les résultats de notre travail retrouvent une désensibilisation des réflexes de défense respiratoire faisant suite à une stimulation trachéale mécanique dans un contexte d'apnée déclenchée par l'instillation nasale d'eau distillée, venant ainsi étayer encore un peu plus cette position « dominante » du réflexe de plongée, surpassant les RT et RE classiquement retrouvés. Si le sens téléologique de nos résultats semble évident, nos connaissances quant aux régions d'intégration centrale ainsi que sur la nature des signaux impliqués dans ces mécanismes d'interaction sont encore imparfaites.

Le modèle animal ici utilisé autorise une stimulation trachéale discriminante au sein du cycle respiratoire et permet de caractériser précisément la nature du réflexe respiratoire provoqué, notamment de distinguer le RT du RE dont les boucles réflexes ne sont pas strictement identiques. Ce modèle expérimental offre ainsi d'intéressantes perspectives d'étude visant une meilleure compréhension des voies impliquées dans ces réflexes de défense respiratoire ainsi que des mécanismes de régulation. Un récent travail a déjà permis de montrer une désensibilisation du réflexe de toux à l'exercice sur ce modèle expérimental et une prochaine étape consistera en l'étude du réflexe de toux à l'exercice chez le lapin anesthésié et sensibilisé à l'ovalbumine, modèle animal de maladie asthmatique. La meilleure compréhension des voies impliquées dans la toux, à l'exercice et plus particulièrement sur un modèle mimant la pathologie asthmatique permettra peut être une meilleure approche de cette pathologie tant du point de vue clinique que thérapeutique.

REFERENCES

- Angell James, J.E., Daly Mde, B., 1969. Nasal reflexes. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 62, 1287-1293.
- 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.
- 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.
- 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.
- Belvisi, M.G., Bolser, D.C., 2002. Summary: animal models for cough. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 15, 249-250.
- Bende, M., Millqvist, E., 2012. Prevalence of chronic cough in relation to upper and lower airway symptoms; the Skovde population-based study. *Frontiers in physiology* 3, 251.
- Bergren, D.R., 1997. Sensory receptor activation by mediators of defense reflexes in guinea-pig lungs. *Respiration physiology* 108, 195-204.
- Bergren, D.R., Peterson, D.F., 1993. Identification of vagal sensory receptors in the rat lung: are there subtypes of slowly adapting receptors? *The Journal of physiology* 464, 681-698.
- Biedenbach, M.A., Beurman, R.W., Brown, A.C., 1975. Graphic-digitizer analysis of axon spectra in ethmoidal and lingual branches of the trigeminal nerve. *Cell and tissue research* 157, 341-352.
- Birring, S.S., 2011. Controversies in the evaluation and management of chronic cough. *American journal of respiratory and critical care medicine* 183, 708-715.
- 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., DeGennaro, F.C., O'Reilly, S., Chapman, R.W., Kreutner, W., Egan, R.W., Hey, J.A., 1994. Peripheral and central sites of action of GABA-B agonists to inhibit the cough reflex in the cat and guinea pig. *British journal of pharmacology* 113, 1344-1348.
- Bolser, D.C., DeGennaro, F.C., O'Reilly, S., Hey, J.A., Chapman, R.W., 1995. Pharmacological studies of allergic cough in the guinea pig. *European journal of pharmacology* 277, 159-164.
- Bolser, D.C., DeGennaro, F.C., O'Reilly, S., McLeod, R.L., Hey, J.A., 1997. Central antitussive activity of the NK1 and NK2 tachykinin receptor antagonists, CP-99,994 and SR 48968, in the guinea-pig and cat. *British journal of pharmacology* 121, 165-170.
- Bolser, D.C., Hey, J.A., Chapman, R.W., 1999. Influence of central antitussive drugs on the cough motor pattern. *J Appl Physiol* (1985) 86, 1017-1024.
- 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.
- 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.I., Joad, J.P., 2004. Plasticity of central mechanisms for cough. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 17, 453-457; discussion 469-470.
- Braunstahl, G.J., Fokkens, W., 2003. Nasal involvement in allergic asthma. *Allergy* 58, 1235-1243.
- Brozmanova, M., Plevkova, J., Bartos, V., Plank, L., Tatar, M., 2005. Antileukotriene treatment and allergic rhinitis-related cough in guinea pigs. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 56 Suppl 4, 21-30.
- Brozmanova, M., Plevkova, J., Tatar, M., Kollarik, M., 2008. Cough reflex sensitivity is increased in the guinea pig model of allergic rhinitis. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 59 Suppl 6, 153-161.

Buday, T., Brozmanova, M., Biringeroova, Z., Gavliakova, S., Poliacek, I., Calkovsky, V., Shetthalli, M.V., Plevkova, J., 2012. Modulation of cough response by sensory inputs from the nose - role of trigeminal TRPA1 versus TRPM8 channels. *Cough* 8, 11.

Butler, P.J., Jones, D.R., 1982. The comparative physiology of diving in vertebrates. *Advances in comparative physiology and biochemistry* 8, 179-364.

Butler, P.J., Jones, D.R., 1997. Physiology of diving of birds and mammals. *Physiological reviews* 77, 837-899.

Canning, B.J., 2007. Encoding of the cough reflex. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 20, 396-401.

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., Mazzone, S.B., Meeker, S.N., Mori, N., Reynolds, S.M., Undem, B.J., 2004. Identification of the tracheal and laryngeal afferent neurones mediating cough in anaesthetized guinea-pigs. *The Journal of physiology* 557, 543-558.

Canning, B.J., Mori, N., 2010. An essential component to brainstem cough gating identified in anesthetized guinea pigs. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 3916-3926.

Canning, B.J., Mori, N., 2011. Encoding of the cough reflex in anesthetized guinea pigs. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 300, R369-377.

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.

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.

Cauna, N., Hinderer, K.H., Wentges, R.T., 1969. Sensory receptor organs of the human nasal respiratory mucosa. *The American journal of anatomy* 124, 187-209.

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., 2005. Effect of 5-hydroxytryptamine on vagal C-fiber subtypes in guinea pig lungs. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 18, 269-276.

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.

Clapham, D.E., 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524.

Cliff, M.A., Green, B.G., 1994. Sensory irritation and coolness produced by menthol: evidence for selective desensitization of irritation. *Physiology & behavior* 56, 1021-1029.

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, 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.

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.

Davis, R.W., Polasek, L., Watson, R., Fuson, A., Williams, T.M., Kanatous, S.B., 2004. The diving paradox: new insights into the role of the dive response in air-breathing vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 138, 263-268.

De Proost, I., Pintelon, I., Brouns, I., Timmermans, J.P., Adriaensen, D., 2007. Selective visualisation of sensory receptors in the smooth muscle layer of ex-vivo airway whole-mounts by styryl pyridinium dyes. *Cell and tissue research* 329, 421-431.

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.

Drummond, P.C., Jones, D.R., 1979. The initiation and maintenance of bradycardia in a diving mammal, the muskrat, *Ondatra zibethica*. *The Journal of physiology* 290, 253-271.

Dutschmann, M., Herbert, H., 1996. The Kolliker-Fuse nucleus mediates the trigeminally induced apnoea in the rat. *Neuroreport* 7, 1432-1436.

Dykes, R.W., 1974a. Factors related to the dive reflex in harbor seals: respiration, immersion bradycardia, and lability of the heart rate. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 52, 248-258.

Dykes, R.W., 1974b. Factors related to the dive reflex in harbor seals: sensory contributions from the trigeminal region. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 52, 259-265.

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.

Esser, M.J., Pronych, S.P., Allen, G.V., 1998. Trigeminal-reticular connections: possible pathways for nociception-induced cardiovascular reflex responses in the rat. *The Journal of comparative neurology* 391, 526-544.

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.

Ferretti, G., 2001. Extreme human breath-hold diving. *European journal of applied physiology* 84, 254-271.

Finger, T.E., St Jeor, V.L., Kinnamon, J.C., Silver, W.L., 1990. Ultrastructure of substance P- and CGRP-immunoreactive nerve fibers in the nasal epithelium of rodents. *The Journal of comparative neurology* 294, 293-305.

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.

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.

Foster, G.E., Sheel, A.W., 2005. The human diving response, its function, and its control. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 15, 3-12.

Fox, A.J., Barnes, P.J., Dray, A., 1995. Stimulation of guinea-pig tracheal afferent fibres by non-isosmotic and low-chloride stimuli and the effect of frusemide. *The Journal of physiology* 482 (Pt 1), 179-187.

Fox, A.J., Barnes, P.J., Urban, L., Dray, A., 1993. An in vitro study of the properties of single vagal afferents innervating guinea-pig airways. *The Journal of physiology* 469, 21-35.

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.

Furilla, R.A., Jones, D.R., 1986. The contribution of nasal receptors to the cardiac response to diving in restrained and unrestrained redhead ducks (*Aythya americana*). *The Journal of experimental biology* 121, 227-238.

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.

Geppetti, P., Patacchini, R., Nassini, R., Materazzi, S., 2010. Cough: The Emerging Role of the TRPA1 Channel. *Lung* 188 Suppl 1, S63-68.

Gieroba, Z.J., Yu, Y.H., Blessing, W.W., 1994. Vasoconstriction induced by inhalation of irritant vapour is associated with appearance of Fos protein in C1 catecholamine neurons in rabbit medulla oblongata. *Brain research* 636, 157-161.

Goksoy, E., Rosengren, L., Wennergren, G., 2002. Bradycardic response during submersion in infant swimming. *Acta Paediatr* 91, 307-312.

Gorini, C., Philbin, K., Bateman, R., Mendelowitz, D., 2010. Endogenous inhibition of the trigeminally evoked neurotransmission to cardiac vagal neurons by muscarinic acetylcholine receptors. *Journal of neurophysiology* 104, 1841-1848.

Grace, M.S., Belvisi, M.G., 2011. TRPA1 receptors in cough. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 24, 286-288.

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*.

Green, B.G., McAuliffe, B.L., 2000. Menthol desensitization of capsaicin irritation. Evidence of a short-term anti-nociceptive effect. *Physiology & behavior* 68, 631-639.

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.

Guerra, S., Sherrill, D.L., Baldacci, S., Carrozzi, L., Pistelli, F., Di Pede, F., Viegi, G., 2005. Rhinitis is an independent risk factor for developing cough apart from colds among adults. *Allergy* 60, 343-349.

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.

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.

Hill, R.D., Schneider, R.C., Liggins, G.C., Schuette, A.H., Elliott, R.L., Guppy, M., Hochachka, P.W., Qvist, J., Falke, K.J., Zapol, W.M., 1987. Heart rate and body temperature during free diving of Weddell seals. *The American journal of physiology* 253, R344-351.

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.

Horiuchi, H., Nonaka, T., Ito, M., Kaniwa, T., Kishimoto, T., Fuchikami, J., Kohjimoto, Y., Kiyoki, M., 1995. Suppressive effect of clenbuterol on citric acid-induced cough reflex in guinea pigs. *Research communications in molecular pathology and pharmacology* 88, 293-301.

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., Udem, 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.

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.

Jaquemar, D., Schenker, T., Trueb, B., 1999. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 274, 7325-7333.

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.

Jobsis, P.D., Ponganis, P.J., Kooyman, G.L., 2001. Effects of training on forced submersion responses in harbor seals. *The Journal of experimental biology* 204, 3877-3885.

Jones, D.R., Milsom, W.K., Gabbott, G.R., 1982. Role of central and peripheral chemoreceptors in diving responses of ducks. *The American journal of physiology* 243, R537-545.

Jonzon, A., Pisarri, T.E., Coleridge, J.C., Coleridge, H.M., 1986. Rapidly adapting receptor activity in dogs is inversely related to lung compliance. *J Appl Physiol* (1985) 61, 1980-1987.

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.

Kamei, J., Iwamoto, Y., Suzuki, T., Misawa, M., Nagase, H., Kasuya, Y., 1993. Antitussive effects of naltrindole, a selective delta-opioid receptor antagonist, in mice and rats. *European journal of pharmacology* 249, 161-165.

Karai, L.J., Russell, J.T., Iadarola, M.J., Olah, Z., 2004. Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sensory neurons. *The Journal of biological chemistry* 279, 16377-16387.

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., Sant'Ambrogio, F.B., Forsberg, K., Palecek, F., Mathew, O.P., Sant'Ambrogio, G., 1993. Respiratory and cardiovascular effects of inhaled and intravenous bradykinin, PGE₂, and PGF₂ alpha in dogs. *J Appl Physiol* 74, 2380-2386.

Knowlton, G.C., Larrabee, M.G., 1946. A unitary analysis of pulmonary volume receptors. *The American journal of physiology* 147, 100-114.

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

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.

Kollarik, M., Undem, B.J., 2002. Mechanisms of acid-induced activation of airway afferent nerve fibres in guinea-pig. *The Journal of physiology* 543, 591-600.

Kooyman, G.L., Castellini, M.A., Davis, R.W., 1981. Physiology of diving in marine mammals. *Annual review of physiology* 43, 343-356.

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.

Korpas, J., Tatar, M., 1972. The expiration reflex from the vocal folds of the rat. *Physiologia Bohemoslovaca* 21, 667-670.

Korpas, J., Widdicombe, J.G., Vrabec, M., Kudlicka, J., 1993. Effect of experimental lung oedema on cough sound creation. *Respiratory medicine* 87, 55-59.

Kratschmer, F., 2001. On reflexes from the nasal mucous membrane on respiration and circulation. *Respiration physiology* 127, 93-104.

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.

Laloo, 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.

Lang, S., Lanigan, D.T., van der Wal, M., 1991. Trigemino-cardiac reflexes: maxillary and mandibular variants of the oculocardiac reflex. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie* 38, 757-760.

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.

Laude, E.A., Morice, A.H., Grattan, T.J., 1994. The antitussive effects of menthol, camphor and cineole in conscious guinea-pigs. *Pulmonary pharmacology* 7, 179-184.

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.

Lee, L.Y., Gu, Q., Xu, F., Hong, J.L., 2013. Acid-sensing by airway afferent nerves. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*.

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., Ni, D., Hayes, D., Jr., Lin, R.L., 2011. TRPV1 as a cough sensor and its temperature-sensitive properties. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 24, 280-285.

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

Leiter, J.C., Bohm, I., 2007. Mechanisms of pathogenesis in the Sudden Infant Death Syndrome. *Respiratory physiology & neurobiology* 159, 127-138.

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.

Lewis, C.A., Ambrose, C., Banner, K., Battram, C., Butler, K., Giddings, J., Mok, J., Nasra, J., Winny, C., Poll, C., 2007. Animal models of cough: literature review and presentation of a novel cigarette smoke-enhanced cough model in the guinea-pig. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 20, 325-333.

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.

Lobban, C.D., 1991. The human dive reflex as a primary cause of SIDS. A review of the literature. *The Medical journal of Australia* 155, 561-563.

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

Macpherson, L.J., Hwang, S.W., Miyamoto, T., Dubin, A.E., Patapoutian, A., Story, G.M., 2006. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Molecular and cellular neurosciences* 32, 335-343.

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

Mazzone, S.B., Mori, N., Burman, M., Palovich, M., Belmonte, K.E., Canning, B.J., 2006. Fluorescent styryl dyes FM1-43 and FM2-10 are muscarinic receptor antagonists: intravital visualization of receptor occupancy. *The Journal of physiology* 575, 23-35.

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., Udem, B.J., 1999. Adaptation of guinea-pig vagal airway afferent neurones to mechanical stimulation. *The Journal of physiology* 521 Pt 1, 239-247.

McAlexander, M.A., Udem, B.J., 2000. Potassium channel blockade induces action potential generation in guinea-pig airway vagal afferent neurones. *Journal of the autonomic nervous system* 78, 158-164.

McCool, F.D., Leith, D.E., 1987. Pathophysiology of cough. *Clinics in chest medicine* 8, 189-195.

McCulloch, P.F., Faber, K.M., Panneton, W.M., 1999. Electrical stimulation of the anterior ethmoidal nerve produces the diving response. *Brain research* 830, 24-31.

McCulloch, P.F., Panneton, W.M., 1997. Fos immunohistochemical determination of brainstem neuronal activation in the muskrat after nasal stimulation. *Neuroscience* 78, 913-925.

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.

McKemy, D.D., Neuhauser, W.M., Julius, D., 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-58.

McRitchie, R.J., White, S.W., 1974. Role of trigeminal, olfactory, carotid sinus and aortic nerves in the respiratory and circulatory response to nasal inhalation of cigarette smoke and other irritants in the rabbit. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 52, 127-140.

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.

Mills, J.E., Widdicombe, J.G., 1970. Role of the vagus nerves in anaphylaxis and histamine-induced bronchoconstrictions in guinea-pigs. *British journal of pharmacology* 39, 724-731.

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.

Montell, C., 1997. New light on TRP and TRPL. *Molecular pharmacology* 52, 755-763.

Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., 2002a. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108, 595-598.

Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R.J., Bruford, E.A., Caterina, M.J., Clapham, D.E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., Kojima, I., Mori, Y., Penner, R., Prawitt, D., Scharenberg, A.M., Schultz, G.,

Shimizu, N., Zhu, M.X., 2002b. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular cell* 9, 229-231.

Morice, A.H., 2004. Post-nasal drip syndrome--a symptom to be sniffed at? *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 17, 343-345.

Morice, A.H., Fontana, G.A., Sovijarvi, A.R., Pistolesi, M., Chung, K.F., Widdicombe, J., O'Connell, F., Geppetti, P., Gronke, L., De Jongste, J., Belvisi, M., Dicpinigaitis, P., Fischer, A., McGarvey, L., Fokkens, W.J., Kastelik, J., 2004. The diagnosis and management of chronic cough. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 24, 481-492.

Morice, A.H., Marshall, A.E., Higgins, K.S., Grattan, T.J., 1994. Effect of inhaled menthol on citric acid induced cough in normal subjects. *Thorax* 49, 1024-1026.

Morikawa, T., Gallico, L., Widdicombe, J., 1997. Actions of moguisteine on cough and pulmonary rapidly adapting receptor activity in the guinea pig. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 35, 113-118.

Myers, A.C., Kajekar, R., Udem, 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.

Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., Peters, J.A., 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological reviews* 87, 165-217.

Nishino, T., Honda, Y., 1986. Time-dependent responses of expiration reflex in cats. *J Appl Physiol (1985)* 61, 430-435.

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

O'Hara, J., Jones, N.S., 2006. "Post-nasal drip syndrome": most patients with purulent nasal secretions do not complain of chronic cough. *Rhinology* 44, 270-273.

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.

Paintal, A.S., 1973. Vagal sensory receptors and their reflex effects. *Physiological reviews* 53, 159-227.

Panneton, W.M., Gan, Q., Juric, R., 2006. Brainstem projections from recipient zones of the anterior ethmoidal nerve in the medullary dorsal horn. *Neuroscience* 141, 889-906.

Panneton, W.M., Gan, Q., Juric, R., 2010a. The rat: a laboratory model for studies of the diving response. *J Appl Physiol (1985)* 108, 811-820.

Panneton, W.M., Gan, Q., Juric, R., 2010b. The rat: a laboratory model for studies of the diving response. *J Appl Physiol* 108, 811-820.

Panneton, W.M., Gan, Q., Sun, D.W., 2012. Persistence of the nasotrigenic reflex after pontomedullary transection. *Respiratory physiology & neurobiology* 180, 230-236.

Panneton, W.M., McCulloch, P.F., Sun, W., 2000. Trigemino-autonomic connections in the muskrat: the neural substrate for the diving response. *Brain research* 874, 48-65.

Patel, T., Ishiuiji, Y., Yosipovitch, G., 2007. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57, 873-878.

Pecova, R., Vrlik, M., Tatar, M., 2005. Cough sensitivity in allergic rhinitis. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 56 Suppl 4, 171-178.

Pecova, R., Zucha, J., Pec, M., Neuschlova, M., Hanzel, P., Tatar, M., 2008. Cough reflex sensitivity testing in seasonal allergic rhinitis patients and healthy volunteers. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 59 Suppl 6, 557-564.

Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A., 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705-715.

Plevkova, J., Antosiewicz, J., Poljacek, I., Adamkov, M., Jakus, J., Svirlochova, K., Tatar, M., 2009a. Influence of stimulation of nasal afferents on expiration reflex evoked from vocal folds. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 60 Suppl 5, 93-97.

Plevkova, J., Antosiewicz, J., Varechova, S., Poljacek, I., Jakus, J., Tatar, M., Pokorski, M., 2009b. 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.

Plevkova, J., Brozmanova, M., Pecova, R., Tatar, M., 2004a. Effects of intranasal capsaicin challenge on cough reflex in healthy human volunteers. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 55 Suppl 3, 101-106.

Plevkova, J., Brozmanova, M., Pecova, R., Tatar, M., 2006. The effects of nasal histamine challenge on cough reflex in healthy volunteers. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 19, 120-127.

Plevkova, J., Kollarik, M., Brozmanova, M., Revallo, M., Varechova, S., Tatar, M., 2004b. Modulation of experimentally-induced cough by stimulation of nasal mucosa in cats and guinea pigs. *Respiratory physiology & neurobiology* 142, 225-235.

Plevkova, J., Poliacek, I., Antosiewicz, J., Adamkov, M., Jakus, J., Svirlochova, K., Tatar, M., 2010. Intranasal TRPV1 agonist capsaicin challenge and its effect on c-fos expression in the guinea pig brainstem. *Respiratory physiology & neurobiology* 173, 11-15.

Polacek, H., Korpas, J., Tatar, M., Plank, L., Pullmann, R., 1986. Study of cough in anaesthetized cats with experimental pulmonary oedema. *Physiologia Bohemoslovaca* 35, 481-489.

Poliacek, I., Rose, M.J., Corrie, L.W., Wang, C., Jakus, J., Barani, H., Stransky, A., Polacek, H., Halasova, E., Bolser, D.C., 2008. Short reflex expirations (expiration reflexes) induced by mechanical stimulation of the trachea in anesthetized cats. *Cough* 4, 1.

Pratter, M.R., 2006. Chronic upper airway cough syndrome secondary to rhinosinus diseases (previously referred to as postnasal drip syndrome): ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 129, 63S-71S.

Proudfoot, C.J., Garry, E.M., Cottrell, D.F., Rosie, R., Anderson, H., Robertson, D.C., Fleetwood-Walker, S.M., Mitchell, R., 2006. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Current biology* : CB 16, 1591-1605.

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.

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.

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

Rozloznic, M., Paton, J.F., Dutschmann, M., 2009. Repetitive paired stimulation of nasotrigeminal and peripheral chemoreceptor afferents cause progressive potentiation of the diving bradycardia. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 296, R80-87.

Rybka, E.J., McCulloch, P.F., 2006. The anterior ethmoidal nerve is necessary for the initiation of the nasopharyngeal response in the rat. *Brain research* 1075, 122-132.

Sant'Ambrogio, F.B., Sant'Ambrogio, G., Fisher, J.T., 1988. Lung mechanics and activity of slowly adapting airway stretch receptors. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 1, 685-690.

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.

Sant'Ambrogio, G., Widdicombe, J., 2001. Reflexes from airway rapidly adapting receptors. *Respiration physiology* 125, 33-45.

Schaller, B., 2004. Trigemino-cardiac reflex. A clinical phenomenon or a new physiological entity? *Journal of neurology* 251, 658-665.

Sellick, H., Widdicombe, J.G., 1969. The activity of lung irritant receptors during pneumothorax, hyperpnoea and pulmonary vascular congestion. *The Journal of physiology* 203, 359-381.

Sellick, H., Widdicombe, J.G., 1971. Stimulation of lung irritant receptors by cigarette smoke, carbon dust, and histamine aerosol. *J Appl Physiol* 31, 15-19.

Shannon, R., Baekey, D.M., Morris, K.F., Nuding, S.C., Segers, L.S., Lindsey, B.G., 2004. Production of reflex cough by brainstem respiratory networks. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 17, 369-376.

Singer, D., 1999. Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative-physiological approach. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 123, 221-234.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A., 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112, 819-829.

Sullivan, C.E., Kozar, L.F., Murphy, E., Phillipson, E.A., 1979. Arousal, ventilatory, and airway responses to bronchopulmonary stimulation in sleeping dogs. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 47, 17-25.

Sullivan, C.E., Murphy, E., Kozar, L.F., Phillipson, E.A., 1978. Waking and ventilatory responses to laryngeal stimulation in sleeping dogs. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 45, 681-689.

Syntichaki, P., Tavernarakis, N., 2004. Genetic models of mechanotransduction: the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiological reviews* 84, 1097-1153.

Tatar, M., Hanacek, J., Widdicombe, J., 2008. The expiration reflex from the trachea and bronchi. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 31, 385-390.

Tatar, M., Karcolova, D., Pecova, R., Brozmanova, M., 1996. The role of partial laryngeal denervation on the cough reflex in awake guinea-pigs, rats and rabbits. *Pulmonary pharmacology* 9, 371-372.

Tatar, M., Pecova, R., Karcolova, D., 1997. [Sensitivity of the cough reflex in awake guinea pigs, rats and rabbits]. *Bratislavske lekarske listy* 98, 539-543.

Tatar, M., Plevkova, J., Brozmanova, M., Pecova, R., Kollarik, M., 2009. Mechanisms of the cough associated with rhinosinusitis. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 22, 121-126.

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., Kollarik, M., MacGlashan, D.W., Jr., Udem, B.J., 2005. Nasal sensory nerve populations responding to histamine and capsaicin. *The Journal of allergy and clinical immunology* 116, 1282-1288.

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.

Udem, B.J., Carr, M.J., Kollarik, M., 2002. Physiology and plasticity of putative cough fibres in the Guinea pig. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 15, 193-198.

Udem, 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.

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

Vovk, A., Bolser, D.C., Hey, J.A., Danzig, M., Vickroy, T., Berry, R., Martin, A.D., Davenport, P.W., 2007. Capsaicin exposure elicits complex airway defensive motor patterns in normal humans in a concentration-dependent manner. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 20, 423-432.

Wallois, F., Gros, F., Condamin, M., Macron, J.M., 1993. Postnatal development of the anterior ethmoidal nerve in cats: unmyelinated and myelinated nerve fiber analysis. *Neuroscience letters* 160, 221-224.

Wallois, F., Larnicol, N., Rose, D., Duron, B., 1992. A comparative HRP study of the neuronal supply to the inferior and superior nasal meatus in the cat. *Neuroscience letters* 139, 234-238.

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.

White, S., McRitchie, R.J., Korner, P.I., 1975. Central nervous system control of cardiorespiratory nasopharyngeal reflexes in the rabbit. *The American journal of physiology* 228, 404-409.

Widdicombe, J., 2003. Functional morphology and physiology of pulmonary rapidly adapting receptors (RARs). *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 270, 2-10.

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

Widdicombe, J., 2006b. Reflexes from the lungs and airways: historical perspective. *J Appl Physiol* (1985) 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., Tatar, M., Fontana, G., Hanacek, J., Davenport, P., Lavorini, F., Bolser, D., 2011. Workshop: tuning the 'cough center'. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 24, 344-352.

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 reflexes excited by inflation of the lungs. *The Journal of physiology* 123, 105-115.

- Widdicombe, J.G., 1954c. Respiratory reflexes from the trachea and bronchi of the cat. *The Journal of physiology* 123, 55-70.
- Widdicombe, J.G., Kent, D.C., Nadel, J.A., 1962. Mechanism of bronchoconstriction during inhalation of dust. *J Appl Physiol* 17, 613-616.
- Wirtz, H.R., Dobbs, L.G., 2000. The effects of mechanical forces on lung functions. *Respiration physiology* 119, 1-17.
- Wise, P.M., Breslin, P.A., Dalton, P., 2012. Sweet taste and menthol increase cough reflex thresholds. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 25, 236-241.
- Wright, C.E., Laude, E.A., Grattan, T.J., Morice, A.H., 1997. Capsaicin and neurokinin A-induced bronchoconstriction in the anaesthetised guinea-pig: evidence for a direct action of menthol on isolated bronchial smooth muscle. *British journal of pharmacology* 121, 1645-1650.
- Yamamoto, Y., Atoji, Y., Suzuki, Y., 1995. Nerve endings in bronchi of the dog that react with antibodies against neurofilament protein. *Journal of anatomy* 187 (Pt 1), 59-65.
- 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.
- Yavari, P., McCulloch, P.F., Panneton, W.M., 1996. Trigeminally-mediated alteration of cardiorespiratory rhythms during nasal application of carbon dioxide in the rat. *Journal of the autonomic nervous system* 61, 195-200.
- Yu, J., 2000. Spectrum of myelinated pulmonary afferents. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 279, R2142-2148.
- Yu, J., 2005. Airway mechanosensors. *Respiratory physiology & neurobiology* 148, 217-243.
- Yu, J., Coleridge, J.C., Coleridge, H.M., 1987. Influence of lung stiffness on rapidly adapting receptors in rabbits and cats. *Respiration physiology* 68, 161-176.
- 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.

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

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

➤ Deux publications dans des revues internationales à comité de lecture :

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(5):397-402.

Poussel M, Varechova S, Demoulin B, Chalon B, Schweitzer C, Marchal F, Chenuel B. Nasal stimulation by water down-regulates cough in anesthetized rabbits. **Respir Physiol Neurobiol** 2012;183(1):20-25.

➤ Deux communications orales publiées :

**« 6th International Symposium on cough ». 24th-26th June 2010.
National Heart & Lung Institute,
Royal Brompton Campus, Imperial College London,
Dovehouse Street, London SW3 6LY.**

Poussel M, Varechova S, Chenuel B, Schweitzer C, Beyaert C, Marchal F. Effects of the diving reflex on the ventilatory response to tracheal irritation in anaesthetized rabbits. **Pulm Pharmacol Ther.** 2011;24(3):e7-e8.

**« Congrès P2T 2010. Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique ». 23-25
mars 2010.
Palais des congrès de Bordeaux-Lac,
Avenue Jean-Gabriel Domergue, 33000 Bordeaux.**

Poussel M, Varechova S, Schweitzer C, Beyaert C, Chenuel B, Marchal F. Effects of the diving reflex stimulation on the ventilatory response to trachéal irritation in anesthetized rabbits. **Fund Clin Pharmacol** 2010;24 Suppl 1:18-19.



Within breath ventilatory responses to mechanical tracheal stimulation in anaesthetised rabbits

Silvia Varechova, Mathias Poussel, Bruno Demoulin, Bruno Chenuel, Cyril Schweitzer, François Marchal*

Laboratoire de Physiologie, EA 3450 Faculté de Médecine, avenue de la Forêt de Haye, Université Henri Poincaré, F-54500 Vandoeuvre les Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 February 2010
Received in revised form
14 May 2010
Accepted 25 May 2010

Keywords:
Trachea
Mechanical stimulation
Cough
Expiration reflex
Breathing cycle
Inspiration
Expiration
Bronchoconstriction

ABSTRACT

Ventilatory responses to airway mechanical stimulation usually consist in mixed cough (CR) and expiration (ER) reflexes. The stimulus characteristics that would favour either reflex may vary with breathing, but the issue cannot be addressed with the usual long lasting stimulus. The aim of the study was to describe respiratory responses evoked by a punctuate tracheal stimulus and their relationship to inspiration and expiration. Experiments were repeated after bronchoconstriction.

Eight anesthetized tracheotomized rabbits were stimulated in the trachea by 150 ms probing before and after methacholine inhalation (248 tests). CR and ER were evaluated from tidal volume and expiratory flow.

The overall incidence of responses was larger in inspiration than expiration ($p < 0.0001$). A majority of responses were single CR or ER, also strongly related to breathing: 93% CR occurred with the stimulus in inspiration and 78% ER with the stimulus in expiration ($p = 0.001$). Bronchoconstriction did not change the incidence of single efforts, increased that of mixed responses and decreased the amplitude of preparatory and expulsive phases of CR.

The study demonstrates the strong dependence of CR and ER on the phase of breathing and adds to the current evidence that regulating mechanisms clearly differ for each reflex.

© 2010 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Mechanical irritation of the tracheobronchial mucosa usually causes immediate reflex changes in breathing characterized by forceful expiratory efforts directed to expel air and potentially harmful agents. The powerful expiration occurs as a component of the cough reflex (CR) – i.e., it is preceded by a deep inspiration – or as a single expiratory effort, the expiration reflex (ER). A proper characterisation of the ventilatory responses and differentiation between CR and ER is important for physiological and clinical reasons. While both reflexes are expressing an expiratory effort, they are said to have different functions [1–3] and to involve different motor patterns and neural mechanisms [4–6]. For instance, ER exhibits greater stability than CR during deep

anaesthesia [1,7,8] and sleep [9,10] and lower sensitivity to the antitussive codeine [11], differences that may obviously impact on the management of patients with chronic cough. Altogether there are reasons to suspect that ventilatory responses evoked by airway mechanical stimulation may also differ between inspiration and expiration. During breathing, the airway mechanical conditions as well as the pattern of discharge of airway and lung mechanoreceptors and the activity of central respiratory neurons vary periodically with lung volume and transpulmonary pressure [12–17]. As changes in lung volume are known to affect many aspects of lung structure and function [18], they are likely to affect those mechanisms underlying mechanotransduction and ventilatory response to airway stimulation.

Most experimental evidence on airway mechanical irritation is based on stimulation encompassing several breathing cycles and frequently demonstrates the coordinated occurrence of both ER and CR. While there are suggestions that ER would be more readily elicited by stimulation beginning in the expiratory phase [6,19,20], little evidence is available on the pattern of response to mechanical stimulation in relation to the breathing cycle. The information, however, could be gained using a punctuate stimulus triggered separately in inspiration and expiration, but the efficiency of this type of stimulus has not been validated.

Abbreviations: NR, no response; CR, cough reflex; ER, expiration reflex; ER → CR, expiration reflex followed by cough; CR → ER, cough followed by expiration reflex; Mch, methacholine; RAR, rapidly adapting receptor; V_T , tidal volume; T_I , inspiratory time; T_E , expiratory time; $V_{E_{max}}$, maximal measured expiratory flow; T_{TOT} , duration of the breathing cycle; V_I/T_{TOT} , instantaneous minute ventilation.

* Corresponding author. Tel.: +33 383154795; fax: +33 383154798.

E-mail address: f.marchal@chu-nancy.fr (F. Marchal).

1094-5539/\$ – see front matter © 2010 Published by Elsevier Ltd.
doi:10.1016/j.pupt.2010.05.008

The primary aims of the study were to determine whether a short mechanical stimulation of the tracheal mucosa is efficient in triggering CR and/or ER, and whether its timing in inspiration or expiration determines the nature of the response. Experiments were repeated following inhalation of methacholine (Mch) to find out whether frequency and/or intensity of CR and ER response is changed during Mch-induced bronchoconstriction, based on a previous evidence that histamine evoked rapidly adapting receptor (RAR) discharge is inhibited by beta adrenergic pre-treatment in anesthetized rabbits [21]. The main hypothesis is that inspiration should be more likely to produce CR and expiration ER. The secondary hypothesis is that CR and possibly ER should be enhanced after Mch inhalation.

2. Material and methods

Eight anesthetized, tracheotomized New Zealand adult rabbits (4205–5075 kg) were studied. All animals were tested for the presence of cough efforts on inserting the stimulating catheter into the trachea (see below).

2.1. Anaesthesia & surgical preparation

Anaesthesia was induced with a mixture of urethane (500 mg/kg), alpha-chloralose (50 mg/kg) and sodium borate (50 mg/kg) injected through an ear vein. Supplemental doses were given every 2 h. The rabbits were tracheotomized and intubated with a steel tracheal cannula. Rectal temperature was continuously monitored with an electrical thermistor (Physitemp Instruments, YSI 402 Clifton, NJ, USA) and maintained at 38 °C using a circulating warm water pad. Animal housing and experiments were performed according to recommendations 86-609 CEE issued by the Council of the European Communities and under license from the "Ministère de l'Agriculture et de la Pêche" and the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" (A54518-03409) 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 Fleisch # 0 pneumotachograph (Metabo, Hepalinges, Switzerland) and airway pressure at a side port of the cannula. The flow signal was digitized at 160 Hz, fed to a computer and integrated to volume. Tidal volume (V_T) and flow were displayed breath by breath during the acquisition and stored on disk for later analysis. To assess the degree of Mch-induced bronchoconstriction (see below), the respiratory resistance was measured by an adaptation of the forced oscillation technique, as described previously [22]. The airway opening was attached to a 3-way connector. To one end, a loud speaker oscillated the transrespiratory pressure at 20 Hz. Through a high inertia tubing connected to the second end, the animal breathed spontaneously, while a constant flow source flushed the breathing circuit with fresh air through the third end to prevent CO₂ accumulation. One measurement lasted about 30 s. The respiratory resistance was computed from the real part of the complex airway pressure–flow ratio at 20 Hz.

2.3. Tracheal stimulation

A silastic semi-rigid catheter (1.2 mm OD) was advanced downward through a side port of the tracheal tube until a bout of cough was evoked. This usually occurred 3–4 cm from the outlet and, in a few rabbits, the probe was found facing the lower end of the tracheal tube or carina on autopsy. The external end of the

catheter was fitted onto the shaft of a small rotating electrical engine (low voltage DC motors 719RE280, MFA/Comodrills, UK). When actuated, the engine would spin the catheter at about 60 cycles/s and rub its tip onto the airway mucosa, inducing mechanical stimulation. The characteristics of the engine insured a rectangular pattern to the mechanical stimulus, particularly the immediate cessation of catheter rotation at off-turning. Hence a discrete mechanical stimulus with well defined temporal course could be obtained. Following preliminary trials, the stimulus duration was set to 150 ms s, i.e., long enough to promote reflex responses but short enough to allow the triggering of the stimulation within inspiration or expiration. Whatever the type of induced ventilatory response, the afferent nerve stimulation would quickly cease once the catheter was still. The electrical signal from the rotating engine fed to the computer together with the respiratory signals allowed accurate identification of the time course of the stimulus on off-line analysis.

2.4. Methacholine inhalation

Mch challenge was started at an initial concentration of 1 mg/mL and additional doubling doses were given so as to at least double the respiratory system resistance. The latter was measured at control and following each Mch inhalation, as previously described [22].

2.5. Protocol

Mechanical stimulation of the trachea was performed while the animal had been breathing quietly for at least 1 min. Trials were obtained during inspiration or expiration, in a pseudo-random order. Approximately 35 stimuli were applied in each rabbit at baseline.

2.6. Data analysis

The respiratory cycle undergoing the stimulation was compared visually with the preceding respiratory cycles for a change in V_T or maximal measured expiratory flow (VE_{max}). CR was defined by appreciable increase in both V_T and VE_{max} and further characterized by calculating V_T , inspiratory and expiratory time and duration of the breathing cycle (respectively T_i , T_e , T_{TOT}) and instantaneous minute ventilation (V_T/T_{TOT}). The various parameters were computed for the 'stimulation breath' as well as a 'reference breath', i.e., the mean of the two breaths immediately prior to the stimulation. 'Reference breaths' and stimulation breaths of CR pattern were compared between control and Mch. The ER was defined as an increase in VE_{max} not preceded by an increase in V_T . A 'no response' pattern (NR) was defined as no visible change in tidal flow and volume on the stimulation breath.

Statistical analysis was performed using the SYSTAT 11 package. Double cross tabulation was used to test for an association between phase of breathing cycle (inspiration, expiration) and test condition (control and Mch) regarding incidence and type of response. When the expected cell sizes were small, Fisher exact test was used. Student unpaired *t* test was used for the quantitative assessment of breathing pattern. A statistical significance was retained for a *p* value < 0.05. Data are expressed as mean ± SEM.

3. Results

3.1. Breathing pattern

Two hundred and forty eight tracheal stimulations were performed, 155 at control and 93 after Mch. According to Table 1, the

Table 1
Pattern of reference breath.

Condition	V_T (ml)	T_{TOT} (msec)	T_I (msec)	T_E (msec)	V_I/T_{TOT} (ml/sec)	$V_{E_{max}}$ (ml/sec)
Control ($n = 155$)	24.1 ± 0.4	2223 ± 20	719 ± 13	1505 ± 18	11.0 ± 0.2	79.4 ± 2.1
Mch ($n = 93$)	23.5 ± 0.4	1984 ± 18	677 ± 12	1307 ± 13	12.0 ± 0.3	91.9 ± 36.8
p	NS	$p < 0.0001$	$p < 0.05$	$p < 0.0001$	$p < 0.05$	NS

Mch: methacholine. Data are mean \pm SEM. V_T – tidal volume; T_I – inspiratory time; T_E – expiratory time; $V_{E_{max}}$ – maximal measured expiratory flow; V_I/T_{TOT} instantaneous minute ventilation.

reference breath differed significantly between control and Mch, mainly with shorter T_{TOT} ($p < 0.0001$) and larger V_I/T_{TOT} ($p < 0.05$) in controls.

3.2. Types and incidence of expulsive events

The punctuate stimulation allowed description of 4 types of expulsive events: single CR (Fig. 1A), single ER (Fig. 1B) and mixed responses (Fig. 2), either ER followed by CR (ER \rightarrow CR), or CR followed by ER (CR \rightarrow ER). The pre-stimulation breathing pattern was different between control and Mch (Table 1) and the qualitative analysis of expulsive responses was performed separately in each condition.

3.2.1. Control

Of the 155 control stimulations, 63 were performed in inspiration (41%) and 92 in expiration (59%). The overall numbers and incidences of single CR, ER and mixed response were respectively 40 (26%), 32 (21%) and 11 (7%), while 72 stimulations (46%) induced NR. As illustrated in Fig. 3, the pattern of response differed significantly between inspiration and expiration ($p < 0.0001$). There were significantly more single CR in inspiration (37/63, 59%) than expiration (3/92, 3%), more single ER in expiration (25/92, 27%)

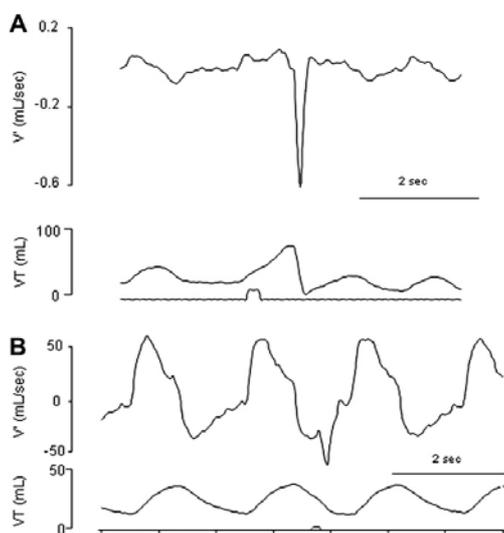


Fig. 1. Typical airflow (V) and tidal volume (VT) responses (inspiration upward) to mechanical stimulation of the trachea at lower mark. (A) Single cough reflex, characterized by increased VT and maximal measured expiratory flow, is typically elicited in inspiration. (B) Expiration reflex characterized by maximal measured expiratory flow not preceded by an inspiration is typically elicited in expiration.

than inspiration (7/63; 11%) as well as more NR in expiration (53/92; 58%) than inspiration (19/63; 30%). The observed mixed response was of the type ER \rightarrow CR and seen only when stimulating in expiration (11/92; 12%). Therefore a single CR occurred almost exclusively in inspiration (37/40 vs. 3/40 in expiration, $p < 0.0001$), a single ER much more often in expiration (25/32 vs. 7/32 in inspiration) and a mixed response only in expiration (11/11). Overall, responses containing CR (CR and ER \rightarrow CR) were significantly more successfully elicited in inspiration (37/51; 73%) compared to expiration (14/51; 27%; $p = 0.005$) whereas responses containing ER (ER and ER \rightarrow CR) significantly more readily elicited in expiration (36/43; 84%) compared to inspiration (7/43; 16%, $p < 0.001$).

3.2.2. Mch

Ninety three stimulations were realised after Mch, 47 in inspiration (51%) and 46 in expiration (49%). The numbers of single CR (23), ER (23) and mixed responses (7) led to similar incidence than at control, respectively 25%, 25% and 8%; there were 36 NR (39%). As shown in Fig. 4, a single CR was elicited significantly more often in inspiration (21/47) compared with expiration (2/46, $p < 0.0001$). These results were similar to those with non-Mch controls. On the other hand, single ER tended to be more frequent in expiration (16/46) than inspiration (7/46) but, in contrast to control, the difference was not statistically significant ($p = 0.06$). Similarly, there appeared to be slightly more NR in expiration (23/46) than inspiration (13/47), but the difference was not statistically significant ($p = 0.09$).

3.3. Influence of Mch induced bronchoconstriction on defensive responses

The pattern of response elicited during inspiration was statistically different between control and Mch mainly explained by the different incidence of mixed ($p < 0.01$) but not single responses. Indeed, the pattern ER \rightarrow CR – elicited only in expiration for the controls – was observed almost with the same frequency in inspiration and expiration after Mch ($p < 0.05$ vs. control) and the pattern CR \rightarrow ER, unobserved at control, occurred on two occasions in inspiration (Fig. 4). Interestingly, the incidence of those ventilatory responses including an ER was similar at control (39%) and

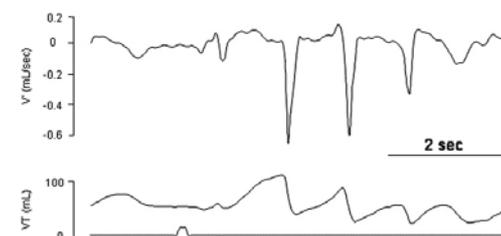


Fig. 2. A mixed response here consists in an expiration reflex followed by several coughs in response to stimulation in expiration. Symbols as in Fig. 1.

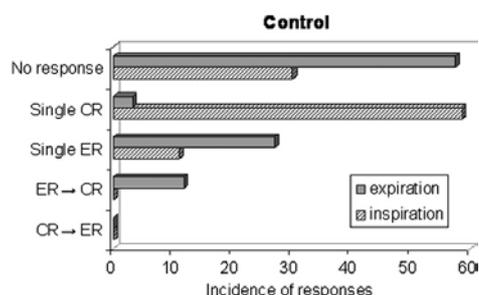


Fig. 3. Types and incidence of responses to mechanical stimulation of the trachea at control. CR: cough reflex; ER: expiration reflex. ER → CR: ER followed by CR. CR → ER: CR followed by ER. Note significantly more 'no responses' in expiration, larger incidence of cough in inspiration and larger incidence of responses containing an ER in expiration ($p < 0.01$).

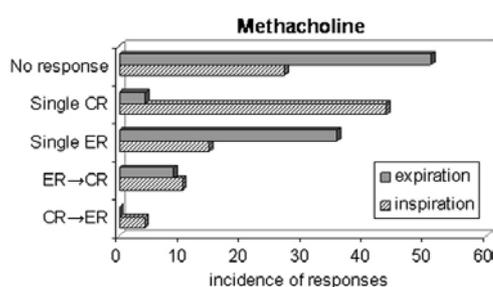
after Mch (46%) in expiration, but increased more than twofold from control (11%) to Mch (28%, $p < 0.03$) in inspiration.

3.4. Quantitative analysis of expulsive events

Compared with the NR breath, the CR was characterized mainly by an increase in V_T and VE_{max} apparent with both measured values and percentage of change from reference breath, at control and after Mch ($p < 0.0001$, Table 2). The CR breath also showed significant decrease in T_E ($p < 0.0001$) and T_{TOT} ($p < 0.001$) and increase in V_T/T_{TOT} ($p < 0.0001$, Table 2). The quantitative characteristics of CR after Mch compared with control were smaller V_T and change from reference ($p < 0.001$) and smaller VE_{max} ($p < 0.001$) and trend for a smaller change from reference (Table 2).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study showing the ability of a punctuate mechanical tracheal stimulus to trigger expulsive reflexes – usually as single efforts – the nature of which is strongly determined by the phase of the breathing cycle, favouring CR in inspiration and ER in expiration. Bronchoconstriction has little effect on incidence of single expiratory response but significantly decreases amplitude of both preparatory and expulsive phases of CR and promotes occurrence of mixed responses when the stimulus is in inspiration.



There are only a few studies demonstrating that not only CR but also ER can be elicited by tracheal stimulation in a reproducible manner [6,20,23]. In a majority of papers the distinction between CR and ER is ignored [24] especially when stimulating from the tracheobronchial tree [23]. Thus, the ER is either missed or described as a variant of cough [25], in spite of the fact that the down-regulating mechanisms are different. In two recent animal studies, the incidence of ventilatory responses to prolonged (≥ 5 s) mechanical tracheal stimulation that included an ER was 54% in the rabbit [23] and 68% in the cat [6]. The ER occurred at the beginning of the stimulation, was usually followed by cough but never [6] or exceptionally [23] described as single response (Table 3). In contrast, it is clearly shown here that the discrete mechanical stimulus readily provokes a single ER or, in a limited number of instances, ER followed by CR. Altogether, more than half the control stimuli resulted in single CR or ER, contrasting with the sequence of rhythmic cough efforts (the 'cough epoch') usually described in response to 5–20 s stimuli [5,26,27]. It thus appears a function of stimulus duration that cough is expressed as single or multiple event that can become rhythmic even after the stimulus has ceased [27]. Similar observations are reported with chemically induced cough in animals and humans, where increasing capsaicin or citric acid concentration increases frequency and strength of CR and ER [11]. According to Bolser et al. [28], defensive reflexes such as ER or the aspiration reflex can occur in conjunction with cough, but have not been reported to become rhythmic themselves. In fact, the ER is initiated and completed in a very short time frame (ca 100–200 ms) and may thus be interspaced within a cough epoch [28]. Such occurrence of ER preceding and/or mingled with CR evoked by laryngeal or tracheobronchial stimulation is reported in the literature [2,29,30], but the mechanisms responsible for the coordinated occurrence of different airway defensive behaviours are unknown [28]. A new finding here is that stimulation timing into the breathing cycle has major impact on the type of ventilatory response. Generally, during control conditions, stimuli were more successful in triggering reflex responses in inspiration compared with expiration. Furthermore, the CR was almost strictly elicited in inspiration as a single response, and much more frequent in inspiration than in expiration as part of a mixed response. On the other hand, when present in expiration, the CR usually followed an ER. The latter, as single response or followed by CR, was also more frequent in expiration. The fact that ER resists anaesthesia better than CR [1,7,8,23] could have brought a bias in the current preparation. However, we believe this was minimized by selecting the rabbits by their ability to trigger a cough epoch on insertion of the stimulating probe. In addition, convergent observations were reported after capsaicin aerosol administration (in inspiration) in awake humans, where 92% of total expulsive events were CR's and 8% ER's [11]. On the other hand, we failed to find any prior report on inspiration favouring cough to mechanical tracheobronchial stimulation.

The clear cut different incidence of ER and CR between inspiration and expiration theoretically may relate to the mechanical characteristics of the stimulus, the pattern of discharge from the lung mechanoreceptors as well as their connexions at the nucleus tractus solitarius and resulting integrative processes within the brainstem neural respiratory network.

According to current models of mechanoreception developed in simpler organisms, the stimulus stress is transmitted to mechanically gated ion channels through the cytoskeleton and extracellular matrix tethering [31]. Changes in tension within the tracheal wall brought about by respiratory movements would accordingly modify the transduction process and resulting afferent discharge. An increasing stress during inspiration would be expected to increase the likelihood of a cough response, as observed in the

Table 2
Pattern of stimulation breaths at control and after methacholine (Mch).

	Control			Mch		
	NR	CR	<i>p</i> ^a	NR	CR	<i>p</i> ^a
<i>n</i>	72	40		36	25	
<i>V</i> _I (ml)	24.6 ± 0.6	50.8 ± 2.6	<0.0001	24.8 ± 0.9	40.5 ± 2.1 [#]	<0.0001
<i>T</i> _I (msec)	746 ± 23	816 ± 34	NS	669 ± 17 [#]	750 ± 31	<0.001
<i>T</i> _E (msec)	1477 ± 37	991 ± 104	<0.0001	1256 ± 41 [#]	916 ± 97	<0.001
<i>T</i> _{ROT} (msec)	2223 ± 39	1808 ± 111	<0.001	1925 ± 45 [#]	1666 ± 115	<0.001
<i>V</i> <i>E</i> _{max} (ml/sec)	81.6 ± 3.1	308.4 ± 25.1	<0.0001	62.1 ± 2.4 [#]	193.3 ± 14.9 [#]	<0.0001
<i>V</i> _I / <i>T</i> _{ROT} (ml/sec)	11.3 ± 0.4	32.5 ± 2.5	<0.0001	13.2 ± 0.6 [#]	27.0 ± 2.6	<0.0001
<i>V</i> _I (%) ^a	1 ± 1	129 ± 13	<0.0001	5 ± 4	65 ± 10 [#]	<0.0001
<i>T</i> _I (%)	3 ± 2	13 ± 4	<0.001	1 ± 2	11 ± 5	<0.001
<i>T</i> _E (%)	-2 ± 2	-33 ± 7	<0.0001	-5 ± 2	-31 ± 7	<0.0001
<i>V</i> <i>E</i> _{max} (%)	3 ± 1	338 ± 37	<0.0001	9 ± 3 [#]	262 ± 32	<0.0001

NR: no response; CR: cough reflex; ^a *p* value NR vs CR; Control vs Mch: [#] *p* < 0.001; ^{##} *p* < 0.0001.^a % change of stimulation breath from reference breath.

current study. On the other hand, it has long been shown that airway RARs respond to stimulus transients rather than magnitude [32] and those afferent fibres believed to be responsible for mechanically induced cough couple to the airway wall in such a way that they respond to probing velocity rather than intensity. Indeed, their action potential discharge was reported to cease with probe immobilisation, no matter the amount of applied mechanical stress [33]. Comparable observation was made here in that CR or ER was evoked only during or shortly after the probe rotation, with little response when the latter was still. In the experimental conditions, the stimulator engine operated under little mechanical load and rotation velocity was very likely to remain constant during inspiration and expiration, in spite of small changes in tracheal diameter. Simulating a gross reduction in tracheal diameter probably exceeding that induced by pleural pressure change with breathing or smooth muscle shortening with Mch, it was in fact verified *in vitro* that the probe rotated at similar velocity in tubes 5 mm and 4 mm internal diameter (data not shown). Therefore, the stimulus characteristics at the receptor field were unlikely to be altered with breathing. On the other hand, significant reduction in tracheal calibre could possibly increase the number of receptive fields available for probing. In spite of a higher incidence of ER and mixed responses in inspiration, the net incidence of CR after Mch vs control was unchanged, thus showing no clear evidence that bronchoconstriction – with ensuing RAR sensitization [21] – did promote cough. Interestingly, the careful and detailed study of guinea-pig extra-pulmonary A-delta airway receptor suggests 2 afferent subtypes, only one of which – different from and of slower conduction velocity than the RAR – qualifies as cough receptor [34–36]. It is unknown to what extent similar characteristics apply to the current rabbit lower trachea *in vivo* preparation. To the best of our knowledge, no such study of the afferent arm of the ER has been reported, although shorter stimulus to response latency compared with CR [19,37,38] may indicate more rapid conduction velocity and/or central neural processing. Indeed, transforming afferent impulses into defensive behaviours that differ between inspiration and expiration could be a role for the brainstem neural

network as an integrator to the traffic from RARs, Aδ nociceptors as well as other lung mechanoreceptors that cause or facilitate cough [28,39,40]. For example, defensive responses evoked by mechanical stimulation of the airways have been suggested to be modulated by the sensory input from the slowly adapting pulmonary stretch receptors (SARs); however their location in airway smooth muscle [41,42] makes it unlikely that they would be strongly affected by an intraluminal mechanical stimulus. Interestingly, lung inflation up to 1.5 kPa was reported to increase the incidence of ERs and reduce that of CRs in response to tracheobronchial stimulation [23]. Therefore, passive lung distension [12] and spontaneous inspiration, both of which promote SAR discharge in anaesthetised rabbits – appear to have opposite effects on CR and ER. This suggests either little influence of the SARs on ventilatory responses to airways mechanical stimulation or a major role for the temporal profile of the volley that differs under static and dynamic conditions [43]. Finally, the findings that antitussive codeine suppresses frequency and strength of mechanically induced CR but not ER [6] point to the definitive – if not exclusive – implication of central neural mechanisms responsible for processing and ultimately transforming the afferent message into a complex motor behaviour distinct for CR and ER [44–46].

It is concluded that a discrete mechanical stimulus applied at the lower trachea within a fraction of a breath demonstrates that CR is favoured in inspiration and ER in expiration, both mostly as single efforts. Pre-treatment with Mch did not increase CR as initially hypothesized. In fact the relevant literature in asthma provides divergent suggestions that cough is [47,48] is not [49,50] related to bronchoconstriction. The present methodology finally offers an opportunity to delineate the particular mechanisms of those defensive behaviours that clearly vary along the breathing cycle. The observations add further to the assertion that different mechanisms are responsible for CR and ER and that the different nature of responses within the breath could result from modulation of mechanosensitivity of afferent neurons and/or integration of their messages. It is expected that the new experimental model may provide further insight into the

Table 3
Patterns of response to tracheobronchial mechanical stimulation with various stimulus durations.

Study	Species	S (s)	<i>n</i>	NR ^a %	CR%	ER%	ER → CR%	CR → ER%
Current (control)	Rabbit	0.15	155	46	26	21	7	0
Tatar et al. [22]	Rabbit	7	84	0	44	2	37	17
Poliacek et al. [6]	Cat	5–20 s	562	0	32	0	68	0

n: number of tests; S – stimulus duration; NR – no response; CR – cough reflex; ER – single expiration reflex; ER → CR – expiration reflex followed by cough; CR → ER – cough followed by expiration reflex.^a Percentage of total number of stimulations.

regulation of airway defence mechanisms relevant to chronic cough in human.

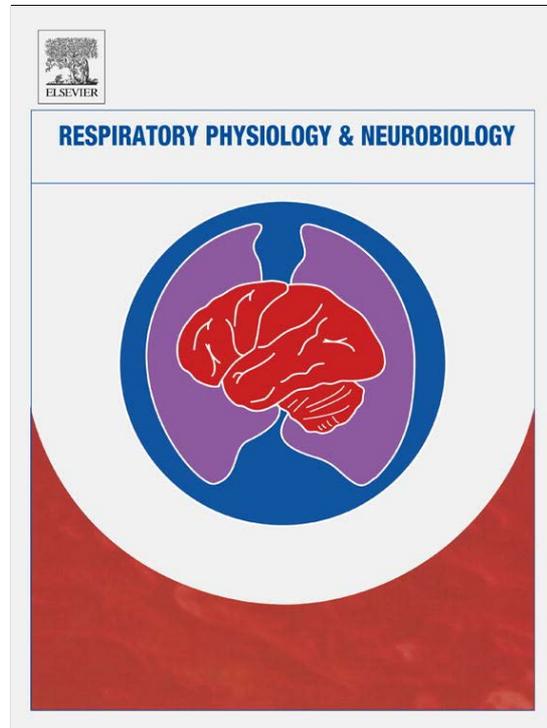
Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Pr John Widdicombe for helpful comments and critical assessment of the manuscript and Anne-Laure Leblanc for technical assistance. Supported by grant EA 3450 from ministère de la recherche.

References

- [1] Korpas J. Differentiation of the expiration and the cough reflex. *Physiol Bohemoslov* 1972;21:677–80.
- [2] Korpas J. Expiration reflex from the vocal folds. *Physiol Bohemoslov* 1972;21:671–5.
- [3] Korpas J. [Clearing function of the lung in obstruction of the respiratory tract]. *Bratisl Lek Listy* 1979;71:348–54.
- [4] Korpas J, Tatar M. The expiration reflex during ontogenesis in the rat. *Physiol Bohemoslov* 1975;24:257–61.
- [5] Bolser DC, Hey JA, Chapman RW. Influence of central antitussive drugs on the cough motor pattern. *J Appl Physiol* 1999;86:1017–24.
- [6] Poliacsek I, Rose MJ, Corrie LW, Wang C, Jakus J, Barani H, et al. Short reflex expirations (expiration reflexes) induced by mechanical stimulation of the trachea in anesthetized cats. *Cough* 2008;4:1.
- [7] Tatar M, Korpas J. [Contribution to the problem of the influence of anesthesia on experimental cough]. *Bratisl Lek Listy* 1983;79:276–85.
- [8] May AJ, Widdicombe JG. Depression of the cough reflex by pentobarbitone and some opium derivatives. *Br J Pharmacol Chemother* 1954;9:335–40.
- [9] Sullivan CE, Kozar LF, Murphy E, Phillipson EA. Arousal, ventilatory, and airway responses to bronchopulmonary stimulation in sleeping dogs. *J Appl Physiol* 1979;47:17–25.
- [10] Sullivan CE, Murphy E, Kozar LF, Phillipson EA. Waking and ventilatory responses to laryngeal stimulation in sleeping dogs. *J Appl Physiol* 1978;45:681–9.
- [11] Vovk A, Bolser DC, Hey JA, Danzig M, Vickroy T, Berry R, et al. Capsaicin exposure elicits complex airway defensive motor patterns in normal humans in a concentration-dependent manner. *Pulm Pharmacol Ther* 2007;20:423–32.
- [12] Yu J, Coleridge JC, Coleridge HM. Influence of lung stiffness on rapidly adapting receptors in rabbits and cats. *Respir Physiol* 1987;68:161–76.
- [13] Jonzon A, Pisarri TE, Coleridge JC, Coleridge HM. Rapidly adapting receptor activity in dogs is inversely related to lung compliance. *J Appl Physiol* 1986;61:1980–7.
- [14] Homma I, Isobe A, Iwase M, Onimaru H, Sibuya M. Cross-correlation between vagal afferent impulses from pulmonary mechanoreceptors and high-frequency inflation (HFI) and deflation (HFD) in rabbits. *Neurosci Lett* 1987;75:299–302.
- [15] Yu J, Roberts AM. Indirect effects of histamine on pulmonary rapidly adapting receptors in cats. *Respir Physiol* 1990;79:101–10.
- [16] Ravi K, Teo KK, Kappagoda CT. Action of histamine on the rapidly adapting airway receptors in the dog. *Can J Physiol Pharmacol* 1989;67:1499–505.
- [17] Sant'Ambrogio FB, Sant'Ambrogio G, Fisher JT. Lung mechanics and activity of slowly adapting airway stretch receptors. *Eur Respir J* 1988;1:685–90.
- [18] Wirtz HR, Dobbs LG. The effects of mechanical forces on lung functions. *Respir Physiol* 2000;119:1–17.
- [19] Tomori Z, Stransky A. Electroneurographic and pneumotachographic analysis of the expiration reflex. *Physiol Bohemoslov* 1973;22:589–601.
- [20] Nishino T, Honda Y. Time-dependent responses of expiration reflex in cats. *J Appl Physiol* 1986;61:430–5.
- [21] Mills JE, Sellick H, Widdicombe JG. Activity of lung irritant receptors in pulmonary microembolism, anaphylaxis and drug-induced bronchoconstrictions. *J Physiol* 1969;203:337–57.
- [22] 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.
- [23] Tatar M, Hanacek J, Widdicombe J. The expiration reflex from the trachea and bronchi. *Eur Respir J* 2008;31:385–90.
- [24] Widdicombe J, Fontana G. Cough: what's in a name? *Eur Respir J* 2006;28:10–5.
- [25] Lee MG, Undem BJ. Basic mechanisms of cough: current understanding and remaining questions. *Lung* 2008;186(Suppl. 1):S10–6.
- [26] Fontana GA, Widdicombe J. What is cough and what should be measured? *Pulm Pharmacol Ther* 2007;20:307–12.
- [27] Korpas J, Tomori Z. Cough and other respiratory reflexes. In: Herzog H, editor. *Progress in Respiration Research*, vol. 12. Basel, Switzerland: Karger; 1979.
- [28] Bolser DC, Poliacsek I, Jakus J, Fuller DD, Davenport PW. Neurogenesis of cough, other airway defensive behaviors and breathing: a hierarchical system? *Respir Physiol Neurobiol* 2006;152:255–65.
- [29] Baekey DM, Morris KF, Nuding SC, Segers LS, Lindsey BG, Shannon R. Ventrolateral medullary respiratory network participation in the expiration reflex in the cat. *J Appl Physiol* 2004;96:2057–72.
- [30] Mutolo D, Bongiani 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 solitarius of the rabbit. *Brain Res Bull* 2007;74:284–93.
- [31] Syntichaki P, Tavernarakis N. Genetic models of mechanotransduction: the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Rev* 2004;84:1097–153.
- [32] Widdicombe J. Reflexes from the lungs and airways: historical perspective. *J Appl Physiol* 2006;101:628–34.
- [33] McAlexander MA, Myers AC, Undem BJ. Adaptation of guinea-pig vagal airway afferent neurones to mechanical stimulation. *J Physiol* 1999;521(1):239–47.
- [34] Canning BJ, Mazzone SB, Meeker SN, Mori N, Reynolds SM, Undem BJ. Identification of the tracheal and laryngeal afferent neurones mediating cough in anaesthetized guinea-pigs. *J Physiol* 2004;557:543–58.
- [35] Mazzone SB. An overview of the sensory receptors regulating cough. *Cough* 2005;1:2.
- [36] Canning BJ, Mori N, Mazzone SB. Vagal afferent nerves regulating the cough reflex. *Respir Physiol Neurobiol* 2006;152:223–42.
- [37] Addington WR, Stephens RE, Widdicombe JG, Ockey RR, Anderson JW, Miller SP. Electrophysiological latency to the external obliques of the laryngeal cough expiration reflex in humans. *Am J Phys Med Rehabil* 2003;82:370–3.
- [38] Tomori Z. Pleural, tracheal and abdominal pressure variations in defensive and pathologic reflexes of the respiratory tract. *Physiol Bohemoslov* 1965;14:84–95.
- [39] Bonham AC, Sekizawa S, Chen CY, Joad JP. Plasticity of brainstem mechanisms of cough. *Respir Physiol Neurobiol* 2006;152:312–9.
- [40] Shannon R, Baekey DM, Morris KF, Lindsey BG. Ventrolateral medullary respiratory network and a model of cough motor pattern generation. *J Appl Physiol* 1998;84:2020–35.
- [41] Schelegle ES, Green JF. An overview of the anatomy and physiology of slowly adapting pulmonary stretch receptors. *Respir Physiol* 2001;125:17–31.
- [42] von Düring M, Andres KH, Iravani J. The fine structure of the pulmonary stretch receptor in the rat. *Kidney Int* 1974;5:215–22.
- [43] Bartlett Jr D, Sant'Ambrogio G, Wise JC. Transduction properties of tracheal stretch receptors. *J Physiol* 1976;258:421–32.
- [44] Shannon R, Baekey DM, Morris KF, Li Z, Lindsey BG. Functional connectivity among ventrolateral medullary respiratory neurones and responses during fictive cough in the cat. *J Physiol* 2000;525(Pt 1):207–24.
- [45] 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.
- [46] Pantaleo T, Bongiani F, Mutolo D. Central nervous mechanisms of cough. *Pulm Pharmacol Ther* 2002;15:227–33.
- [47] Shin B, Cole SL, Park SJ, Ledford DK, Lockey RF. A new symptom-based questionnaire for predicting the presence of asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:27–34.
- [48] Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Yamaguchi M, Matsuoaka H, et al. Features of cough variant asthma and classic asthma during methacholine-induced bronchoconstriction: a cross-sectional study. *Cough* 2009;5:3.
- [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.
- [50] Fujimura M, Sakamoto S, Kamio Y, Matsuda T. Cough receptor sensitivity and bronchial responsiveness in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1992;5:291–5.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Respiratory Physiology & Neurobiology

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

Nasal stimulation by water down-regulates cough in anesthetized rabbits

Mathias Poussel, Silvia Varechova, Bruno Demoulin, Bernard Chalon, Cyril Schweitzer, François Marchal, Bruno Chenuel*

Laboratoire de Physiologie, EA 3450, Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, F-54505 – Vandoeuvre les Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 January 2012

Received in revised form 2 May 2012

Accepted 23 May 2012

Keywords:

Cough

Expiration reflex

Mechanical stimulation

Trachea

Rabbit

ABSTRACT

The 'cough center' can be tuned by various afferent inputs, suggesting possible interactions at a central level of neural pathways originating from distant anatomical sites. The present study was designed to determine whether brief mechanical stimulation of the trachea can trigger cough during apnea elicited by nasal instillation of water.

Twelve anesthetized, tracheotomized rabbits were studied. Mechanical stimulation of the trachea was performed under 3 conditions: baseline control, after instillation of saline into the nose and during apnea following instillation of water.

The baseline breathing pattern did not differ between the 3 conditions. In a series of 171 stimulations, expiration reflex occurred in 81% of stimulations during apnea with a significantly ($p < 0.0001$) lower peak expiratory flow than at baseline or during saline instillation. The incidence of responses comprising a cough reflex was also lower during water instillation than at either baseline or with saline ($p < 0.0001$).

These results indicate that stimulation of nasal afferents with distilled water likely down-regulates cough.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cough may be triggered by chemical or mechanical irritation of the receptor field of the vagus nerve and expels inhaled foreign matter from the lungs or clears the airways of endogenous mucus. Afferents located in the airway mucosa are therefore most relevant to this physiological function. On the other hand, a number of vagal afferents do not innervate the airways and trigger cough irrespective of this primary role; inversely, some parts of the airway mucosa not innervated by vagal afferents do not promote cough on irritant stimulation. Indeed, stimulation of sensory endings of the trigeminal nerve of the normal nasal mucosa provokes a variety of defensive responses that do not include cough (Korpas and Tomori, 1979). However, there is experimental evidence that inflammation of the nose may sensitize the cough reflex (Plevkova et al., 2004a,b; Tatar et al., 2009). For instance, the "cough center" can be up-regulated in the presence of experimental rhinitis (Brozmanova et al., 2008). In contrast, little is known about the possible down-regulation of cough by other types of input from the nose, an important aspect in the understanding of the mechanisms that desensitize cough at the central level.

Instillation of water into the nose elicits apnea that is designed to prevent penetration of the fluid further down into the airways (Angell James and Daly Mde, 1969). From a teleological point of view, those nociceptive stimuli that inhibit ventilation – when applied at the entrance of the respiratory system – would also be expected to down-regulate the cough reflex. Indeed, the cough reflex starts with an augmented inspiration that ought to be inhibited in order to prevent aspiration of foreign material into the lungs. In contrast, the expiration reflex, a forceful expiratory effort not preceded by an inspiration (Widdicombe and Fontana, 2006) would be less likely to be inhibited by the nasal stimulus.

To the best of our knowledge, no data are available on the interaction between apnea induced by stimulation of the nasal mucosa and cough or expiration reflex. This issue is of potential relevance to the management of cough. The present study was designed to determine whether mechanical stimulation effectively triggers cough or expiration reflex during apnea elicited by instillation of water into the nose. A simple animal model, allowing ventilatory responses triggered by a brief mechanical stimulus applied to the tracheal mucosa (Varechova et al., 2010), was used to test the hypothesis that cough is down-regulated during reflex apnea.

* Corresponding author. 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), s.varechova@chu-nancy.fr (S. Varechova), bruno.demoulin@univ-lorraine.fr (B. Demoulin), bernard.chalon@univ-lorraine.fr (B. Chalon), c.schweitzer@chu-nancy.fr (C. Schweitzer), f.marchal@chu-nancy.fr (F. Marchal), b.chenuel@chu-nancy.fr (B. Chenuel).

2. Material and methods

Twelve anesthetized, tracheotomized New Zealand adult rabbits (3.57 ± 1.15 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 particular 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. 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

Airflow was measured at the tracheal cannula using a Fleisch # 0 pneumotachograph (Metabo, Hepalinges, Switzerland). 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.

2.3. Tracheal stimulation

A semi-rigid silastic catheter (0.7 mm OD) was advanced downward through a side port of the tracheal tube until a bout of coughing was induced. Preliminary post-mortem observations had indicated that the catheter tip was situated 2–3 cm distal from the end of the tube, in the lower third of the trachea (Varechova et al., 2010). The external end of the catheter was connected to the shaft of an electrical rotating motor (low voltage DC motor 719RE280, MFA/Comodrills, UK). When actuated, the motor rotated the catheter at $60 \text{ cycles min}^{-1}$, rubbing the catheter tip onto the airway mucosa, inducing mechanical stimulation (rectangular pattern). The stimulus duration was set at 300 ms, i.e. sufficiently long to promote defensive reflex responses but sufficiently short to allow triggering of the stimulation during expiration (E). The electrical signal from the rotating motor was fed to a computer together with the respiratory signals to allow precise identification of the time-course of the stimulus.

2.4. Nasal stimulation

The tip of a thin silastic catheter (1.3 mm OD) was positioned to a depth of 5 mm in one nostril and fluid was instilled and continued for up to 10 s or to a maximum volume of 5 mL. To prevent laryngeal contamination by the fluid, the rabbits' shoulders were slightly raised so that the head remained in a sloping position. The instilled fluid therefore essentially drained from the nostrils. When sneezing efforts occurred on insertion of the nasal catheter or at the very beginning of instillation, tracheal stimulation was delayed for a few seconds, while apnea was established or regular breathing had resumed. Apnea was defined by a visible increase in expiratory time, usually corresponding to at least doubling of the baseline T_E . After stimulation, the fluid was aspirated from the

nasal cavity. Stimulations with normal saline and distilled water were performed in each animal.

2.5. Abdominal muscle electromyography

Abdominal muscle electromyography (EMG) was recorded in 3 rabbits by bipolar fine stainless steel wire electrodes (A-M Systems, INC, Carlsborg, WA 98.324) introduced under visual control into either the transversus abdominis or external oblique abdominal muscles.

2.6. Protocol

Only those rabbits tested positive for expulsive efforts on insertion of the stimulation catheter into the trachea at the beginning of the experiment were included in the analysis. All subsequent stimulation was performed while the animal had been breathing quietly for at least 1 min. During spontaneous tidal breathing (control) and instillation of normal saline into the nasal cavity, all tests were performed during expiration. Tests using distilled water were performed during the systematic induced apnea. Control tests were repeated throughout the experiment to ensure the presence of a defensive reflex at the various study time-points. For each rabbit, at least 2 control tests were performed at the beginning of the experiment, after instillation of water and after instillation of saline. After the first 2 control tests, nasal stimulation with both water and saline was performed randomly with at least 2 tests under each condition.

2.7. Data analysis

A reference breath was characterized at baseline by averaging the following parameters on 3 breathing cycles: V_T , peak expiratory flow ($\dot{V}_{E_{\text{peak}}}$), inspiratory and expiratory time (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 V_E relative to the reference breath, as previously described (Varechova et al., 2010). Cough reflex (CR) was defined by a significant increase in both V_T and $\dot{V}_{E_{\text{peak}}}$ and expiration reflex (ER) was defined by an isolated increase in $\dot{V}_{E_{\text{peak}}}$ not preceded by an increase in V_T . During apnea, brief expulsive events corresponding to the ER were observed, but were significantly blunted compared to those observed during tidal expiration. The responses were identified by a $\dot{V}_{E_{\text{peak}}}$ occurring during apnea but well within the range of the corresponding reference $\dot{V}_{E_{\text{peak}}}$ and will be referred to as weak expiration reflexes (wER). A no response pattern (NR) was defined by no change in tidal flow and volume.

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 , $\dot{V}_{E_{\text{peak}}}$, T_I and T_E). The limit of significance was $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm SD.

3. Results

A total of 171 tracheal stimulations were performed. Brief stimulation allowed the description of 5 types of events: single CR, single ER, mixed response (ER followed by one or more CR), single wER and NR. For each rabbit, 6 ± 0.3 control tests, 5.3 ± 0.8 tests after instillation of water and 2.8 ± 0.4 tests after instillation of saline were

Table 1
Characteristics of the reference breath and expulsive respiratory responses to tracheal stimulation.

Condition	Control	Saline	Water
<i>n</i>	73	34	64
Characteristics of the reference breath			
$T_{i,ref}$ (ms)	693 ± 134	718 ± 117	753 ± 188
$T_{e,ref}$ (ms)	1678 ± 1112	1900 ± 1316	1669 ± 485
$V_{T,ref}$ (mL)	22.5 ± 4.6	20.9 ± 5.5	21.5 ± 4.7
$\dot{V}_{E,peak,ref}$ (mL/s)	76.1 ± 17.1	68.4 ± 21	75.8 ± 15.3
Expulsive respiratory responses to tracheal stimulation			
CR	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)
ER	31 (43%)	14 (41%)	52 (81%)
Mixed	28 (38%)	13 (38%)	1 (2%)
NR	13 (18%)	7 (21%)	11 (17%)

Data are mean ± SD; Reference breath for inspiratory and expiratory time ($T_{i,ref}$, $T_{e,ref}$), tidal volume ($V_{T,ref}$) and peak expiratory flow ($\dot{V}_{E,peak,ref}$); CR: single cough reflex; ER: single expiration reflex; Mixed: ER followed by one or more CR; NR: no response.

* $p < 0.0001$ vs control or saline.

obtained. As shown in Table 1, the baseline breathing pattern was not significantly different between control ($n = 73$), saline ($n = 34$) and water ($n = 64$), and the stimulation failure rate was also similar between control (18%), saline (21%) and water (17%, Table 1).

During the 73 control tests, 43% responses were single ER (Fig. 1) and 38% were mixed responses, corresponding to ER followed by 1 CR in 20 (71%) stimulations and by 2 CR in 8 (29%) stimulations (Fig. 2). In contrast, only 1 single cough reflex was observed (Table 1). A fairly similar pattern was observed during the 34 saline tests (Fig. 3): 41% of responses consisted of a single ER and 38% were mixed responses (ER followed by one or 2 CR in 9 (69%) and 4 (31%) stimulations, respectively).

Instillation of water regularly triggered apnea, as attested by the variable but significant lengthening of expiration (Figs. 4 and 5), with an average duration of 5.8 ± 2.5 s. No single cough was observed. In 81% of stimulations, the response consisted of a single ER. Interestingly, a majority (52%) of the responses were brief expulsive events with a $\dot{V}_{E,peak}$ well within the baseline (Fig. 5B).

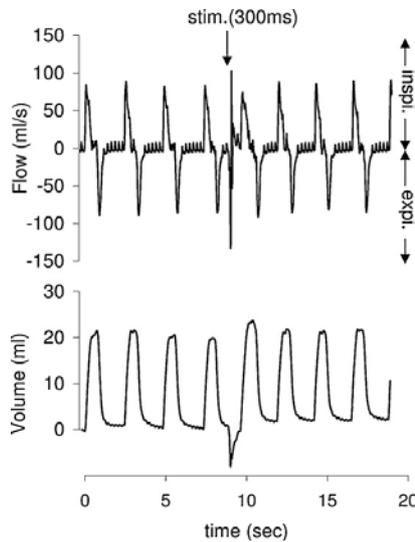


Fig. 1. Single expiration reflex (ER) characterized by a significant increase in peak expiratory flow ($\dot{V}_{E,peak}$) but no change in tidal volume (V_T). The downwards arrow indicates the beginning of tracheal stimulation (duration 300 ms). Positive and negative airflow rates indicate inspiration and expiration, respectively.

Table 2
Expiration reflex responses to tracheal stimulation.

Condition	Control	Saline	Water
ER/wER	31/0	14/0	19/33*
\dot{V}_E (mL/s)	89.8 ± 29.9	87.8 ± 37.8	55.8 ± 24.5*
<i>n</i>	31	14	52

ER: expiration reflex; wER: weak expiration reflex; \dot{V}_E : peak expiratory flow.

* $p < 0.0001$ vs control or saline.

These responses are referred to as weak expiration reflex (wER, Table 2). As the amplitude of peak expiratory flow was sometimes markedly decreased, the expulsive nature of this event may have been attenuated. However, in 3 rabbits, the electromyographic burst from abdominal muscles synchronous with the peak expiratory flow (Fig. 5) confirmed the expiration reflex. Only 2% of ER were followed by cough (Table 1).

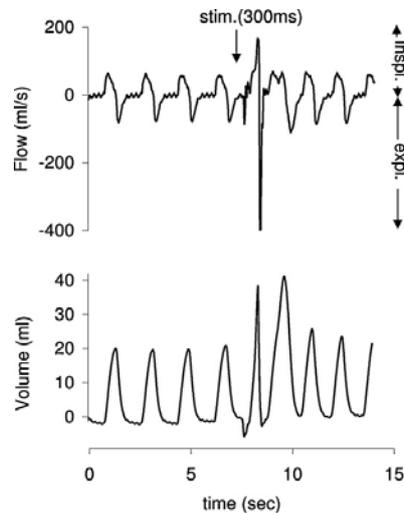


Fig. 2. Mixed response starting with an expiration reflex (ER) followed by two cough reflexes (CR). The first part of the response (ER) is characterized by a significant increase in peak expiratory flow ($\dot{V}_{E,peak}$) but no change in tidal volume (V_T), whereas the second part (CR) is characterized by an increase in both V_T and $\dot{V}_{E,peak}$. The downwards arrow indicates the beginning of tracheal stimulation (duration 300 ms). Positive and negative airflow rates indicate inspiration and expiration, respectively.

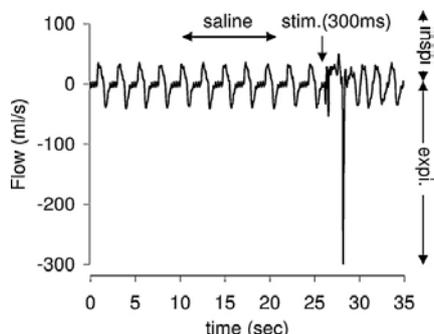


Fig. 3. Mixed response (expiration reflex followed by a cough reflex) after instillation of saline. Breathing pattern was not modified by the instillation of saline and the responses to tracheal stimulation were similar to those of controls. The downwards arrow indicates the beginning of tracheal stimulation (duration 300 ms). Positive and negative airflow rates indicate inspiration and expiration, respectively. The left right arrow indicates nasal instillation of saline.

Overall, a greater number of single ER and fewer mixed responses ($p < 0.0001$) were observed during instillation of water than during either the control or saline conditions (Table 1). However, a majority of ER during instillation of water corresponded to the wER type, which had a significantly higher incidence than during control or saline conditions (Table 2). Accordingly, the average $\dot{V}_{E_{peak}}$ was significantly lower for ER in response to water than for either saline or control ($p < 0.0001$, Table 2). On the other hand, the incidence of ER as a single response or as part of the mixed type of response was not significantly different between control, saline and water. Finally, the incidence of responses comprising a CR—i.e., single cough effort plus coughs occurring during mixed responses was lower during instillation of water than during control or saline conditions ($p < 0.0001$).

4. Discussion

Cough results from medullary integration of inputs that travel along afferent vagal fibers, referred to as “cough receptors” (Widdicombe et al., 2011). The cough reflex exhibits ‘plasticity’ at

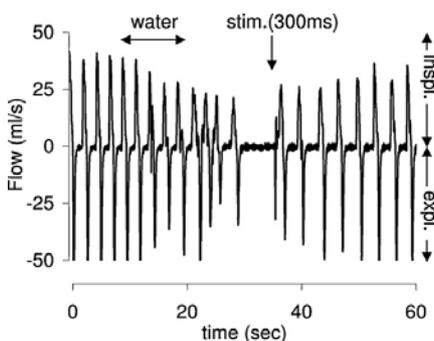


Fig. 4. Weak expiration reflex (wER) during apnea. Instillation of distilled water into the nostril induced apnea, defined by an increased expiratory time. wER is characterized by a peak expiratory flow ($\dot{V}_{E_{peak}}$) within that of the reference breath. The downwards arrow indicates the beginning of tracheal stimulation (duration 300 ms). Positive and negative airflow rates indicate inspiration and expiration, respectively. The left right arrow indicates nasal instillation of water.

either the sensor—(Carr and Lee, 2006) or integration level (Bonham et al., 2004). Afferents from the nose per se do not trigger cough, but the reflex is sensitized by experimental rhinitis in animals (Brozmanova et al., 2008), and the post-nasal drip syndrome is also a common cause of chronic cough in humans (Chung and Pavord, 2008; Pratter, 2006). Most published data suggest that nasal sensory nerves are involved in sensitization of cough by nasal inflammation (Plevkova et al., 2009; Plevkova et al., 2004a, 2006; Plevkova et al., 2004b; Tatar et al., 2009; Taylor-Clark et al., 2005). In contrast to other sites—such as mouth, pharynx, respiratory tract and lungs, cerebral cortex and somatic tissues that may down-regulate the ‘cough center’ (Widdicombe et al., 2011), little evidence is available to support desensitization of cough from the nose.

Apnea elicited by distilled water in the nose was associated with considerable depression of the cough response to brief mechanical stimulation of the trachea. In this study, tidal expiration was used to define control conditions, as previous reports on this model have demonstrated considerable depression of the cough reflex compared to inspiration (Varechova et al., 2010). Airway and lung mechanics as well as the pattern of discharge from the relevant mechanoreceptors are fairly comparable during apnea and tidal expiration. Airway rapidly adapting receptors (RAR) respond to rapid changes in airway mechanics resulting, for instance, from rapid airflow transients (Sant’Ambrogio and Widdicombe, 2001; Widdicombe, 2003) and should therefore be similarly silent during either apnea or tidal expiration, which may not be the case during inspiration (McAlexander et al., 1999). The slowly adapting receptor (SAR) traffic should be minimal and comparable during apnea and expiration.

Interestingly, a single cough was rarely observed during control stimulation, but the provoked expiration reflex was sometimes followed by one or several cough efforts in nearly 40% of stimulations (Fig. 2). In contrast, the cough reflex was markedly depressed in response to water, as the single-cough incidence remained low and the incidence of expiration reflex followed by cough decreased significantly to only 2%. The overall incidence of cough (i.e., single coughs plus coughs following an expiration reflex) during application of water in the nose was significantly depressed compared to control conditions. Interestingly, normal saline under the same conditions did not significantly alter the overall incidence of cough. These experiments therefore provide strong evidence that cough suppression is related to apnea and/or the hypoosmolarity of the stimulus, rather than to its mechanical characteristics. In contrast with the marked inhibition of cough, nasal stimulation by water showed little effect on the incidence of expiration reflexes that was similar under all 3 conditions. On closer inspection, however, the magnitude of the response was decreased during stimulation by water (Table 2) with a number of responses described as “weak expiration reflexes” suggesting that apnea decreased the intensity of the expulsive effort.

Integrative processes within the brainstem neural respiratory network play a key role as an integrator to inhibitory and excitatory influences on defensive airway reflexes. Inhibition of the magnitude of the ventilatory response during apnea indicates that the phenomenon is related to desensitization at the level of the cough centers. There is strong evidence to suggest that afferent inputs from the nasal cavity are involved in the apnea elicited by water (Butler and Jones, 1997; Furilla and Jones, 1986; Sekizawa and Tsubone, 1994), and that the trigeminal nerve is the likely neural pathway and hypoosmolarity the main stimulus (Uzawa et al., 1995). Water seems to play a major role in initiating apnea, probably via receptors located in free nerve endings distributed throughout the nasal mucosa and providing most of the afferent supply of the anterior ethmoidal nerve, a small branch of the ophthalmic division of the trigeminal nerve (Panneton et al., 2010).

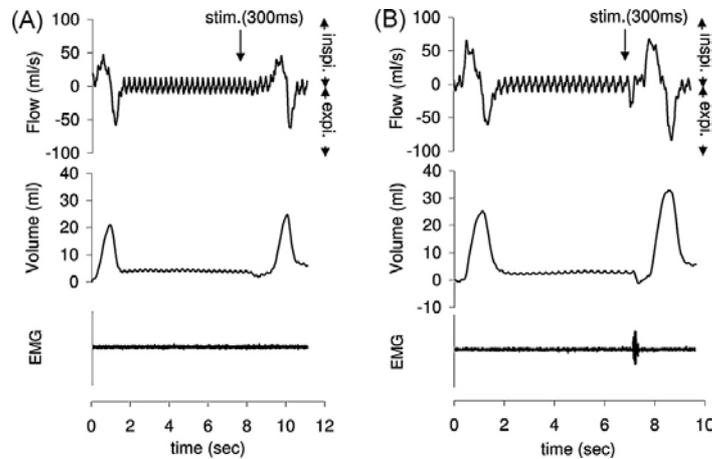


Fig. 5. (A–B). A. A 'no response' pattern (NR) during apnea. B. Weak expiration reflex (wER) during apnea. Compared to wER, NR is characterized by no visible change in tidal flow, volume and abdominal activity EMG on the stimulation breath. The downwards arrow indicates the beginning of tracheal stimulation (duration 300 ms). Positive and negative airflow rates indicate inspiration and expiration, respectively.

Since these fibers are the first to detect substances entering the upper respiratory tract, they are sometimes described as 'gatekeepers' (Panneton et al., 2006). In contrast to electrical neural stimulation that may damage the tissues, water and saline were used in this study because they may also play a role in the animal's daily life. Of immediate practical significance is the role of hypoosmolar stimulation of trigeminal sensors in mediating apnea. The trigeminal projections onto the brainstem to nearby regions of the nucleus tractus solitarius – caudal C1 area and intermediate ventrolateral medulla (Dutschmann and Herbert, 1996; McCulloch et al., 1999) – impact on neurons that generate respiratory rhythm and coughing (Canning and Mori, 2010; Mazzone et al., 2011). Therefore, in response to the same mechanical stimulation during instillation of saline or water, and the same balance of discharge (RARs, SARs), the brainstem respiratory network must favor a motor response (Bolser et al., 2006) promoting responses comprising an ER (i.e. ER and wER) to responses comprising a CR. It can then be speculated that, during apnea, the options of the brainstem respiratory network are either an inhibited motor response (i.e. wER instead of ER, and a lower incidence of responses comprising a CR), supporting down-regulation of cough. However, despite the sloping position of the rabbits during the experiments and although residual fluids (water and saline) were aspirated from nasal cavities after each recording, it cannot be excluded that a small volume of instilled fluid sometimes entered the larynx. Fibers in the superior laryngeal nerve may therefore have been sporadically stimulated and may have participated in the reflex apnea.

This hypothesis concerning down-regulation of the cough reflex is consistent with the findings of other studies (Furilla and Jones, 1986; Plevkova et al., 2004a,b; Tatar et al., 2009), in which the convergence of disparate afferent pathways in the central nervous system enhanced the cough reflex (intranasal administration of capsaicin). Instead of sensitizing, apnea desensitized airway defensive reflexes, supporting a common mechanism, in which some of the central terminals of nasal afferent neurons synapse (directly or indirectly) on the secondary sensory neurons of the cough pathway. Therefore, in the nose, like other sites able to tune the 'cough center', some afferent inputs sensitize while others desensitize airway defensive reflexes.

Instillation of distilled water into the nasal cavity elicited apnea. Both central and peripheral chemoreceptors were then stimulated by the progressively developing hypoxia and hypercapnia (Jones et al., 1982). These outputs may then interact at the brainstem in addition to afferents from nostril chemoreceptors and tracheal mechanoreceptors. The duration of apnea may consequently influence the motor response to tracheal mechanical stimulation. In the present study, tracheal stimulation was always delivered immediately after onset of apnea. However, mechanical stimulation was occasionally delivered after longer periods of apnea and no consequences on the motor response were observed (data not used for statistical analysis). Central and peripheral chemoreceptors therefore certainly did not play a major role in the central integration process leading to generation of the preferred respiratory defensive response under these conditions.

In conclusion, this study shows that nasal stimulation by water down-regulates tracheal defensive reflexes in anesthetized rabbits, as stimulation of nasal afferents with distilled water likely desensitized airway defensive reflexes, as shown by inhibition of the magnitude of the ER response (i.e. wER) and the decreased incidence of responses comprising a CR. Both reflexes (CR and ER) are powerful ancestral reflexes designed to protect the airways from potentially harmful inhaled agents (particles, water). The down-regulation suggested by the present results would make teleological sense because CR and its full inspiration phase would be undesirable during diving. However, further studies are needed to improve our knowledge of the precise level of central integration and the nature of the inputs involved in these interactions.

Acknowledgements

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

References

Angell James, J.E., Daly Mde, B., 1969. Nasal reflexes. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 62, 1287–1293.

- Bolser, D.C., Poliacsek, 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.
- 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.
- Brozmanova, M., Plevkova, J., Tatar, M., Kollarik, M., 2008. Cough reflex sensitivity is increased in the guinea pig model of allergic rhinitis. *Journal of Physiology and Pharmacology* 59 (Suppl. 6), 153–161.
- Butler, P.J., Jones, D.R., 1997. Physiology of diving of birds and mammals. *Physiological Reviews* 77, 837–899.
- Canning, B.J., Mori, N., 2010. An essential component to brainstem cough gating identified in anesthetized guinea pigs. *FASEB Journal* 24, 3916–3926.
- Carr, M.J., Lee, L.Y., 2006. Plasticity of peripheral mechanisms of cough. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 152, 298–311.
- Chung, K.F., Pavord, I.D., 2008. Prevalence, pathogenesis, and causes of chronic cough. *Lancet* 371, 1364–1374.
- Dutschmann, M., Herbert, H., 1996. The Kollarik–Fuse nucleus mediates the trigeminally induced apnoea in the rat. *Neuroreport* 7, 1432–1436.
- Furilla, R.A., Jones, D.R., 1986. The contribution of nasal receptors to the cardiac response to diving in restrained and unrestrained redhead ducks (*Aythya americana*). *Journal of Experimental Biology* 121, 227–238.
- Jones, D.R., Milsom, W.K., Gabbott, G.R., 1982. Role of central and peripheral chemoreceptors in diving responses of ducks. *American Journal of Physiology* 243, R537–R545.
- Korpas, J., Tomori, Z., 1979. *Cough and Other Respiratory Reflexes*. Karger, Basel.
- Mazzone, S.B., McGovern, A.E., Cole, L.J., Farrell, M.J., 2011. Central nervous system control of cough: pharmacological implications. *Current Opinion in Pharmacology* 11, 265–271.
- McAlexander, M.A., Myers, A.C., Undem, B.J., 1999. Adaptation of guinea-pig vagal airway afferent neurones to mechanical stimulation. *Journal of Physiology* 521 (Pt 1), 239–247.
- McCulloch, P.F., Faber, K.M., Panneton, W.M., 1999. Electrical stimulation of the anterior ethmoidal nerve produces the diving response. *Brain Research* 830, 24–31.
- Panneton, W.M., Gan, Q., Juric, R., 2010. The rat: a laboratory model for studies of the diving response. *Journal of Applied Physiology* 108, 811–820.
- Panneton, W.M., Gan, Q., Juric, R., 2006. Brainstem projections from recipient zones of the anterior ethmoidal nerve in the medullary dorsal horn. *Neuroscience* 141, 889–906.
- Plevkova, J., Antosiewicz, J., Varechova, S., Poliacsek, 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* 60, 89–93.
- Plevkova, J., Brozmanova, M., Pecova, R., Tatar, M., 2004a. Effects of intranasal capsaicin challenge on cough reflex in healthy human volunteers. *Journal of Physiology and Pharmacology* 55 (Suppl. 3), 101–106.
- Plevkova, J., Brozmanova, M., Pecova, R., Tatar, M., 2006. The effects of nasal histamine challenge on cough reflex in healthy volunteers. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 19, 120–127.
- Plevkova, J., Kollarik, M., Brozmanova, M., Revallo, M., Varechova, S., Tatar, M., 2004b. Modulation of experimentally-induced cough by stimulation of nasal mucosa in cats and guinea pigs. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 142, 225–235.
- Pratter, M.R., 2006. Chronic upper airway cough syndrome secondary to rhinosinus diseases (previously referred to as postnasal drip syndrome): ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 129, 635–715.
- Sant'Ambrogio, G., Widdicombe, J., 2001. Reflexes from airway rapidly adapting receptors. *Respiration Physiology* 125, 33–45.
- Sekizawa, S.I., Tsubone, H., 1994. Nasal receptors responding to noxious chemical irritants. *Respiration Physiology* 96, 37–48.
- Tatar, M., Plevkova, J., Brozmanova, M., Pecova, R., Kollarik, M., 2009. Mechanisms of the cough associated with rhinosinusitis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 22, 121–126.
- Taylor-Clark, T.E., Kollarik, M., MacGlashan Jr., D.W., Undem, B.J., 2005. Nasal sensory nerve populations responding to histamine and capsaicin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116, 1282–1288.
- Uzawa, O., Yayou, K., Tsubone, H., Sugano, S., 1995. Respiratory and circulatory reflexes in response to water stimuli applied to the nasal cavity in anesthetized rabbits. *Advances in Animal Cardiology* 28, 27–43.
- Varechova, S., Poussel, M., Demoulin, B., Chenuel, B., Schweitzer, C., Marchal, F., 2010. Within breath ventilatory responses to mechanical tracheal stimulation in anaesthetized rabbits. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 23, 397–402.
- Widdicombe, J., 2003. Functional morphology and physiology of pulmonary rapidly adapting receptors (RARs). *The Anatomical Record. Part A. Discoveries in Molecular Cellular Evolutionary Biology* 270, 2–10.
- Widdicombe, J., Fontana, G., 2006. Cough: what's in a name? *European Respiration Journal* 28, 10–15.
- Widdicombe, J., Tatar, M., Fontana, G., Hanacek, J., Davenport, P., Lavorini, F., Bolser, D., 2011. Workshop: tuning the 'cough center'. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 24, 344–352.

Abstracts

1 Which importance for P 450 Cytochromes in drug interactions? A study from the French Pharmacovigilance Database

AC Danton, A Sommet, G Durrieu, H Bagheri and JL Montastruc Service de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Toulouse, France

Objective: Cytochromes (CYPs) are a superfamily of isoenzymes involved in drug metabolism. The main isoenzymes are CYP 1A2, 2C9, 2D6 and 3A4. However, their relative importance in clinically significant interactions remains unknown. The aim of the present study was to investigate in the French Pharmacovigilance Database (FPVD) the number and characteristics of drug-drug interactions possibly explained by involvement of CYPs.

Methods: Spontaneous notifications of Adverse Drug Reactions (ADRs) recorded by Toulouse Midi-Pyrénées Pharmacovigilance Centre between 1st January and 31st August 2008 were extracted from the FPVD. For each observation, we recorded the main characteristics of patients (age, gender), involved drug(s) (name, pharmacological class and involved CYP) and induced ADRs (type, 'seriousness', evolution).

Results: Between 1st January and 31st August 2008, 1205 ADRs were registered by Toulouse Midi-Pyrénées Pharmacovigilance Centre into the FPVD. They involved 683 women (56.6%). In 12 cases, patients were less than 1 year old and in 14 cases, age was not informed. For other observations, mean age was 55.8 (median value: 58.0) years. Among these ADRs, 410 (34%) were 'serious' (including 24 fatal outcomes), 356 involved only one drug and 730 did not involve any drug interaction. Finally, 119 reports (i.e. 9.9% of registered ADRs) involved one (or more) drug interaction related to CYPs. Among these 119 notifications, the most frequently involved CYP was 3A4/5 ($n = 81$), followed by 2C19 ($n = 20$), 2C9 ($n = 16$), 2D6 ($n = 16$) and 2E1 ($n = 1$). In 13 notifications, several CYPs were involved. Drugs more frequently involved in this kind of drug interaction were amiodarone ($n = 21$) followed by proton pump inhibitors ($n = 11$), meprobamate ($n = 9$), antiretrovirals ($n = 9$) and rifampicine ($n = 6$). There was no major difference in 'seriousness' or evolution of ADRs between CYP-related interactions and others. In 22 cases, ADRs were possibly due to CYP-related drug interaction (18.5% of CYP-related drug interactions).

Conclusion: CYP-related drug interactions are found in around 10% of ADRs registered in the FPVD. The most frequently involved CYPs are 3A4/5 (68%) followed by 2C19 (17%). This CYP-involving interaction leads to clinically significant consequences (ADR) in almost one case out of five. These data underline the importance of CYPs not only in drug interactions but also in mechanisms of ADRs.

2 Interaction between orlistat and levothyroxine: a first French case report

A Châbléau^a, V De Mallmann^b, J Lambert^c, X Bodin^d, G Veyrac^e, P Jollie^f *Pole-biologie, pharmacologie clinique-Pharmacovigilance, CHU Nantes*; ^gCabinet d'endocrinologie Centre Erde Saint Augustin, Nantes; ^hCabinet médecine générale Lelasseur-Nantes, France

Background: Orlistat is the first gastro-intestinal lipase inhibitor marketed in the treatment of overweight and obesity. It acts by reducing fat hydrolysis, which leads to an increase in fat elimination in the feces. Although few drug-drug interactions are reported, this mechanism potentially modifies the digestive drug transfer. We report the first French case of an interaction between orlistat and levothyroxine revealed by a biological hypothyroidism.

Objectives: To analyze a suspected interaction between levothyroxine and orlistat.

Method: case report.

Result: A 43 years old woman with a medical history of thyroidectomy received a well-balanced substitutive treatment with levothyroxine for 6 years. The patient presented an overweight. A treatment with benfluorex failed and orlistat was started in the beginning of September 2007. She never presented malabsorption sign. Modification of TSH levels was gradually observed, requiring an increase in the levothyroxine dosage. Because of the lack of efficacy, orlistat was interrupted by the patient herself in May 2008. Afterwards, plasma TSH levels progressively returned to initial values allowing a slow decrease in levothyroxine dosage.

Discussion: Variable levothyroxine bioavailability is mainly linked to inter and intra individual differences in the absorption by the jejunum and by the ileum. A decrease in efficacy associated with changes in kinetic parameters due to food, malabsorption diseases and drug interactions was observed. Due to levothyroxine's long half-life and binding to the plasma thyroglobulin and prealbumin, the clinical effect of these variations is often delayed and only detected through the monitoring of hormone levels. Less than 1% of orlistat is absorbed and the two known inactive metabolites are rapidly excreted so as the parent drug. No common plasma protein binding site or metabolism pathways have been identified so far between orlistat and levothyroxine. The increased excretion of fat induced by orlistat is able to facilitate concomitant elimination of drugs. For our patient who maintained her meals intake and did not experience digestive disturbances, we suspect an excessive elimination of levothyroxine rather than a local physico-chemical inactivation or a genuine enzymatic interaction.

Conclusion: Because all drug interactions can't be detected before marketing authorization, close monitoring of patients receiving other drugs with low therapeutic range is necessary, even when the new medication seems to be safe, such as a self medication drug.

3 Intravenous coadministration of smooth muscle and endothelial progenitor cells enhances angiogenesis and cell proliferation in focal permanent cerebral ischemia in mice

L Ratiba nil^a, N Deroide^b, C Déan^b, B Lévy^b, G Tobelem^b, N Kubis^a *Unité INSERM 965, Paris, France*; ^cInstitut Vaissaux Sana, APHP Hôpital Lariboisière, Paris 7, France

Alter cerebral ischemia, neurogenesis is stimulated from the subventricular zone to the peri-infarct area. Moreover, angiogenesis inhibited by endostatin prevents neuroblasts migration and mice behavioral recovery.

We assessed whether therapy based on coadministration of smooth muscle progenitor cells (SMPCs) and endothelial progenitor cells (EPCs) isolated from human cord blood enhances angiogenesis and neurogenesis, in a murine model of focal permanent cerebral ischemia.

Ischemia was induced in adult male C57Bl6 mice by the thermocoagulation of the middle cerebral artery (MCA). SMPCs (0.5×10^6), EPCs (0.5×10^6), SMPCs + EPCs ($0.25 \times 10^6 + 0.25 \times 10^6$), PBS were intravenously administered 24 h post-MCA occlusion ($n = 6-8/\text{group}$). To assess proliferation, BrdU (100 mg/kg, i.p.) was injected 4 and 2 h before sacrifice on day 7 post-MCAo. Infarct volume was measured by histomorphological analysis of Cresyl Violet stained sections. Blood-brain barrier (BBB) permeability was quantified using Evans Blue extravasation. Vascular area, cell proliferation and phenotype were determined using co-immunostaining with antibodies against doublecortin, nestin, GFAP, laminin, CD31 and BrdU.

The vascular area in the infarct was significantly increased in all treated groups with SMPCs, EPCs or EPCs + SMPCs, in the same range, compared to controls ($+17.4\% \pm 8\%$, $+19.4\% \pm 5.2\%$ and $+17.3\% \pm 3.6\%$, respectively, $P < 0.05$). Phenotypical vascular differences were evidenced between groups. SMPCs-treated mice showed an immature disorganized and dilated vasculature, EPCs-treated mice showed more mature and numerous vessels. The number of co-labelled BrdU-CD31 positive cells was significantly increased in all treated groups, compared to PBS but more markedly for the EPCs- and SMPCs + EPCs co-treated mice: $14.7 \pm 1.2/\text{ROI}$ (controls), $22.7 \pm 1.5/\text{ROI}$ (SMPCs), $33.3 \pm 3.2/\text{ROI}$ (EPCs) and $35.0 \pm 1.4/\text{ROI}$ (SMPCs + EPCs) ($P < 0.002$), indicating angiogenesis in this area of intense remodelling. In addition, the number of peri-infarct BrdU-positive cells was higher only in the SMPCs+EPCs-treated group (3-fold) compared to the three other groups ($P < 0.002$), and were co-stained with GFAP cells.

Despite vascular remodelling, we found no significant difference in BBB permeability at day 7 or in the infarct volumes.

To conclude, co-administration of human cord blood smooth muscle and endothelial progenitor cells triggers vascular remodelling and angiogenesis in the infarct and intensive cell proliferation in cerebral ischemia in mice.

4 Imipramine, as potential TNF-alpha inhibitor, prevents cognitive decline and Aβ accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease

F Chavant, J Deguil, S Pain, I Ingrand, S Milin, B Fauconneau, M-C Pérault-Pochat, C Latay-Chebassier CHU de Poitiers, Service de Pharmacologie clinique, Poitiers, France

Background: Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia in the elderly, is a multifactorial pathology, characterized by cognitive deficits, increase in cerebral deposition of the β -amyloid (A β) peptide, neurofibrillary tangles and neurodegeneration. Studies currently support a central role of neuroinflammation, through production of proinflammatory cytokines including excess tumor necrosis factor α (TNF- α) in the pathogenesis of AD, especially in A β -induced cognitive deficits. Imipramine, a tricyclic antidepressant, has potent anti-inflammatory and neuroprotective effects.

Objectives: This study investigates the effect of imipramine on alterations of long-term and short-term memories, TNF- α expression and APP processing induced by intracerebroventricular injection of A β 25-35 in mice.

Methods: Male swiss mice aged 4-5 weeks received a single intracerebroventricular injection of aggregated A β 25-35 peptide at a dose of 9 nmol. Then, they were treated with imipramine (10 mg/kg, i.p. once a day for 13 days) from the day after the A β 25-35 injection. Memory function was evaluated in the water-maze (days 10-14) and Y-maze (day 9) tests. TNF- α levels and APP processing were examined in the frontal cortex and the hippocampus (day 14).

Results: Imipramine significantly prevented cognitive deficits of both long term and short term memories caused by A β 25-35 in the water-maze and Y-maze tests, respectively. These effects are associated with an inhibition of the TNF- α increase in the cortex frontal only. Moreover, the treatment with imipramine allowed to decrease the elevated levels of A β both in frontal cortex and hippocampus with different modulations of its precursor, the full-length amyloid protein precursor (APP), and the C-terminal fragments (CTFs) derived from APP processing.

Conclusion: So, imipramine prevents memory impairment in part through its intrinsic property to inhibit TNF- α and A β accumulation and may represent a potential candidate for AD treatment.

5 L-DOPA alters 5-HT neuronal activity in a rat model of Parkinson's disease: acute and long-term influences on DA transmission

S Navailles, C Gross, P De Deurwaerdere Université Bordeaux 2, Bordeaux, France

L-DOPA is the best therapy used in Parkinson's disease (PD), a motor disorder characterized by the progressive loss of nigrostriatal dopaminergic (DA) neurons. Although the ability of L-DOPA to restore the deficit in striatal DA transmission has been attributed to motor benefits, long-term medication with L-DOPA lead to aberrant DA signalling and the emergence of numerous side-effects. Because serotonergic (5-HT) neurons are known to release L-DOPA-induced DA and participate in the development of motor and psychiatric side-effects, we postulated that changes of efficacy of L-DOPA along medication may be linked to modifications of 5-HT neuronal activity. Therefore, we investigated the influence of acute and chronic treatment with L-DOPA on DA and 5-HT transmission in rats bearing a unilateral 6-hydroxydopamine lesion, a rat model of PD. By using intracerebral microdialysis in isoflurane-anesthetized rats, we monitored DA and 5-HT extracellular levels simultaneously in the striatum, the substantia nigra pars reticulata, the hippocampus and the prefrontal cortex, four brain regions receiving distinct 5-HT innervation, expressing DA receptors and involved in motor and cognitive functions. We showed that the acute administration of L-DOPA (3-6-12-100 mg/kg) dose-dependently increased DA extracellular levels but decreased 5-HT extracellular levels in all brain regions. The magnitude of DA and 5-HT effects of acute L-DOPA depends on the brain region considered, creating a new equilibrium of DA transmission in the parkinsonian brain. After a chronic administration of L-

that during swallow alone. The ThPh is one of several pharyngeal muscles that control the aperture of the pyriform sinus. Our results support modulation of the pyriform sinus by tracheal afferents. This effect could promote pooling of material ejected by coughing in the pyriform sinus in preparation for its removal from the pharynx by swallowing. Supported by NIH HL89104.

EXPIRATION REFLEX FROM THE VOCAL FOLDS IN GUINEA PIGS WITH EXPERIMENTAL ALLERGIC RHINITIS

J. Plevkova¹, I. Poljacek², M. Adamkov³, K. Svirlochova¹, J. Jakus², M. Tatar¹. ¹Department of Pathophysiology, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Comenius University in Bratislava, Sklabinska Str. 26, 036 01, MARTIN, Slovak Republic; ²Department of Medical Biophysics, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Comenius University in Bratislava, Sklabinska Str. 26, 036 01, MARTIN, Slovak Republic; ³Department of Histology and Embryology, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Comenius University in Bratislava, Sklabinska Str. 26, 036 01, MARTIN, Slovak Republic

The expiration reflex (ER) belongs to airway defensive reflexes. Cough and sneezing are especially up-regulated during the upper airway diseases, to enhance airway protection. The aim of this study was to assess the changes of ER during upper airway disorders, because ER had never been studied in such conditions before. ER was evaluated in guinea pigs with allergic rhinitis (AR) and guinea pigs with intranasal (i.n.) capsaicin challenge.

30 male guinea pigs sensitized to ovalbumin were used in the study. They were divided into 3 groups (each containing 10 animals) - AR group (i.n. ovalbumin), capsaicin group (i.n. capsaicin 50µM, 15µl), and controls without any i.n. challenge. All three groups underwent the same procedures. They were anaesthetized with urethane (1.1ml/kg), tracheotomized, and a metal cannula was introduced into the right hemithorax to assess interpleural pressure. ER was elicited by mechanical stimulation of the vocal folds using a thin nylon loop introduced into the airway via a tracheostomy. Evaluated parameters were maximal expiratory effort (MEE) of the ER and the count of post-ER coughs, because ER is usually followed by cough.

Mechanical stimulation of the vocal folds in controls consists mainly of isolated ER, followed by post-ER cough in 11% of provocations. In animals with AR and i.n. capsaicin the MEE during the ER was significantly higher than in controls (ANOVA, $p < 0.05$). In those two groups the ER was followed by post-ER-cough in 75% of provocations. The average count of post-ER coughs in order control/AR/capsaicin/ was (0-1 vs. 3-4 vs. 3-4, $p < 0.05$). The strength of ER in AR and capsaicin groups was significantly higher and ER was followed by more post-ER coughs. This up-regulation of ER could be explained by central neuronal mechanisms and by the spreading of inflammation from the upper airways to the larynx, which was verified by histology.

Supported by VEGA 1/0017/08, "Centre of experimental and clinical respirology", co- financed from EC sources.

MUTUAL INTERACTION OF AIRWAY REFLEXES – EFFECTS OF NASOPHARYNGEAL VS. TRACHEO-BRONCHIAL STIMULATIONS

I. Poljacek¹, J. Jakus¹, M. Simera¹, Z. Tomori². ¹Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Department of Medical Biophysics, Martin, Slovakia; ²Pf. Safarik University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Kosice, Slovakia

Mechanical nasopharyngeal stimulation eliciting the reflex spasmodic inspirations of aspiration reflexes (AspR) was performed simultaneously or sequentially with the mechanical probing of the tracheal-bronchial mucosa, resulting in repetitive coughing. The occurrence and the pattern of cough under the influence of AspRs or the subthreshold nasopharyngeal stimulation were examined on 22 spontaneously breathing pentobarbitone anesthetized cats (3.6±0.3 kg).

AspRs induced during the inspiratory period of cough superposed over the cough inspiration and resulted in an enhancement of peak inspiratory (by 63%; $P < 0.01$) and expiratory (by 38%; $P < 0.02$) oesophageal pressures, the amplitudes of electromyographic activities of the diaphragm (by 72%; $P < 0.01$) and abdominal muscles (by 44%; $P < 0.05$) during cough, and the

prolongation of the entire expiratory period (by 23%; $P < 0.01$), as well as the total cycle duration (by 17%; $P < 0.05$) of the cough.

Transient inhibitions and splits of cough expirations frequently occurred with AspRs being induced within the active cough expiratory period; however, the cough spatiotemporal characteristics were not altered significantly.

The tracheobronchial stimulation accomplished immediately after the sequence of several AspRs (17.2±2.4) evoked a lower number of coughs (4.17±1.02 compared with 5.52±1.45 in control; $P < 0.05$) with longer latency to the diaphragm activation (from 0.6±0.2 s to 2.1±0.5 s; $P < 0.02$) and to the first maximum of abdominal activity (from 2.1±0.4 s to 3.9±0.6 s; $P < 0.01$).

AspRs induced within the "inter-cough" periods (a motor quiescence between individual coughs; 3.3 AspRs per period) reduced cough number (by 50%; $P < 0.01$), shortened the cough-related abdominal activity (to 69%; $P < 0.02$), prolonged the "inter-cough" period (to 283%; $P < 0.02$), and the total cough cycle duration (to 163%; $P < 0.05$). Cough efforts occurred irregularly with very variable "inter-cough" periods and the total cough cycle durations under such conditions. However, in 3.2±0.8 occasions per 8.0±1.6 AspRs within these "quiescent periods" of cough expiration, the short lasting abrupt expulsions followed the AspRs with a delay of 110±6 ms ($p < 0.001$ compared with an overlapping of the diaphragm and abdominal muscles activities in cough = 430±70 ms). Parameters of post-AspR expulsions were markedly lower than those during the cough expiration (the duration of abdominal activation reached 27%; $p < 0.01$, the oesophageal pressure maximum 46%; $p < 0.05$, and the amplitude of abdominal muscles electromyographic moving average 47%; $p < 0.01$ of cough values, respectively).

Our results suggest that reflex spasmodic inspirations can be induced during coughing. The excitability and rhythmicity of mechanically-induced tracheal-bronchial coughing can be reduced by AspRs. AspRs induced during persisting post-stimulation coughs do not significantly reduce their number. The subthreshold nasopharyngeal stimulation failing to provoke AspR has no significant effect on coughing. Central mechanisms involving pulmonary stretch receptor stimulation may participate on modulation of the cough by AspR. The excitability of expiratory motor output seems to be generally increased during prolonged tracheal-bronchial stimulation. The cough motor pattern seems to be programmed and relatively temporally stable. A possible suppressive effect of spasmodic inspirations on chronic cough as well as the effects of other nasopharyngeal challenges on the cough remain to be tested.

This study was co-financed from VEGA 1/0038/09 (Prof. Jakus) and EC sources - European Regional Development Fund (CECR).

EFFECTS OF THE DIVING REFLEX STIMULATION ON THE VENTILATORY RESPONSE TO TRACHEAL IRRITATION IN ANAESTHETIZED RABBITS

M. Poussel, S. Varechova, B. Chenuel, C. Schweitzer, C. Beyaert, F. Marchal. EA3450-Laboratoire de Physiologie. Faculté de Médecine de Nancy- Nancy-Université, France

Introduction: The mechanisms involved in the defensive reflexes of the respiratory tract following a mechanical irritation are poorly understood. In particular, more knowledge is needed about the down-regulation of these reflexes. Since it has been shown that the pharyngo-laryngeal instillation of distilled water is able to elicit a wide spectrum of respiratory responses from cough or expiration reflex to apnoea with laryngospasm, we intended to clarify the role of these airway defensive responses themselves on the susceptibility of the tracheal mucosa to mechanical irritation.

Methods: Five anaesthetized rabbits, breathing spontaneously, were tracheostomized and intubated. Mechanical stimulation of the lower end of the trachea was performed using a rotating probe actuated by an electrical motor. Tracheal stimuli were applied right after instillation of distilled water or saline solution (sham-control) into the nasal and oral cavity. Respiratory flow, tidal volume (V_T) and heart rate (HR) were recorded and displayed to identify the different airways responses.

Results: Apnoea and bradycardia were elicited using distilled water in 4/5 rabbits, but not using saline. During apnoea, tracheal stimulation induced 4/26 (15%) expiration reflex or multiple defensive responses (ER + MDR) and 22/26 (85%) weak expiration reflex (wER). In controls, tracheal

RESUME

Contexte – La stimulation de la muqueuse trachéale peut provoquer une réponse défensive à type de toux. La finalité de cette réponse est la protection des voies aériennes via la clairance du mucus et des particules déposées au sein de l'arbre trachéo-bronchique. La stimulation de la muqueuse nasale est à l'origine de réponses défensives n'incluant toutefois pas la toux. La modulation de la toux suggère de possibles interactions centrales des afférences provenant de localisations anatomiques distinctes.

Objectif – Déterminer si une stimulation trachéale mécanique discriminante est capable de provoquer une toux lors d'une apnée provoquée par l'instillation nasale d'eau distillée.

Méthodes – Douze lapins anesthésiés et trachéotomisés ont été étudiés. Les stimulations trachéales mécaniques ont été réalisées dans 3 conditions : contrôle, après instillation nasale de sérum physiologique, et lors d'apnée suite à l'instillation d'eau distillée.

Résultats – Les paramètres ventilatoires de références ne sont pas différents dans les 3 conditions. Un total de 171 stimulations trachéales a été réalisé. Lors de l'apnée, 81% des réponses sont des réflexes expiratoires et le pic de débit expiré est inférieur ($p < 0.0001$) à celui observé dans les conditions contrôle et sérum physiologique. L'incidence des réponses comprenant un réflexe de toux est plus faible ($p < 0,0001$) en cas d'instillation d'eau distillée que dans les 2 autres conditions.

Conclusion – La stimulation nasale par l'eau distillée désensibilise les réflexes de défense respiratoire faisant suite à une stimulation trachéale mécanique.

MOTS CLEFS : Toux; Réflexe expiratoire; Stimulation mécanique; Trachée; Stimulation nasale.

ABSTRACT

Context - Cough may be triggered by irritation of afferents located in the airway mucosa. Primary role is to expel inhaled foreign matter from the lungs or clear the airways of endogenous mucus. Stimulation of the nasal mucosa provokes defensive responses but not cough. The 'cough center' can be tuned by various afferent inputs, suggesting possible interactions at a central level of neural pathways originating from distant anatomical sites.

Objective - The present study was designed to determine whether brief mechanical stimulation of the trachea could trigger cough during apnoea elicited by nasal instillation of water.

Method - Twelve anesthetized, tracheotomized rabbits were studied. Mechanical stimulation of the trachea was performed under 3 conditions: baseline control, after instillation of saline into the nose and during apnoea following instillation of water.

Results - Baseline breathing pattern did not differ between the 3 conditions. In a series of 171 stimulations, expiration reflex occurred in 81% of stimulations during apnoea with a significantly ($p < 0.0001$) lower peak expiratory flow than at baseline or during saline instillation. The incidence of responses comprising a cough reflex was also lower during water instillation than at either baseline or with saline ($p < 0.0001$).

Conclusion - These results indicate that stimulation of nasal afferents with distilled water likely down-regulates cough.

KEY WORDS: Cough; Expiration reflex; Mechanical stimulation; Trachea; Nasal stimulation.