



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENTS-SANTE**

Ecole doctorale n°554

Environnements-Santé

Doctorat d'épidémiologie

Par

Madame DIVARET-CHAUVEAU Amandine

La toux en dehors d'une infection chez l'enfant : trajectoires au cours des dix premières années de vie, association avec les maladies allergiques et rôle de l'environnement périnatal

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 05 Avril 2023

Composition du Jury :

Madame Giovannini-Chami Lisa
Monsieur Guillemainault Laurent
Monsieur Schweitzer Cyril
Monsieur Deschildre Antoine
Madame de Lauzon-Guillain Blandine
Monsieur Mauny Frédéric
Madame Demoulin-Alexikova Silvia

PU-PH, Université Côte d'Azur
PU-PH, Université de Toulouse III
PU-PH, Université de Lorraine
Professeur associé, Université de Lille
DR, Université Paris Cité
PU-PH, Université de Franche-Comté
MCU-PH, Université de Lille

Rapporteuse
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinatrice
Directeur de thèse
Codirectrice de thèse



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENTS-SANTE**

Ecole doctorale n°554

Environnements-Santé

Doctorat d'épidémiologie

Par

Madame DIVARET-CHAUVEAU Amandine

La toux en dehors d'une infection chez l'enfant : trajectoires au cours des dix premières années de vie, association avec les maladies allergiques et rôle de l'environnement périnatal

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 05 Avril 2023

Composition du Jury :

Madame Giovannini-Chami Lisa
Monsieur Guillemainault Laurent
Monsieur Schweitzer Cyril
Monsieur Deschildre Antoine
Madame de Lauzon-Guillain Blandine
Monsieur Mauny Frédéric
Madame Demoulin-Alexikova Silvia

PU-PH, Université Côte d'Azur
PU-PH, Université de Toulouse III
PU-PH, Université de Lorraine
Professeur associé, Université de Lille
DR, Université Paris Cité
PU-PH, Université de Franche-Comté
MCU-PH, Université de Lille

Rapporteuse
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinatrice
Directeur de thèse
Codirectrice de thèse

Résumé

La toux est un symptôme respiratoire fréquent et non spécifique chez l'enfant, habituellement présent uniquement durant une infection aiguë des voies respiratoires. Cependant, certains enfants présentent une toux par excès de sensibilité se manifestant par des épisodes de toux fréquents ou récurrents, en dehors d'une infection, et des facteurs déclenchants habituellement non tussigènes. Bien qu'un des mécanismes étiologiques de cette hypersensibilité soit l'atopie, très peu d'études se sont intéressées à la relation entre trajectoires de toux dans l'enfance et maladies allergiques ainsi qu'à leur association avec l'environnement précoce.

Afin d'identifier les trajectoires de toux dans l'enfance, d'analyser leur relation avec les maladies allergiques et avec l'environnement précoce, le travail de cette thèse a porté sur deux volets complémentaires : un volet épidémiologique observationnel chez l'enfant et un volet expérimental chez le lapin. Le volet épidémiologique reposait sur l'analyse des données de la cohorte prospective européenne PASTURE (Protection against Allergy: STUdy in Rural Environment). Parmi les 961 enfants inclus dans l'étude épidémiologique, une analyse en classes latentes a permis d'identifier cinq trajectoires de toux en dehors d'une infection : peu ou pas de symptômes (59,9 %), transitoire aiguë (24,1 %), transitoire modérée (6,8 %), persistante à début tardif (4,8 %), et persistante à début précoce (4,4 %). En comparaison avec la trajectoire peu ou pas de symptômes, les autres trajectoires étaient significativement associées avec les sibilants, l'asthme et la rhinite allergique. La trajectoire persistante à début précoce avait la plus forte association pour l'asthme et était inversement associée à l'environnement fermier. L'allergie alimentaire était associée aux deux trajectoires persistantes. La sensibilisation atopique était associée uniquement à la toux persistante à début tardif. La consommation de lait de ferme bouilli durant la première année de vie était la seule exposition spécifique à l'environnement fermier significativement associée à une diminution du risque de toux persistante à début précoce et de toux transitoire aiguë. Des infections respiratoires répétées ou prolongées dans la première année de vie étaient significativement associées à un risque plus élevé de toux persistante à début précoce. Le volet expérimental a permis d'évaluer l'impact de l'exposition périnatale à la poussière de ferme sur la sensibilité tussigène et la réactivité bronchique chez un modèle de lapin d'inflammation bronchique d'origine allergique. Un environnement spécifique a été appliqué aux lapines gestantes et à leurs lapereaux jusqu'à la sixième semaine de vie (zone exempte d'agent pathogène pour le groupe contrôle ; étable de veaux pour le groupe ferme). Les lapereaux étaient ensuite hébergés dans une zone conventionnelle de l'animalerie et sensibilisés à l'ovalbumine par voie intrapéritonéale. La sensibilité à la toux a été évaluée par la stimulation mécanique de la toux et la réactivité bronchique par un test à la méthacholine. Nous n'avons pas retrouvé d'effet de l'exposition précoce à une étable de veaux sur la sensibilité tussigène ni la réactivité bronchique.

Nos résultats suggèrent un lien étroit entre toux persistante et pathologies atopiques ainsi que l'existence de potentiels facteurs de prévention communs. Les enfants présentant une toux persistante ou récurrente devraient être orientés vers un médecin allergologue pour qu'une évaluation allergologique complète soit réalisée. Les études de prévention des pathologies atopiques devraient également s'intéresser aux symptômes de toux en dehors d'une infection afin d'évaluer la pertinence de développer des stratégies de prévention communes.

Abstract

Cough is a frequent and non-specific respiratory symptom in children. In the majority of otherwise healthy children, cough is a symptom related to a self-limiting viral upper respiratory tract infection. However, some children have cough hypersensitivity that manifests as frequent or recurrent coughs, without a respiratory infection, and triggered by normally innocuous stimuli. Although atopy is one of the etiological mechanisms of this hypersensitivity, few studies have explored the relationship between cough trajectories in children and allergic diseases, as well as their association with early environment. In order to identify trajectories of cough in childhood, to analyse their relationship with allergic diseases and with early environment, the thesis work consisted of two complementary parts: an epidemiological observational part in children and an experimental part in rabbit. The epidemiological part was based on analysis of data from the prospective European birth cohort PASTURE (Protection against Allergy: STUdy in Rural Environment). Among the 961 children included in the epidemiological study, a latent class analysis allowed to identify five trajectories of cough without a cold: never or infrequent (59.9%), acute transient (24.1%), moderate transient (6.8%), late persistent (4.8%) and early persistent (4.4%). Compared with the never/infrequent trajectory, the other trajectories were significantly associated with wheezing, asthma and allergic rhinitis. Early persistent trajectory had the strongest association with asthma and was inversely associated with farm environment. Food allergy was associated with both persistent trajectories. Atopic sensitisation was only associated with the late persistent trajectory. Consumption of boiled farm milk during the first year of life was the only farm-specific exposure significantly associated with a decreased risk of early persistent cough and acute transient cough. Repeated or prolonged respiratory tract infections during the first year of life was associated with a higher risk of early persistent cough. The experimental part allowed to evaluate the impact of perinatal exposure to farm dust on cough sensitivity and airway responsiveness in an allergic airway inflammation rabbit model. A specific environment has been applied to pregnant rabbits and their offspring until six weeks after birth (pathogen-free zone for the control group, calf barn for the farm group). Rabbit pups were then housed in a conventional zone and sensitised to ovalbumin by intraperitoneal route. Cough sensitivity was assessed by mechanical stimulation of cough and airway responsiveness by a methacholine challenge. We did not find any effect of early exposure to the calf barn on cough sensitivity or bronchial reactivity.

Our results suggest 1/ a close link between persistent cough and atopic diseases and 2/ the existence of potential common preventive factors. Children having persistent or recurrent cough should be referred to an allergist for a complete allergy assessment. Prevention studies for atopic diseases should also explore symptoms of cough without a cold in order to evaluate the relevance of developing common prevention strategies.

A Jean-Charles, mon « papa » de la recherche,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à profondément remercier Jean-Charles Dalphin, à qui je dédie cette thèse. Merci à toi de m'avoir initiée à la recherche clinique, de m'avoir ouvert les portes du consortium PASTURE, de m'avoir fait confiance, d'avoir su me pousser, de m'avoir encadrée toutes ces années... Ton départ brutal et inattendu nous a tous ébranlé. Je ressens encore ton absence aujourd'hui. Quand je me questionne, il m'arrive souvent de penser à ce que tu me répondrais si tu étais encore là.

Merci à Frédéric Mauny d'avoir accepté de reprendre la direction de mon travail de thèse et d'avoir su se rendre disponible. Avec une doctorante à distance, occupée à temps plein par ses activités hospitalo-universitaires, la tâche n'était pas simple !

Merci à Silvia Demoulin-Alexikova pour m'avoir encadrée depuis la conception du projet jusqu'à sa finalisation. Un grand merci à toi pour avoir cru en ce projet original d'amener les lapins de laboratoire à la ferme et pour avoir su trouver des solutions d'hébergement à la ferme à proximité, à défaut de pouvoir héberger les lapins dans une ferme PATURE ! Merci pour ton engagement et ton implication dans les expérimentations animales et la rédaction de cette thèse.

Merci à Jocelyne Just et François Chabot, membres du comité scientifique de suivi de la thèse, pour leurs précieux conseils tout au long de la rédaction de cette thèse.

Merci à Bruno Demoulin, Cédric Garcia et Laurent Foucaud pour toute leur implication dans les expérimentations animales, à la ferme comme à l'animalerie ! Je vous suis sincèrement reconnaissante pour tout le temps que vous avez accordé à ce projet.

Merci à Alexandre Laflotte et à toute l'équipe de la ferme de la Bouzule pour avoir accueilli notre projet expérimental à bras ouvert et avec enthousiasme.

Merci à Pauline Loison, Lise Alonso et Xavier Simon pour avoir accepté de réaliser les prélèvements de poussière sur le site de la ferme de la Bouzule.

Un grand merci à Pierre Le Cann pour avoir répondu positivement à ma proposition de collaboration. Merci pour ta patience lors de l'établissement de la convention... et pour ta relecture pertinente de l'article sur les expérimentations animales.

Merci à Karine Adel-Patient pour son aide précieuse dans la réflexion des échantillons biologiques à prélever lors des expérimentations animales, du travail de laboratoire à conduire et des partenaires potentiels à solliciter. Tes compétences et expériences en immuno-allergologie sont précieuses et j'ai toujours beaucoup de plaisir à échanger avec toi.

Merci à David Moulin et à Fatouma Salem pour m'avoir donné accès à la plateforme IMoPA et m'avoir patiemment appris à isoler les PMBC. Merci à Marcelo De Carvalho Bittencourt pour sa collaboration dans l'analyse des échantillons biologiques.

Merci à toute l'équipe française PATURE et à l'équipe de la MSA, pour avoir permis la réalisation de cet immense travail sur la cohorte française. Un grand merci à Vincent Kaulek et Dominique-Angèle Vuitton pour m'avoir soutenue de mon arrivée dans l'étude PATURE en 2010 jusqu'à aujourd'hui et pour avoir partagé de bons moments lors des réunions PATURE ! Et bien sûr un immense merci à Marie-Laure Dalphin, avec qui tout a débuté. C'est toi qui as suscité mon intérêt pour l'allergologie lors d'un cours que tu nous as donné quand j'étais interne, toi qui m'as emmenée dans la salle de bibliothèque du service de pneumologie pour une réunion PATURE, pour que Jean-Charles me propose un sujet de thèse d'exercice. Merci pour ton implication dans l'étude PATURE du tout début jusqu'à la dernière visite clinique, pour toute l'ardeur que tu as mise pour que la cohorte française poursuive sa participation, pour tes conseils et tes encouragements.

Merci à Virginie Westeel-Kaulek et Erika Von Mutius pour m'avoir encouragée à reprendre le rôle d'investigateur principal de la cohorte PASTURE suite au décès de Jean-Charles et un grand merci à Lucie Laurent, Ophélie Ritter et Pauline Roux-Claudé pour avoir accepté de me suivre dans la poursuite des travaux PATURE. Merci à Cindy Barnig pour son aide depuis son arrivée au CHU de Besançon.

Merci à toute l'équipe européenne PASTURE et tout particulièrement à Caroline Roduit. Merci Caroline pour ton soutien, ton écoute, tes conseils et ta fidèle amitié. J'ai toujours grand plaisir à te retrouver au détour d'un congrès !

Merci à Sophie Nicklaus pour m'avoir associée à son travail sur la consommation de fromages dans l'étude PASTURE et m'avoir présenté Blandine. Merci pour tous les beaux projets que tu mènes, tes sujets de recherche sont passionnants, j'admire sincèrement ton travail.

Merci à Blandine de Lauzon-Guillain pour m'avoir ouvert les portes des cohortes EDEN et ELFE mais aussi de celles du comité de Nutrition Humaine de l'ANSES. Que de belles expériences et opportunités ! Tes travaux sur les déterminants de la santé de l'enfant sont impressionnants. Merci pour tes précieux conseils durant cette thèse et bien sûr pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Merci à Antoine Deschildre pour sa fidèle amitié depuis cette drôle de CICBAA TV ! Merci pour ta constante bonne humeur, ton soutien, tes encouragements et tes conseils. Je suis heureuse que tu aies accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Merci à Lisa Giovannini-Chami et à Laurent Guilleminault d'avoir accepté le rôle de rapporteur pour cette thèse.

Un immense merci à Cyril Schweitzer. Merci pour ton soutien sans faille et ta confiance depuis mon arrivée au CHRU de Nancy, il y a bientôt 10 ans maintenant. Merci de m'encourager et m'aiguiller dans ma carrière hospitalo-universitaire. Merci pour tout ce que tu fais pour l'Hôpital d'Enfants. Merci d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Un grand merci à mes collègues de l'unité d'allergologie pédiatrique pour avoir fait tourner le service pendant la rédaction de cette thèse. Merci pour votre motivation, votre curiosité, votre enthousiasme pour l'allergologie, c'est un vrai plaisir de travailler avec une telle équipe médicale et paramédicale !

Un grand merci aussi à l'équipe de séniorisation des secteurs de pédiatrie générale du service de Médecine Infantile (Aurore, Aurélie, Caroline et Marjorie). Merci pour votre bonne humeur, votre aide et votre compréhension tout au long de ce long chemin de thèse.

Merci à mes parents et mes beaux-parents pour leur soutien et plus particulièrement pour leur aide précieuse sur les dernières semaines de la rédaction de cette thèse. Mention spéciale à mon papa et sa permanente disponibilité pour toute assistante technique !

Merci à ma sœur, avec qui j'aime partager mes rires et mes larmes. Merci pour ton soutien et pour ce lien solide que nous avons tissé avec le temps.

Et enfin, j'ai gardé le meilleur pour la fin ! Merci infiniment à ma petite famille.

A Grégoire, mon roc. Merci pour ton soutien quotidien qu'il vente ou qu'il pleuve, pour tes encouragements à suivre et poursuivre mes ambitions, pour ta confiance et ton admiration. Quel bonheur de t'avoir à mes côtés ! Quelle chance de nous être trouvés !

A Ernest, mon magnifique et extraordinaire petit garçon qui m'épate de jour en jour. Te voir grandir a été une véritable motivation à mener ce travail de thèse jusqu'au bout. Tes sourires, tes câlins et tes belles paroles m'apportent beaucoup de joie au quotidien.

Table des matières

Introduction	8
1. Epidémiologie de la toux et des maladies allergiques	9
2. Trajectoires.....	13
3. Physiologie et physiopathologie de la toux, de l'hyperréactivité bronchique et des maladies allergiques	16
4. Rôle de l'environnement	22
5. Objectifs.....	28
Méthodologie	29
1. Partie épidémiologique	30
1.1 La cohorte PASTURE (Protection against Allergy: STUdy in Rural Environments)	30
1.2 La toux dans la cohorte	36
1.3 Les maladies allergiques et la sensibilisation atopique.....	38
1.4 Les sibilants et l'atopie parentale.....	40
1.5 L'environnement périnatal dans la cohorte PASTURE	40
1.6 Les analyses statistiques.....	41
2. Partie expérimentale	43
2.1 Le modèle animal d'hyperréactivité bronchique d'origine allergique	43
2.2 L'environnement spécifique.....	44
2.3 Les expérimentations animales.....	54
2.4 Les analyses statistiques.....	67
2.5 Le financement	67
Résultats	68
1. Trajectoires de toux en dehors d'une infection dans l'enfance et associations avec les maladies allergiques.....	69
2. Exposition précoce à la poussière de ferme chez un modèle de lapin d'inflammation bronchique d'origine allergique : cela affecte-t-il l'hyperréactivité bronchique et tussigène ?.....	73
3. Environnement précoce et trajectoires de toux en dehors d'une infection dans la cohorte européenne de naissance PASTURE.....	76
Discussion	79
1. Synthèse	80
2. Discussion	81
2.1 L'identification des trajectoires de toux : approche méthodologique non supervisée	81
2.2 Le rôle de l'environnement fermier	84
2.3 Le rôle de l'environnement non fermier	90
3. Poursuite des travaux et perspectives	92
4. Conclusion	96
Bibliographie.....	97

Introduction

1. Epidémiologie de la toux et des maladies allergiques

La toux est un symptôme fréquent et aspécifique. D'un point de vue physiologique, il s'agit d'un réflexe protecteur vital qui permet de prévenir l'inhalation et d'assurer la liberté des voies aériennes. En pratique clinique, la toux est un symptôme présent, dans la majorité des cas, uniquement durant une infection aigüe des voies respiratoires avec une disparition dans les deux à quatre semaines suivant l'infection (1). Cependant, des patients ayant des épisodes de toux non associés à une infection des voies respiratoires avec une toux fréquente ou récurrente, parfois déclenchée par des facteurs qui ne provoquent habituellement pas la toux (changement de température, effort, allergène, excitation...) sont fréquemment rencontrés en pratique clinique. Ce type de toux suggère une toux par excès de sensibilité, pouvant considérablement affecter la qualité de vie (2,3).

Une étude récente recensant les consultations pour toux aux Etats Unis entre 2001 et 2020 évaluait la prévalence de la toux à 4,9 % avec une présentation initiale avant l'âge de 10 ans dans un tiers des cas (4). Environ 40 % de ces patients avaient consulté deux fois ou plus pour le même motif durant la période d'étude.

Au sein de la cohorte suisse SPAC (Swiss Paediatric Airway Cohort), 48 % des enfants et adolescents ayant recours à un médecin pour un symptôme respiratoire récurrent présentait une toux nocturne en dehors d'une infection (5). Aux Etats Unis, la moitié des enfants âgés de 3 ans recevait des médicaments en vente libre et deux-tiers de ces médicaments étaient des anti-tussifs, ce qui représenterait un recours aux médicaments anti-tussifs par plus de 35 % de la population d'étude (6). Ces résultats suggèrent une prévalence élevée de la toux chez l'enfant d'âge préscolaire.

Dans la cohorte de Leicestershire au Royaume-Uni, les parents étaient interrogés sur les symptômes de toux de leur enfant entre 1 et 18 ans : 10 % des enfants toussaient plus que les autres enfants, 69 % toussaient habituellement dans un contexte d'infection concomitante, 34 à 55 % toussaient en dehors

d'une infection et 25 % présentaient une toux nocturne (7). La toux avec une infection, la toux nocturne et la toux déclenchée par le rire variaient peu avec l'âge tandis que la toux en dehors d'une infection, la toux déclenchée par l'exercice, les acariens ou les pollens devenait plus fréquente avec l'âge. La toux était plus fréquente chez les garçons durant les dix premières années de vie, cette tendance s'inversait après l'âge de 14 ans.

Dans le contexte d'une infection des voies respiratoires, on observe un excès de sensibilité tussigène physiologique. La persistance de cet excès de sensibilité en dehors d'une infection est pathologique. La durée d'évolution de la toux permet donc d'évaluer s'il s'agit d'une toux aiguë d'origine virale, d'une toux subaiguë d'origine le plus souvent post-virale ou d'une toux chronique. La toux chronique est habituellement définie par la durée de la toux : 8 semaines chez l'adulte (8), 4 semaines chez l'enfant (9). Cependant, alors que certains patients toussent quotidiennement depuis des années, d'autres ont des épisodes de toux récurrents avec des périodes d'accalmie. Les dernières recommandations européennes proposent donc que le diagnostic de la toux chronique soit basé sur une évaluation clinique globale prenant en compte tous les autres aspects de la toux et non uniquement la durée (10). La toux chronique chez l'enfant diffère en de nombreux points de la toux chronique de l'adulte du fait d'une différence de morphologie des voies aériennes, d'un plus haut degré de vulnérabilité aux agents nocifs, d'un contrôle réduit du réflexe de toux et de différences de maturation du système nerveux et immunitaire aux différents âges (11).

Chez l'adulte, la prévalence globale de la toux chronique serait de 9,6 % avec des variations géographiques allant de 2,3 % en Afrique à 18,1 % en Océanie (12). Les études retrouvent une prépondérance féminine et un pic de prévalence entre 50 et 60 ans. Chez l'enfant, la prévalence de la toux chronique varierait entre 1 % en Inde (13), 9 % en Europe de l'Est (14) et 7 % en Chine (15) avec une augmentation dans les zones fortement polluées (16).

En dehors de la durée, l'évaluation de la toux nécessite un interrogatoire minutieux pour décrire les caractéristiques de la toux : sèche ou grasse ou atypique (aboyante, en quintes, comme un klaxon, en

staccato), associée ou non à une infection, survenant la nuit, après les repas, déclenchée par des stimuli habituellement non tussigènes... ainsi que pour rechercher d'éventuels symptômes associés (17). Après un examen clinique ciblé, une radiographie thoracique est indispensable suivie d'une spirométrie dès que l'âge de l'enfant le permet. Une évaluation de l'environnement de l'enfant sera également nécessaire : exposition tabagique, autres polluants, activité, retentissement... En l'absence d'anomalie, il est recommandé de réévaluer l'enfant 2 semaines plus tard pour éliminer une toux post-virale. En cas de persistance de la toux, il sera conclu à une toux persistante avec possibilité de surveillance simple ou d'essai d'une thérapie, en premier lieu un corticoïde inhalé (18).

Bien que la toux en dehors d'une infection ne soit pas synonyme d'asthme, les symptômes de toux sont fréquents chez les enfants ayant de l'asthme. Dans la cohorte de Leicestershire, tous les symptômes de toux étaient plus fréquents chez les enfants ayant des sibilants (7). Le rapport du GINA (Global Initiative for Asthma) précise qu'une toux isolée sans autre symptôme respiratoire est rarement due à un asthme (19). En cas d'asthme, la toux est habituellement accompagnée d'épisodes de sibilants et de gêne respiratoire. Cependant, une toux nocturne ou une toux déclenchée par l'exercice, le rire ou les pleurs, en l'absence d'infection respiratoire apparente supporte un diagnostic d'asthme.

Dans la cohorte de Tucson, une toux chronique vers l'âge de 3-4 ans était associée à un risque 5 fois plus élevé de diagnostic d'asthme entre 5 et 11 ans, avec une force d'association similaire à celles des sibilants en dehors d'une infection (20). Toux et asthme sont donc fortement intriqués.

Par ailleurs, les résultats de la cohorte de naissance PARIS (Pollution and Asthma Risk: an Infant Study) ont mis en évidence deux phénotypes respiratoires entre 1 et 3 ans : un phénotype « toux » et un phénotype « dyspnée ». Le phénotype « toux » présentait plus de symptômes atopiques (eczéma, réactions alimentaires, rhinite en dehors d'une infection) que le phénotype « dyspnée » qui était dominé par les infections (21). Le phénotype « toux » était également associé à un antécédent d'allergie chez les deux parents. Des analyses ultérieures dans cette même cohorte ont montré qu'une

toux sèche nocturne survenant à l'âge de 4 ans était significativement associée à l'atopie (élévation des IgE totales, sensibilisation aux pneumallergènes, rhinite allergique et eczéma).

Ces résultats suggèrent donc une association entre toux et maladies allergiques sans avoir mis en évidence la cause de cette association. Plusieurs hypothèses, développées dans le chapitre « Physiologie et physiopathologie de la toux, de l'hyperréactivité bronchique et des maladies allergiques », peuvent être avancées : physiopathologie commune entre la toux par excès de sensibilité et l'hypersensibilité allergique, facteurs de prédisposition ou facteurs de risques communs...

La prévalence des pathologies allergiques serait actuellement de 30 à 40%, selon les pays considérés. La constante augmentation observée dans les pays industrialisés depuis plus de 40 ans a fait l'objet de nombreuses études. En revanche, la prévalence de la toux et son évolution dans le temps a fait l'objet d'un plus faible nombre d'études, a fortiori chez l'enfant.

Les pathologies allergiques sont l'asthme, l'eczéma, la rhino-conjonctivite allergique et les allergies alimentaires. La sensibilisation atopique, détectée par la réalisation des prick-tests cutanés ou par le dosage des IgE spécifiques, est également souvent étudiée pour évaluer l'atopie. Les modifications environnementales sont connues pour être en partie responsable de l'augmentation de leur prévalence.

Dans la cohorte européenne PASTURE (Protection against Allergy : STUdy in Rural Environments) ayant inclus des enfants dans les années 2000, 17,5 % des enfants présentaient au moins une pathologie allergique à l'âge de 10 ans (4,8 % d'asthme, 8,5 % de rhino-conjonctivite, 1,2 % d'allergies alimentaires et 8,1 % d'eczéma) et plus de 20 % avaient une sensibilisation atopique (22).

Dans la cohorte française ELFE (Etude Longitudinale dans l'Enfance), ayant inclus des enfants nés en 2011, 39,3 % des enfants avaient de l'eczéma, 10 % avaient de l'asthme et 5,9% avaient une allergie alimentaire entre l'âge de 1 et 5,5 ans. Les maladies allergiques coexistaient fréquemment et la prévalence de l'allergie alimentaire était deux fois plus importante en cas d'atopie parentale (23).

La toux, la rhinite, l'asthme et l'atopie se développent plus ou moins tôt dans l'enfance et co-existent fréquemment. L'évaluation de la santé respiratoire doit donc tenir compte de tous ces symptômes. Il est primordial d'améliorer les connaissances sur la prévalence de la toux, son évolution dans le temps et son association avec les maladies allergiques afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents et les déterminants de son développement.

L'analyse des symptômes de toux sous la forme de trajectoires est tout à fait adaptée à la description de l'évolution de ces symptômes dans le temps.

2. Trajectoires

L'histoire naturelle des troubles respiratoires et allergiques fait l'objet d'un nombre croissant d'études s'intéressant aux trajectoires ou phénotypes, c'est-à-dire à l'évolution de ces troubles au cours de la vie. L'analyse de ces trajectoires peut se faire par deux approches méthodologiques différentes : l'approche classique avec des trajectoires définies a priori par l'investigateur (par exemple : « jamais/peu fréquent », « début précoce », « début tardif », « persistant ») et une approche plus récente non supervisée à l'aide de méthodes d'analyse en classes latentes ou en clusters permettant de définir des groupes d'individus homogènes pour leurs caractéristiques cliniques et/ou biologiques (24).

La première approche est donc investigateur-dépendante et se focalise sur l'évolution dans le temps d'un indicateur de santé respiratoire et non d'une association particulière d'indicateurs aux différents âges.

La deuxième approche permet de déterminer le nombre et le profil de différents groupes de trajectoires sans faire d'hypothèse a priori sur les groupes qui seront constitués. L'analyse en classes latentes ou en clusters est donc choisie par un nombre croissant d'investigateurs pour dégager différentes trajectoires ou phénotypes de santé respiratoire durant l'enfance (25).

Quelle que soit la méthodologie utilisée pour analyser ces trajectoires, la plupart des études se sont intéressées à l'asthme (26,27), plus rarement à la rhinite et à la sensibilisation atopique (28). Les différents symptômes d'allergie sont pris en compte dans le modèle pour dégager des trajectoires de pathologies respiratoires et/ou allergiques mais rares sont les études ayant inclus les symptômes de toux dans ces analyses (29,30).

A notre connaissance, seules deux cohortes se sont intéressées aux trajectoires de toux dans l'enfance : la cohorte de Leicestershire, cohorte de 1650 enfants recrutés au Royaume-Uni en 1990 à un âge préscolaire, avec prise en compte des symptômes de sibilants (29,31) et la cohorte PARIS, cohorte de naissance française en région parisienne, avec focalisation sur les symptômes de toux sèche nocturne (32).

La première cohorte a utilisé une méthode d'analyses en classes latentes à partir des symptômes de sibilants et de toux rapportés par les parents, de sensibilisation, fonction respiratoire et réactivité bronchique sur les deux premiers suivis chez 319 enfants ayant rapporté au moins une fois soit des sibilants soit une toux en dehors d'une infection (29). Les auteurs ont mis en évidence cinq phénotypes : deux phénotypes de toux (persistant et transitoire) et trois phénotypes de sibilants (persistant avec atopie, persistant sans atopie, transitoire viral). Parmi les phénotypes de toux, le phénotype de toux persistant était représenté par des enfants ayant eu une toux en dehors d'une infection aux deux suivis. Les sibilants étaient plus fréquents dans le phénotype de toux persistant que dans le phénotype de toux transitoire mais nettement moins fréquent que dans les phénotypes de sibilants. Le phénotype de sibilant persistant avec atopie semblait être plus sévère que le phénotype de sibilant persistant sans atopie avec des attaques de sibilants plus fréquentes et une altération de la fonction respiratoire et de la réactivité bronchique par rapport aux sujets asymptomatiques. Dans cette cohorte, on note l'analyse des symptômes respiratoires portant seulement sur deux suivis, avec une fenêtre d'âge au moment des suivis de 5 ans. La prévalence de sibilants observée au suivi ultérieur 5 ans plus tard a été comparée entre les cinq phénotypes. Lors de ce suivi ultérieur, la prévalence de

sibilants la plus élevée était retrouvée dans le phénotype de sibilants persistant avec atopie, suivi par le phénotype de sibilants persistant sans atopie suivi par le phénotype de toux persistant. Ces analyses ont été répliquées dans une cohorte indépendante, à Rutland au Royaume-Uni, de 903 enfants d'âge préscolaire ayant rapporté au moins une fois soit des sibilants soit une toux en dehors d'une infection sur les deux premiers suivis (31). Seuls les phénotypes de sibilants persistant avec atopie et de sibilants transitoire viral ont été retrouvés comme très similaires entre les deux cohortes. Le phénotype le plus sévère et le phénotype le plus léger sont donc retrouvés dans les deux cohortes ; seuls les trois phénotypes « intermédiaires » diffèrent. Dans la cohorte de validation, les phénotypes de toux et de sibilants persistant sans atopie étaient remplacés par des phénotypes de toux et de sibilants survenant à l'âge scolaire (sans symptôme à l'âge préscolaire) avec une augmentation de la réactivité bronchique. Les auteurs concluent que ces différences pourraient être expliquées par les différences d'âge au moment des suivis mais aussi par des différences dans l'évaluation des symptômes nocturnes et saisonniers.

La cohorte de PARIS a quant à elle évalué les trajectoires de toux sèche nocturne chez 1869 enfants d'âge préscolaire avec des suivis annuels entre 1 et 4 ans (32). Dans cette cohorte, trois trajectoires ont été identifiées à l'aide d'une méthode de clustering (k-means) : une trajectoire avec des symptômes inexistantes ou peu fréquents, une trajectoire transitoire avec des symptômes de toux à l'âge d'un an mais plus de symptômes à l'âge de 4 ans et une trajectoire « tardive » avec des symptômes survenant à l'âge de 4 ans. Cette trajectoire « tardive » était significativement associée à l'atopie avec des taux d'IgE totales significativement plus élevés, significativement plus de sensibilisation aux pneumallergènes à l'âge de 18 mois, et significativement plus de diagnostics médicaux de rhinite allergique et d'eczéma à l'âge de 4 ans. Dans cette cohorte, on note la modélisation des trajectoires de toux uniquement à partir des symptômes de toux sèche nocturne sur quatre suivis, tous réalisés en âge préscolaire.

Les données de la littérature sur les trajectoires de toux dans l'enfance restent donc limitées avec, la plupart du temps, l'utilisation d'une ou deux questions sur la toux, essentiellement à l'âge préscolaire. Il est donc nécessaire de poursuivre l'exploration de l'histoire naturelle de la toux dans l'enfance par l'approche des trajectoires en prenant en compte différentes caractéristiques de la toux sur une plus longue période.

3. Physiologie et physiopathologie de la toux, de l'hyperréactivité bronchique et des maladies allergiques

La toux est un acte moteur comprenant trois phases : une phase inspiratoire avec un effort d'inspiration, une phase compressive avec un effort expiratoire forcée à glotte fermée suivie d'une phase expulsive avec l'ouverture de la glotte et une expiration rapide (33).

Le réflexe de toux est un réflexe du tronc cérébral, déclenché par activation des neurones afférents par divers stimuli mécaniques ou chimiques. Les fibres nerveuses afférentes sont adaptées pour détecter les changements de leur environnement physique et chimique grâce à l'expression des canaux ioniques spécifiques sur leur membrane cellulaire (34). Ces neurones cheminent dans le nerf vague qui innerve le larynx, la trachée et les voies respiratoires et transmettent l'information sensorielle vers un réseau central de la toux qui traite et réorganise l'information sensorielle primaire en une sortie motrice complexe pour générer la toux. Les neurones de second ordre situés dans le noyau du tractus solitaire (NTS) sont la première cible synaptique au niveau du système nerveux central (35). Lorsque l'information afférente est jugée conforme au déclenchement du réflexe de toux, l'information est relayée jusqu'aux motoneurones des muscles respiratoires qui transmettent l'ordre de production de l'acte moteur de la toux (36–38).

L'avancée la plus récente dans le domaine est la description de l'implication des régions cérébrales d'ordre supérieur dans la toux. Ces régions contribuent probablement à la sensation d'irritation des

voies respiratoires qui conduit à la modulation comportementale de la toux (39). Cette sensation est connue comme « l'envie de tousser », un symptôme commun à de nombreuses maladies pulmonaires, permettant aux patients de prendre conscience de leur fonction pulmonaire et d'engager à leur tour des processus conscients et cognitifs capables de favoriser ou de supprimer la toux (40,41). Bien qu'une toux réflexe puisse être présente chez les patients atteints de maladies respiratoires (par exemple en cas d'hypersécrétion de mucus), les sensations persistantes provenant du larynx peuvent contribuer à une toux volontaire ou comportementale. Par conséquent, la toux dans un contexte de maladie se situe sur un spectre allant du purement réflexif au purement volontaire (42).

Le réflexe de toux se développe avec l'âge. Il n'y a pas de données sur la présence de la toux chez le fœtus humain (43). A la naissance, la toux semble être absente ou rarement présente dans le cadre du chémoréflexe laryngé (44). Au cours de la maturation, la toux en réponse à une stimulation par contact liquide avec la muqueuse laryngée augmente (45,46). La toux est décrite avant l'âge d'un mois chez les nouveau-nés atteints d'une infection des voies respiratoires ou par inhalation de corps étranger (47,48). Il semble néanmoins que la maturation du système laryngé soit le composant primordial du réflexe de toux (43). Ainsi, les enfants de moins de 5 ans ont un risque augmenté d'inhalation de corps étranger (arachide, fruits à coques, petits jouets...), en partie dû à l'immaturité laryngée à protéger les voies aériennes de l'inhalation. Par ailleurs, la maturation des voies aériennes, des muscles respiratoires, de la cage thoracique, des réflexes respiratoires et du contrôle de la respiration évolue dans le temps, influençant sur les pathologies respiratoires et les symptômes de toux (11). Bien qu'il n'existe pas de preuve directe d'une plus grande plasticité des voies neuronales de la toux chez l'enfant par rapport à l'adulte, la plus grande plasticité du système neurologique de l'enfant suggère une plus grande plasticité du réflexe de toux (49). Chez l'enfant en bonne santé, la sensibilité du réflexe de toux est influencée par l'âge et par le calibre des voies aériennes (50). Enfin, les enfants sont plus vulnérables que les adultes aux effets des toxiques et de l'environnement (51,52). Plasticité cérébrale et sensibilité accrue du jeune enfant sont deux éléments bien soulignés

par l'importance de l'environnement des 1000 premiers jours de vie, fenêtre d'opportunité pour prévenir de nombreuses pathologies (53).

Par ces mécanismes de plasticité des voies neuronales, les différents processus pathologiques peuvent affecter les voies neurales responsables de la toux à la fois pour les activer (induisant la toux réflexe) et les rendre plus sensibles via leur activation par des stimuli de faible intensité (induisant un excès de sensibilité). Cette plasticité neuronale en lien avec le réflexe de toux a fait l'objet de nombreuses études ces 20 dernières années (35,54,55). Elle peut être mise en place par différents mécanismes : un changement du phénotype des nerfs afférents, une modulation de la libération des principaux neurotransmetteurs, qui déterminent l'excitabilité synaptique, un changement dans les récepteurs aux neurotransmetteurs ou neuromodulateurs, ou un changement de fonction ou d'expression des canaux ioniques contrôlant l'excitabilité neuronale (Figure 1).

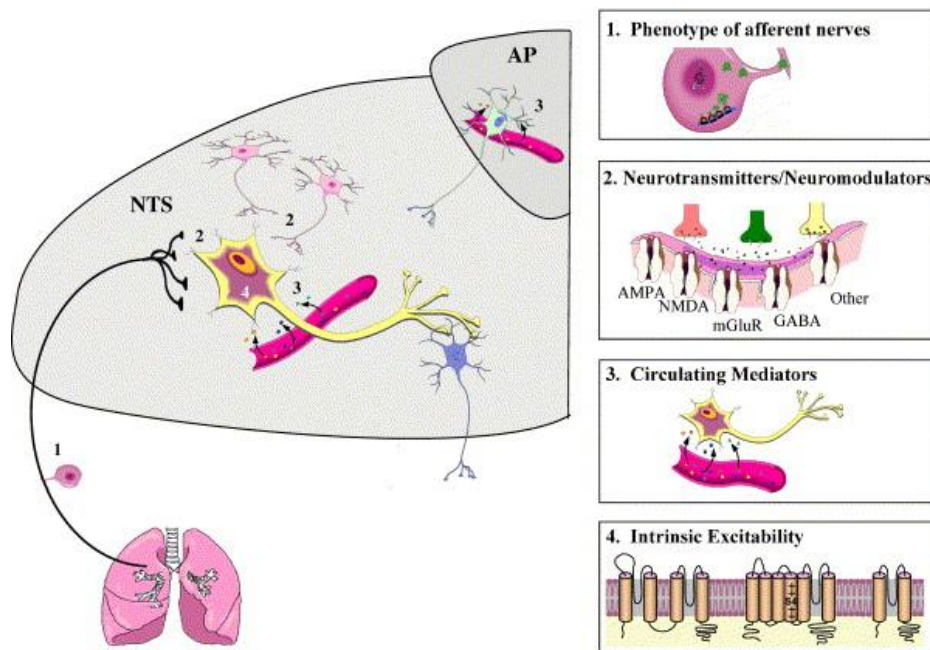


Figure 1 : Cible de la plasticité au niveau du noyau tractus solitarii (NTS). Figure issue de l'article de Bonham et al. (35).

Tous ces mécanismes de plasticité cérébrale peuvent être une réponse à une agression (infection des voies aériennes supérieures, exposition au tabac, inflammation, exposition aux allergènes) et peuvent être influencés par de nombreux phénomènes. La sensibilité du réflexe de toux est donc un

état dynamique sous l'influence de nombreux facteurs exogènes et endogènes (56). L'exemple le plus évident est l'excès de sensibilité du réflexe de toux au cours d'une infection des voies respiratoires supérieures (57). Cet excès de sensibilité persiste pendant une période de temps variable, de l'ordre de 2 à 3 semaines après le début de l'infection, suivi d'un retour à l'état initial de la sensibilité du réflexe de toux (58,59) (Figure 2).

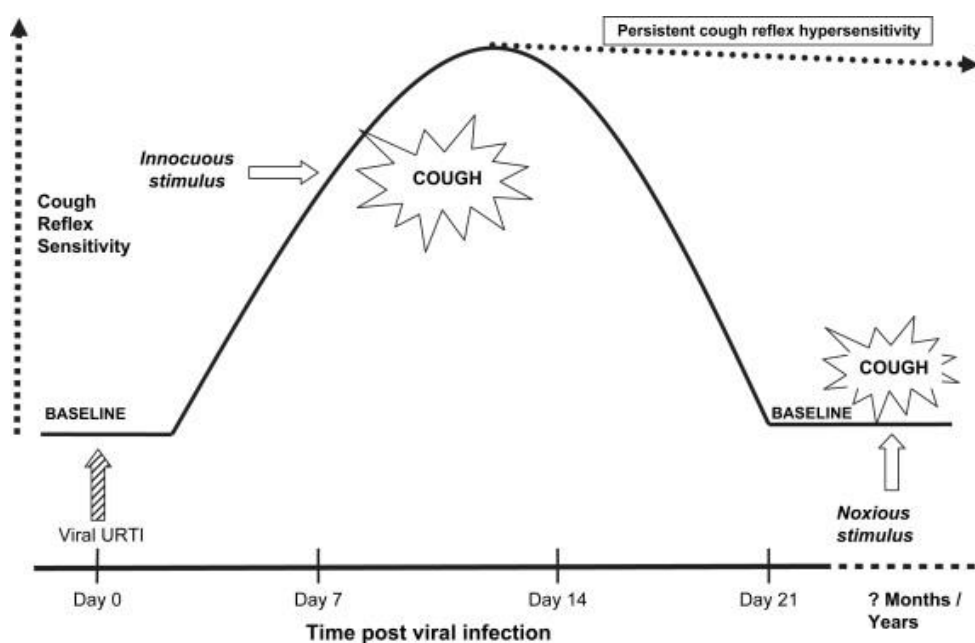


Figure 2 : Schéma des changements de sensibilité du réflexe de toux dans les suites d'une infection virale des voies respiratoires. Figure issue de l'article de Mc Garvey et al. (56)

En dehors de l'infection virale, l'excès de sensibilité du réflexe de toux a été fréquemment décrit chez les patients présentant une toux chronique, associée à des processus pathologiques hétérogènes. De ces constatations, le concept de syndrome de toux chronique par excès de sensibilité est né il y a environ 10 ans. Il est défini par une toux pathologique souvent déclenchée par de faibles niveaux d'exposition mécanique, chimique ou thermique. Les personnes présentant ce syndrome ont donc un excès de sensibilité des voies neuronales, avec des seuils tussigènes faibles. Chez l'humain, il peut être mis en évidence par des tests de provocation de la toux avec des agents chimiques tels que la capsaïcine ou l'acide citrique (60). Chez l'animal anesthésié (cochon d'Inde ou lapin), la stimulation mécanique au niveau de la trachée est également utilisée pour explorer ce phénomène d'excès de

sensibilité (54). Cette augmentation de la sensibilité à des stimuli habituellement non tussigènes est comparable à l'augmentation de la sensibilité à la douleur dans les syndromes d'hyperalgésie comme l'allodynie. L'excitabilité des nerfs afférents est, dans les deux cas, augmentée par la présence des médiateurs inflammatoires. Cet excès de sensibilité peut aussi être le résultat d'une augmentation de la transmission synaptique au niveau de système nerveux central, notamment via la neurokinine. Ces similarités entre douleur et toux chronique suggèrent une origine neuropathique de la toux chronique inexplicée ou réfractaire. De plus, l'association de la toux avec plusieurs syndromes génétiques impliquant le système nerveux autonome (tels que le syndrome de Holmes-Adie ou le syndrome CANVAS) suggère l'existence d'une prédisposition génétique. Une étude récente a mis en évidence une prévalence élevée d'expansion répétée du gène RFC1 chez des adultes atteints de toux chronique réfractaire (61). Cette anomalie génétique serait significativement associée à la présence de facteurs déclenchants tels que la poussière, la fumée ou les aliments ainsi qu'à un début plus précoce de la toux. Bien que la caractérisation du syndrome de toux par excès de sensibilité permette d'expliquer la toux chronique chez un grand nombre de patients, il n'existe pas à ce jour de test validé pour en faire le diagnostic (62). Le rôle de cette mutation génétique dans la toux durant l'enfance reste à explorer. Par ailleurs, il existe différentes présentations de cette toux par excès de sensibilité et un tel excès de sensibilité peut également exister dans le cadre de diverses pathologies respiratoires. L'atopie et l'inflammation de type Th2 sont considérés comme étant un des mécanismes étiologiques de ce syndrome de toux par excès de sensibilité (10).

Une hypersensibilité similaire est aussi décrite dans l'asthme avec la présence d'une hyperréactivité bronchique, qui se définit comme une propension exagérée à la bronchoconstriction en présence de certains stimuli habituellement non nocifs (effort, excitation, rire, air froid...). L'asthme, et l'hyperréactivité bronchique qui y est associée, ont fait l'objet d'un nombre d'études bien plus élevés que l'hyperréactivité tussigène et il est à l'heure actuelle bien établi qu'il existe une grande hétérogénéité de profils clinico-biologiques d'asthme et que de nombreux facteurs peuvent influencer l'évolution de la maladie (reflux gastro-oesophagien, rhino-sinusite chronique, allergies,

activité physique...) (63). Dans le cadre de l'hyperréactivité bronchique, deux grandes composantes sont impliquées : une composante persistante, associée à des changements structurels voire un remodelage des voies aériennes (épaississement de la membrane basale, hypertrophie de la musculature lisse...) et une composante variable associée aux événements inflammatoires (allergènes, infections...) (64). L'hyperréactivité bronchique peut être mesurée par des tests de provocation directs (test à la méthacholine ou à l'histamine) ou par des tests de provocation indirects (épreuve d'effort, hyperpnée volontaire, NaCl hypertonique, mannitol). Une réponse positive à un test de provocation direct reflète les changements persistants des voies aériennes alors que la réponse aux tests indirects reflète un état d'inflammation (65). Un test à la méthacholine peut donc rester positif alors que l'asthme est contrôlé.

Plus récemment, quelques études se sont intéressées au rôle du système nerveux dans la modulation de l'inflammation de type Th2. Au-delà de la production d'IgE et de l'inflammation générée par l'activation des mastocytes et le recrutement des éosinophiles dans les tissus en cas de pathologie atopique, on retrouve également la présence d'une dérégulation de la réponse sensorielle entraînant des réflexes pathologiques. Prurit chronique dans la dermatite atopique, irritation des voies aériennes, bronchoconstriction et toux dans l'asthme, inconfort et dysfonction œsophagienne dans l'œsophagite à éosinophiles, hypersensibilité olfactive et dégoût dans les allergies alimentaires, hennage et éternuement récurrent dans la rhinite allergique (66). Les réactions allergiques sont d'ailleurs aussi appelées réactions d'hypersensibilité. Les médiateurs libérés par les mastocytes et les autres cellules inflammatoires ou résidentes au cours d'une réaction allergique peuvent non seulement activer directement les fibres nerveuses afférentes, mais aussi causer des altérations du fonctionnement des neurones afférents, des neurones du système nerveux central ainsi que des neurones présents dans les ganglions autonomes (68). Il existerait donc une interaction entre le système immunitaire et le système nerveux sensoriel dans l'atopie (67).

Ces similarités physiopathologiques entre pathologies atopiques et excès de sensibilité du réflexe de toux suggèrent que les pathologies atopiques et la toux, en dehors d'une infection, pourraient avoir des facteurs de risque et donc des facteurs protecteurs communs.

4. Rôle de l'environnement

L'augmentation importante de la prévalence des maladies allergiques depuis la fin des années 80 dans les pays développés a conduit à étudier les facteurs environnementaux qui pourraient être en cause. L'hypothèse de l'hygiène (69), plus récemment appelée hypothèse du microbiote (70) ou encore hypothèse de biodiversité (71), explique cette augmentation progressive par nos modes de vie modernes et notamment par la diminution de la biodiversité d'exposition microbiologique en période périnatale, entraînant un déséquilibre microbien et une perturbation de la réponse immunitaire (72).

Ces constats ont été précisés par les études épidémiologiques prospectives, particulièrement par la cohorte européenne de nouveaux-nés PATURE (Protection contre l'Allergie : éTUde du milieu Rural et de son Environnement), mise en place au début des années 2000 (73). Les principaux résultats ont été résumés dans un communiqué récent à l'Académie Nationale de Médecine (74). Cette cohorte a montré, outre la protection conférée par le fait de naître dans une ferme de production laitière, le rôle préventif joué par l'exposition aux poussières de ferme et aux microorganismes notamment, ainsi que par une diversification alimentaire précoce au cours des premiers mois de vie et une alimentation riche en produits laitiers et en fromages (75) (76) (77) (78).

L'observation des populations Amish et Huttérites a permis de mettre en évidence que la richesse microbienne de l'environnement fermier permet de diminuer le risque d'allergies. En effet, ces deux populations ont une même identité génétique et un mode de vie similaire en termes d'alimentation, d'activité physique, de taille de fratrie, de faible exposition à la pollution mais la prévalence des allergies est cinq fois plus fréquente chez les Huttérites, qui ont un mode d'agriculture très moderne

(79). Des études chez la souris ont montré que l'exposition par voie intranasale à des poussières extraites des maisons de population Amish, ayant un mode d'agriculture traditionnel diminuait le risque d'asthme. Les expositions environnementales et les modifications du microbiote qui en découlent sont un des moyens de prévention qui permettraient de réduire le risque de pathologies atopiques en lien avec une activation du système Th2 et surtout de réduire le risque d'évolution chronique de ces pathologies atopiques avec persistance des symptômes à l'âge adulte (80). Les expositions environnementales liées au passage séquentiel des microbes de la mère à l'enfant impactant le développement immunitaire et la santé de l'enfant sont bien résumés dans la revue de la littérature de Johnson et Ownby (70) (Figure 3). Que ce soit pendant la grossesse ou en postnatal précoce, le régime alimentaire, l'origine ethnique, l'obésité maternelle, les antibiotiques, l'exposition tabagique, l'exposition aux animaux domestiques ou de la ferme influencerait le microbiote et le développement du système immunitaire avec ainsi un impact démontré sur les pathologies allergiques, l'asthme, le diabète de type 1 et les gastro-entérites et une suspicion d'influence sur les maladies inflammatoires du tube digestif et l'obésité.

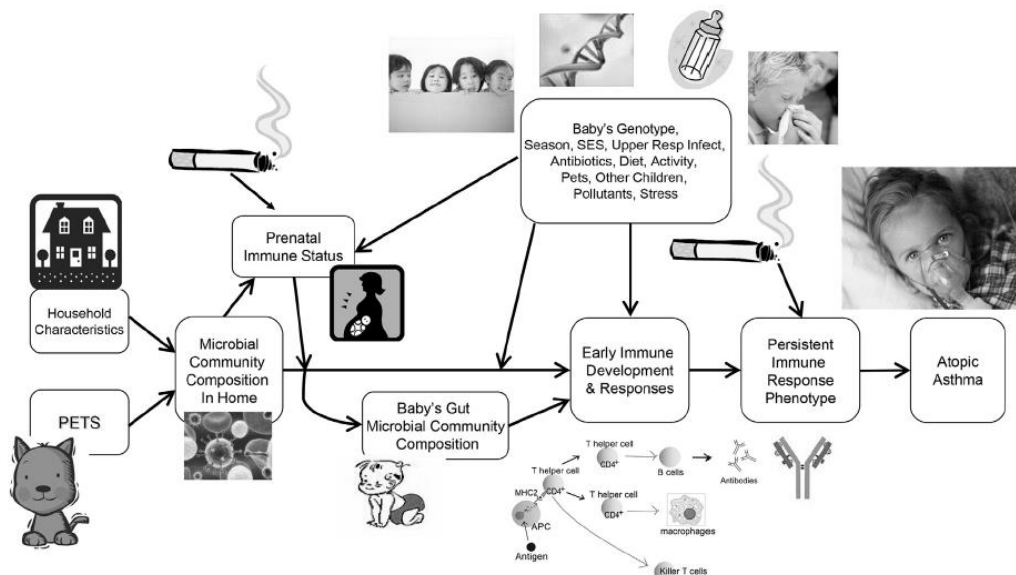


Figure 3 : Voie causale reliant l'environnement, le microbiote intestinal et l'asthme atopique et allergie pédiatrique. Figure issue de l'article de Johnson et Ownby (70).

C'est sur la base de l'hypothèse de biodiversité que la Finlande a développé un programme de prévention des allergies sur 10 ans (81). La prévention primaire consistait à supporter l'allaitement maternel et l'introduction des aliments solides à partir de 4-6 mois, ne pas éviter l'exposition aux allergènes à moins qu'une allergie soit prouvée, augmenter le contact avec l'environnement naturel, réserver la prescription antibiotique seulement aux cas nécessaires, promouvoir la consommation de produits fermentés et éviter l'exposition tabagique. En quelques années, ces mesures ont permis une diminution de la prévalence des régimes d'éviction alimentaire, des rhinites allergiques, de l'asthme et de la dermatite de contact.

Les études évaluant le rôle de l'environnement sur le développement de la toux sont plus rares que celles ayant évalué le rôle de l'environnement sur le développement des maladies allergiques et concernent principalement trois domaines : le contact avec les animaux, l'environnement tabagique et les polluants de l'air intérieur. Par ailleurs, la plupart des études ont évalué les symptômes de toux et l'environnement dans la même période de temps, souvent en période d'âge scolaire plutôt que l'impact de l'environnement précoce, périnatal, sur le développement de symptômes de toux plus tard dans l'enfance.

Concernant la présence d'animaux au domicile, une étude polonaise portant sur plus de 18 000 individus a montré un effet protecteur de la présence d'un chien au domicile sur les pathologies atopiques et la toux en zone rurale tandis qu'en zone urbaine, la présence d'un animal domestique était un facteur de risque de développer une toux et des sibilants (82). Il est important de noter que le fait d'avoir un chien au domicile était associé à un plus grand espace de vie mais aussi au nombre de cigarettes fumées par la mère. Une analyse poolée des données de 11 cohortes de naissance européennes a conclu à l'absence d'effet de l'exposition précoce aux animaux domestiques sur l'asthme et les allergies (83). Dans la cohorte européenne PASTURE, l'exposition prénatale à une plus grande diversité d'animaux était significativement associée à une diminution du risque de dermatite atopique chez l'enfant (84). Une revue systématique portant sur les facteurs de risque d'asthme au

sein de l'environnement intérieur conclut à l'absence de preuves suffisantes pour recommander l'éviction des animaux et des acariens comme mesures préventives contre l'asthme et les allergies (85).

Le rôle de l'exposition tabagique sur le développement de la toux a été plus largement étudié. Le tabagisme maternel a un effet plus important que le tabagisme paternel sur la prévalence de symptômes de toux et de sibilants. Cependant, l'effet du tabagisme paternel seul est tout de même significatif et la prévalence des symptômes de sibilants et de toux augmente avec le nombre de parents fumeurs (86). Alors que le tabagisme passif dans l'enfance est connu pour être associé aux symptômes de toux (87) et d'asthme (88), une revue systématique portant sur des études ayant analysé les facteurs de risques de trajectoires de sibilants a mis en évidence que les facteurs de risque connus de sibilants comme la durée d'allaitement courte, l'exposition tabagique et la garde en crèche n'étaient pas spécifiques d'une trajectoire et avaient des effets variables en population à haut risque par rapport à la population générale (89). Une étude portant spécifiquement sur l'association entre la sensibilité au réflexe de toux et l'environnement tabagique ainsi que l'environnement urbain versus rural sur 290 enfants avaient montré une sensibilité significativement plus importante en cas d'environnement tabagique uniquement chez les filles et en cas d'environnement urbain uniquement chez les filles d'âge scolaire (52). Ces résultats suggèrent un impact différent de l'environnement tabagique et urbain en fonction de l'âge et du sexe.

La Cohorte PELAGIE (90) ayant recruté 3323 couples mères-enfants au début des années 2000 a évalué l'impact de l'environnement intérieur sur les quatre phénotypes respiratoires et allergiques identifiés sur les données de sibilants, eczéma, toux et rhinite de 935 enfants à l'âge de 2 et 6 ans: toux transitoire, eczéma/toux, sibilants/toux et mixte. Le tabagisme maternel à l'inclusion était positivement associé au phénotype sibilants/toux mais l'environnement tabagique au domicile depuis la naissance (défini par la consommation d'au moins 1 cigarette par jour au domicile) ne l'était pas. L'utilisation de colle pour rénover le domicile avant l'âge de 2 ans était associée au phénotype

sibilants/toux et l'utilisation de peinture acrylique ou glycérophtalique était associée au phénotype mixte. Une ancienneté du matelas de l'enfant de plus de 3 ans était négativement associée au phénotype sibilants/toux. La présence d'animaux au domicile, l'aération de la chambre, le temps passé dans des pièces nettoyées à l'eau de javel ainsi que le mode de chauffage n'étaient pas associés aux différents phénotypes. L'analyse de l'impact de l'environnement intérieur est complexe car de nombreux agents peuvent être impliqués et il est possible que les effets soient combinés comme le suggère une étude ayant analysé la pollution de l'air intérieur par des clusters prenant en compte le mode de chauffage, le mode d'éclairage, le mode de cuisson pour la cuisine, la ventilation, la proximité des enfants par rapport aux sources d'émission (91).

Dans la cohorte PARIS, la crèche durant les six premiers mois, le tabagisme maternel durant la grossesse, les parquets fraîchement vernis ou la peinture dans la chambre de l'enfant durant les quatre premières années de vie et de nouveaux meubles en panneaux de particules dans le salon à la naissance de l'enfant étaient significativement associés au phénotype de sibilants transitoires (30). Le phénotype toux/rhinite était quant à lui significativement associé à l'utilisation d'antibiotique par la mère durant le premier trimestre de grossesse et la présence de moisissures visibles dans la maison à la naissance de l'enfant. Un chat au domicile dont la présence était autorisée dans la chambre de l'enfant à la naissance était négativement associé au phénotype toux/rhinite.

Ces données en milieu urbain ne sont pas nécessairement transposables en milieu rural car il semble exister une interaction entre l'environnement externe spécifique (tabac, régime, polluants...) et l'environnement externe non spécifique (climat, environnement urbain, espaces verts...), regroupé sous le terme d'exposome externe (92) (Figure 4). Des interactions gènes-environnement (93) pourraient être responsables d'une modification du génome entraînant des modifications de l'exposome interne.

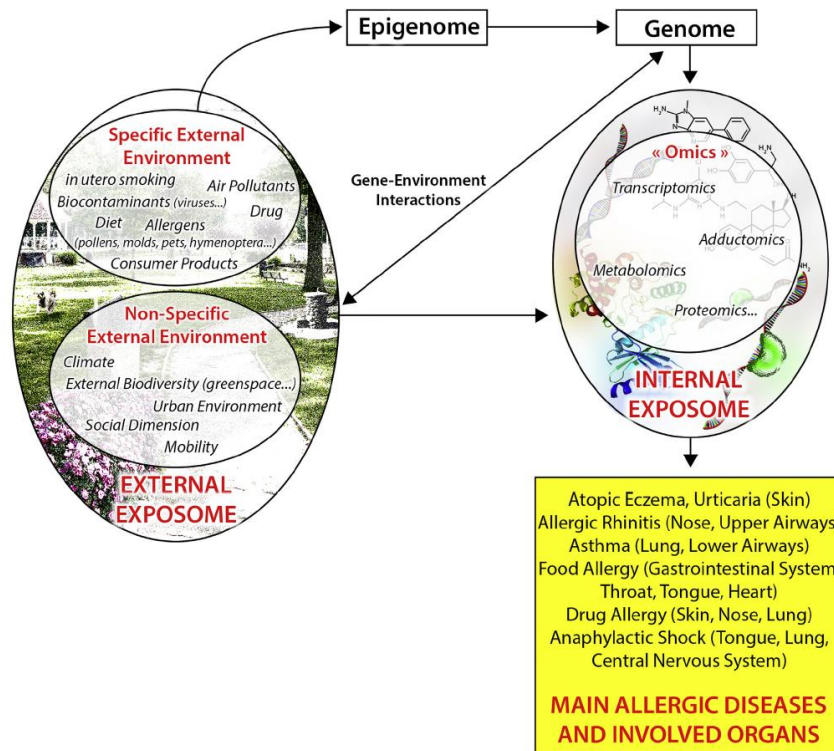


Figure 4 : Implication de l'exposome dans les allergies. Figure issue de l'article de Cecchi et al. (92)

Avec l'hypothèse de similarités physiopathologiques entre pathologies atopiques et excès de sensibilité tussigène, nous pouvons émettre l'hypothèse que parmi tous les facteurs de l'environnement périnatal étudiés pour évaluer les déterminants de l'asthme et des pathologies allergiques, certains pourraient également être des déterminants du développement de la toux. Certains en tant qu'irritant (exposition tabagique et exposition au chauffage au bois par exemple) avec une augmentation du risque de toux persistante, d'autres en tant que garant de la biodiversité d'exposition (allaitement maternel, exposition aux animaux domestiques et de la ferme...) avec une diminution du risque de toux persistante dans l'hypothèse d'un lien entre développement immunitaire, atopie et toux. L'étude de tels facteurs pourrait permettre à terme de développer des stratégies de prévention primaire pour éviter l'évolution vers une toux récurrente, persistante voire chronique.

5. Objectifs

Les objectifs de cette thèse étaient :

- De décrire les différentes trajectoires de toux en dehors d'une infection chez l'enfant entre l'âge de 1 et 10 ans dans une cohorte non sélectionnée pour son risque atopique ;
- D'évaluer l'association de ces différentes trajectoires de toux en dehors d'une infection chez l'enfant avec les maladies allergiques et la sensibilisation atopique ;
- D'évaluer l'effet de l'exposition précoce à la poussière de ferme sur les réflexes de toux et la réactivité bronchique sur un modèle animal d'hyperréactivité bronchique d'origine allergique ;
- D'évaluer l'association entre l'environnement périnatal spécifique à la ferme et non spécifique et les différentes trajectoires de toux en dehors d'une infection.

Méthodologie

1. Partie épidémiologique

1.1 La cohorte PASTURE (Protection against Allergy: STUdy in Rural Environments)

Il s'agit d'une étude prospective européenne de suivi d'une cohorte de nouveau-nés vivant en milieu rural, fondée sur l'hypothèse de l'influence de l'environnement fermier sur la protection contre la sensibilisation atopique et/ou les manifestations cliniques d'allergie (73). L'objectif de l'étude PASTURE était d'évaluer les facteurs de protection des maladies allergiques, spécifiques à l'environnement fermier de production laitière bovine. Cinq pays européens ont participé : l'Allemagne, l'Autriche, la Suisse, la Finlande et la France.

a. La population

Les familles ont été recrutées lors du troisième trimestre de grossesse dans des régions rurales d'élevage (localités de moins de 5000 habitants) des 5 pays (Bavière en Allemagne, Tyrol en Autriche, Région de Kuoppio en Finlande, Franche-Comté en France, et Cantons ruraux du sud de Zurich en Suisse), de façon à avoir dans chaque pays une cohorte régionale de 200 enfants à la naissance, dont 100 de familles vivant dans une ferme d'élevage bovin de production laitière ('fermiers') et 100 de familles vivant dans le même environnement rural mais pas dans une ferme ('non-fermiers').

- **Critères d'inclusion :**

Les femmes « vivant à la ferme » étaient définies comme toute femme vivant dans une ferme consacrée à l'élevage bovin de production laitière. Les femmes « ne vivant pas à la ferme » étaient définies comme toute femme vivant dans les mêmes zones rurales, accouchant dans les mêmes hôpitaux et cliniques mais ne vivant pas dans une ferme.

- **Critères d'exclusion :**

- les grossesses gémellaires ou multiples ;
- les enfants nés prématurés (avant la 37^{ème} semaine d'aménorrhées) ou nés à domicile ;

- les enfants dont un frère ou une sœur est déjà inclus dans l'étude ;
- les familles vivant en milieu urbain, c'est-à-dire habitant dans une ville de plus de 5000 habitants ;
- les familles sans téléphone, les familles susceptibles de quitter la région, les mères âgées de moins de 18 ans et les familles, dont la connaissance de la langue était considérée comme insuffisante, afin de faciliter le suivi ;
- les enfants présentant des anomalies génétiques sévères à la naissance.

Au total, 1133 enfants ont été inclus dans l'étude PASTURE.

b. Le recueil de données

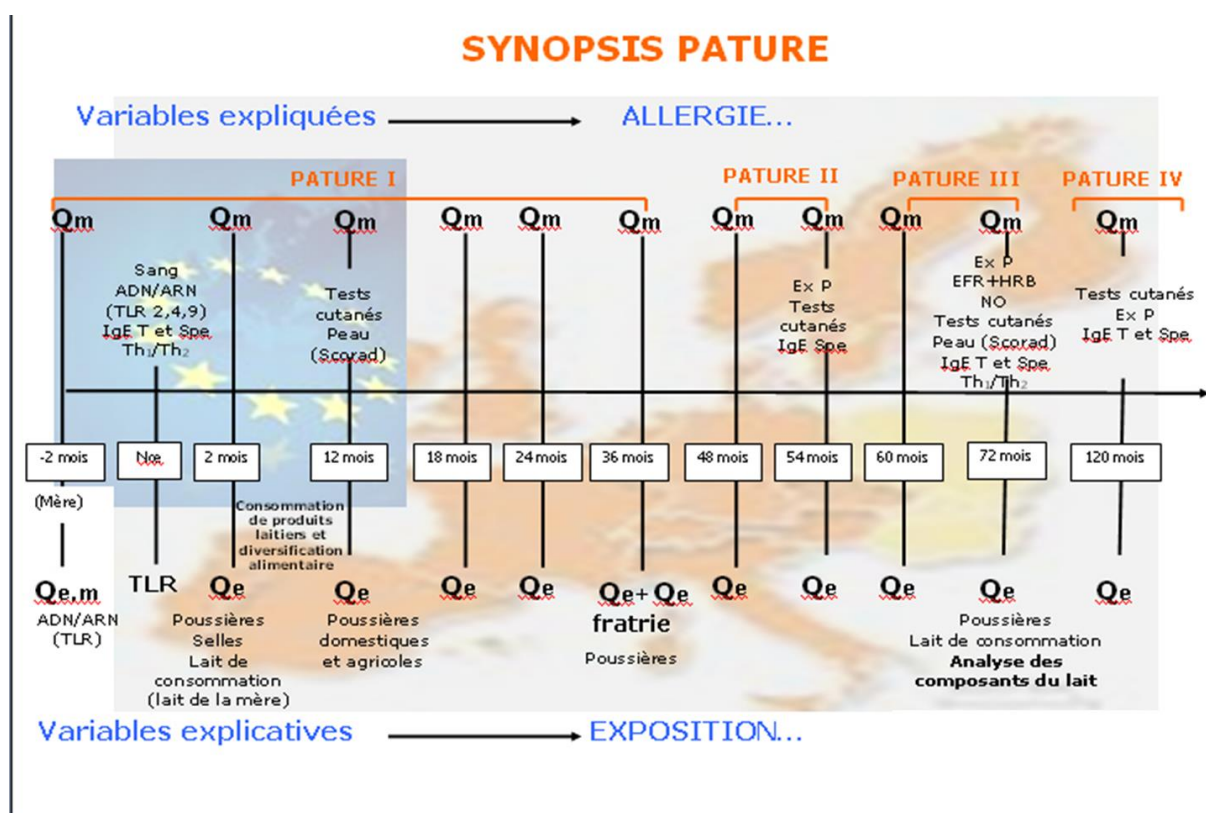
Le recueil des données s'est fait par des questionnaires destinés à chacun des parents sur leur santé et leur mode de vie pendant le troisième trimestre de grossesse puis un questionnaire 2 mois après la naissance de l'enfant, à 12 et 18 mois puis de questionnaire annuel jusqu'à la 6^{ème} année de vie de l'enfant. Deux autres questionnaires ont été remplis à l'âge de 10,5 ans et 16,5 ans. Des « journaux hebdomadaires » recueillant précisément l'alimentation et le mode de vie du nourrisson, étaient également complétés par les parents du début du deuxième à la fin du 12^{ème} mois.

Les questionnaires avaient pour but de déterminer l'état de santé global, et notamment respiratoire, de l'enfant et de ses parents ainsi que l'éventail des expositions agricoles. En outre, ils déterminaient l'existence de facteurs confondants comme le tabagisme passif, le niveau d'éducation des parents, la taille de la famille, l'allaitement maternel. Ces questionnaires ont été développés par le groupe d'étude PASTURE, à partir des questionnaires des études ISAAC (94), AMICS (95) ainsi que du questionnaire de l'ATS (96).

Des visites au domicile des familles ont été organisées au deuxième mois après la naissance. Des prélèvements de poussière dans l'environnement de l'habitation (pièces de vie et de sommeil, matelas des enfants et de leur mère), pour tous les enfants, et de la ferme (étable, grange) pour les enfants

« fermiers », des prélèvements fécaux, ainsi que des prélèvements du lait utilisé pour la consommation familiale, et de lait maternel, ont été réalisés au cours de la visite « 2 mois » ; d'autres prélèvements ont été réalisés par les parents eux-mêmes au cours des différentes étapes du suivi avec des kits envoyés par les coordonnateurs régionaux de l'étude. Des prélèvements sanguins ont également été effectués chez les parents avant la naissance de l'enfant et sur le sang du cordon à la naissance.

Des visites médicales comportant des prélèvements sanguins et éventuellement nasaux et cutanés et/ou fécaux et urinaires pour les études microbiologiques, immunologiques et génétiques, ont été réalisées à 1 an, 4,5 ans, 6 ans, 10,5 ans et 16,5 ans. Des prick-tests cutanés à la recherche d'une sensibilisation atopique IgE-médiée ont été réalisés dès la 1^{ère} année en France, puis dans tous les pays à la visite des 10,5 et 16,5 ans. Une étude standardisée de la fonction respiratoire a été réalisée à la visite des 6 ans.



c. Coordination de la cohorte

Le consortium européen PASTURE est dirigé par la Professeure Erika Von Mutius, pédiatre pneumo-allergologue à Munich, investigatrice principale pour l'Allemagne. Au démarrage de l'étude, les investigateurs principaux pour chaque pays étaient les suivants :

- Juha Pekkanen, à Kuopio, en Finlande ;
- Charlotte Braün-Fahrländer, à Bâle, en Suisse ;
- Joseph Riedler à Salzburg, en Autriche;
- Jean-Charles Dalphin, à Besançon, en France.



Photo du groupe d'étude PASTURE prise lors d'une réunion annuelle du groupe à Ulm en 2012

Depuis, de nombreux changements ont eu lieu. Le Dr Braün-Fahrländer est parti à la retraite et a laissé la place au Dr Roger Lauener puis au Dr Caroline Roudit. Le Pr Jean-Charles Dalphin est décédé brutalement en octobre 2019 et le rôle d'investigateur principal a été repris par le Dr Amandine Divaret-Chauveau, impliquée dans l'étude depuis 2012. L'Autriche a participé à la totalité de l'étude jusqu'à la visite à 10,5 ans puis a arrêté le suivi de la cohorte autrichienne faute de personnel. Le Dr Joseph Riedler est parti à la retraite fin 2022.

Actuellement, les investigateurs principaux sont donc les suivants :

- Anne Karvonen pour la Finlande ;
- Caroline Roduit pour la Suisse ;
- Amandine Divaret-Chauveau pour la France ;
- le Pr Erika Von Mutius partant à la retraite en 2023, sa collègue Bianca Schaub reprendra très probablement le rôle d'investigatrice principale pour l'Allemagne.

La coordination technique de l'étude est assurée par Nicola Korehrr, à Munich, en Allemagne.

Le management des données est coordonné par Elisabeth Schmausser-Hechfellner et Birgit Langer, au centre Helmholtz de Munich en Allemagne.

En France, la Mutualité Sociale Agricole (MSA) a joué un rôle crucial dans le recrutement des participants avec la participation particulièrement active du Dr Jean-Jacques Laplante. La Pr Dominique-Angèle Vuitton a travaillé aux côtés du Pr Jean-Charles Dalphin depuis le début de l'étude et le Dr Marie-Laure Dalphin a réalisé la totalité des visites cliniques de l'âge de 1 an à 16,5 ans. Le Dr Amandine Divaret-Chauveau, investigatrice principale pour la France, impliquée dans la cohorte PASTURE depuis la visite à 6 ans, est épaulée par le Pr Cindy Barnig, qui a repris la coordination locale de l'étude, à Besançon. Plusieurs ingénieurs de recherche clinique sont intervenus au fil des ans avec une implication plus particulière de Vincent Kaulek puis de Lucie Laurent et Ophélie Ritter.

A ce jour, la cohorte PASTURE a permis la publication d'environ 70 articles scientifiques originaux (74).

d. Les aspects éthiques

Les dispositions éthiques concernant l'inclusion des familles, le recueil et stockage des données confidentielles médicales ou non (détails sur la profession des parents, l'organisation de la ferme, le cheptel, les types de culture...), et les prélèvements biologiques chez les parents et les enfants, ont suivi les réglementations de chaque pays. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique local dans chaque pays.

Pour la France, ce programme de recherche a pour sa mise en œuvre :

- reçu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) Nord-Ouest III en date du 26/02/2020 pour la visite à 16,5 ans ; du CPP EST II en date du 15/10/2013 pour la visite à 10,5 ans ; du 13/07/2009 pour la visite à 6 ans ; du 08/10/2007 pour la visite à 4,5 ans et du 10/01/2003 pour le 1^{er} volet de l'inclusion au 3^{ème} trimestre de grossesse jusqu'à l'âge de 4 ans ;
- fait l'objet d'une notification auprès de l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) en date du 06/03/2020 pour la visite à 16,5 ans, du 02/01/2014 pour la visite à 10,5 ans, du 10/12/2009 pour la visite à 6 ans, du 03/08/2007 pour la visite à 4,5 ans.

L'accès aux données par les différentes équipes est régi par un accord de consortium, ainsi que par des règles pratiques de fonctionnement pour la réalisation des études communes et des études ancillaires susceptibles d'être effectuées par les différents centres ainsi que pour les publications qui en sont issues, sous la responsabilité d'un comité de publication. Des réunions « Analyses et Publications », associant le comité de pilotage de PASTURE et le comité de publication, ont régulièrement lieu, initialement chaque année puis tous les 2 ans depuis 2018.

e. Les aspects financiers

La cohorte a été mise en place en 2001 avec le financement du Programme Cadre 6 de Recherche et Développement (6ème PCRD) de la Commission européenne (contrat QLRT-2001-00250) et une aide spécifique de la MSA pour la branche française. Le suivi des enfants de l'âge de 18 mois à l'âge de 5 ans a été assuré par le contrat FORALLVENT (Forum for Allergy Prevention) du 6ème PCRD (contrat SSA 3170), et la visite des enfants à 6 ans, ainsi que des études expérimentales associées au suivi de cohorte, par le contrat EFRAIM (Mechanisms of Early Protective Exposures on Allergy Development) du 7ème PCRD (Small Collaborative Project ; contrat 211911).

Le suivi ultérieur a fait appel à des financements nationaux pour chaque branche de la cohorte. Pour la France, le suivi à 10,5 ans a été réalisé à l'aide de contrats dans le cadre du Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) de la région Est, financé par le Ministère de la Santé, et du Fond National pour la Recherche en Prévention de la MSA ; le suivi à 16,5 ans, réalisé en 2021-2022, a été réalisé à l'aide de bourses obtenues par le Dr Amandine Divaret-Chauveau auprès de deux fondations françaises spécialisées en pneumologie : le Don du Souffle et la Fondation du Souffle (Appel à Projets Santé Respiratoire et Société).

1.2 La toux dans la cohorte

Bien que l'étude n'ait pas été conçue pour analyser la toux, plusieurs items des questionnaires de suivi concernaient la toux, dans le but d'explorer les différents symptômes d'asthme : toux, sibilants, essoufflement. Ces questions ont donc permis de déterminer la présence d'une toux en dehors d'une infection, la fréquence de la toux en dehors d'une infection, la durée habituelle des épisodes de toux, les caractéristiques de la toux ainsi que les facteurs déclenchants (triggers) de la toux en dehors d'une infection. Ces données ont été recueillies prospectivement par des questions concernant les événements de toux sur les 6 derniers mois à 18 mois et 24 mois puis sur les 12 derniers mois à partir de l'âge de 3 ans.

Dans le questionnaire **à l'âge d'1 an**, les questions sur la toux étaient les suivantes :

1/ Votre enfant a-t-il toussé depuis notre dernière visite chez vous, sans être malade (c'est-à-dire sans rhume et sans fièvre au-dessus de 38,5°C) ? Oui/Non

2/ Combien de fois a-t-il toussé, sans être malade depuis notre dernière visite chez vous ? Moins d'1 fois par mois, 1 fois par mois, au moins 2 fois par mois

3/ Votre enfant tousse-t-il souvent la nuit, sans être malade ? Oui/Non

A partir de **l'âge de 18 mois**, les questions sur la toux étaient les suivantes :

1/ Combien de fois votre enfant a-t-il toussé depuis notre dernière visite ? Jamais, moins d'1 fois par mois, 1 fois par mois, au moins 2 fois par mois

2/ Combien de fois votre enfant a-t-il toussé, sans être enrhumé, depuis notre dernière visite ? Jamais, moins d'1 fois par mois, 1 fois par mois, au moins 2 fois par mois

3/ Quand votre enfant tousse, sans être enrhumé, combien de temps dure cette toux habituellement ? Habituellement que quelques jours, le plus souvent environ une semaine, le plus souvent de 1 à 2 semaines, le plus souvent plus de 2 semaines

4/ Quand votre enfant tousse, sans être enrhumé, cette toux est-elle plutôt sèche ou grasse avec expectoration ?

5/ Votre enfant tousse-t-il souvent la nuit, sans être enrhumé ? Jamais, moins d'1 fois par mois, 1 fois par mois, au moins 2 fois par mois

A partir de **l'âge de 2 ans**, une 6^{ème} question a été ajoutée :

Votre enfant a-t-il déjà présenté dans les 12 derniers mois une attaque de toux, sans être enrhumé, causée par les facteurs suivants ? Exercice physique, émotion, changement de température.

Un premier travail avait été réalisé dans le cadre du mémoire de DIU de pneumo-allergologie pédiatrique d'Amandine Divaret-Chauveau en décrivant les phénotypes cliniques de toux au sein de la cohorte PASTURE. Ces phénotypes cliniques étant définis a priori et n'étant pas mutuellement exclusifs, le consortium PASTURE a jugé nécessaire d'analyser les données sur la toux en réalisant une analyse sans a priori.

1.3 Les maladies allergiques et la sensibilisation atopique

Les maladies allergiques étudiées dans la cohorte PASTURE sont les suivantes : la rhinoconjonctivite allergique, l'asthme, la dermatite atopique et l'allergie alimentaire. Ces maladies ont été définies à partir des données du questionnaire par le consortium d'étude PASTURE. La même définition est utilisée pour toutes les publications du groupe d'étude PASTURE.

La rhino-conjonctivite allergique était définie par la présence simultanée de symptômes oculaires et nasales sans être enrhumé et/ou d'un diagnostic de rhinite allergique rapporté par les parents sur au moins un questionnaire entre 3 et 10,5 ans.

L'asthme était défini par un diagnostic médical d'asthme rapporté par les parents au moins une fois durant le suivi ou le diagnostic médical rapporté par les parents d'au moins deux bronchites (spastiques, obstructives ou asthmatiques) dans les questionnaires 4, 5, 6 et 10,5 ans, sans tenir compte des épisodes de bronchite rapportés durant les 3 premières années de vie.

La dermatite atopique était définie par un diagnostic médical de dermatite atopique rapporté par les parents au moins une fois durant le suivi et/ou d'un SCORAD positif durant la visite à 1 an et/ou d'une éruption cutanée prurigineuse à des localisations spécifiques rapportée sur les 12 derniers mois lors du questionnaire à 10,5 ans.

L'allergie alimentaire était définie par un diagnostic médical d'allergie alimentaire rapporté par les parents au moins une fois durant le suivi et/ou des symptômes spécifiques après une ingestion alimentaire rapportés sur les 12 derniers mois lors du questionnaire à 10,5 ans.

La sensibilisation atopique a été évaluée par le dosage des IgE spécifiques pour vingt allergènes communs pour la totalité de la cohorte à l'âge de 1 an, 4,5 ans, 6 ans, 10,5 ans et 16,5 ans. Le dosage

des IgE spécifiques était centralisé à l'institut *Laboratory Medicine and Pathobiochemistry* à Marburg, avec la technique de l'*Allergy Screen Test Panel for Atopy* (Mediwiss Analytic, Moers, Germany), sous la responsabilité du Pr Harald Renz. A partir de la visite à 10,5 ans, le Dr Chrysanthi Skevaki a assuré la responsabilité de ces analyses dans le même laboratoire. Ce dosage des IgE spécifiques a été réalisé pour les vingt allergènes suivants :

- sept allergènes alimentaires : l'œuf de poule, le lait de vache, l'arachide, la noisette, la carotte, la farine de blé et le soja ;
- treize allergènes respiratoires : les acariens avec *Dermatophagoïdes farinae* (Df) et *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (Dpt), les phanères d'animaux, représentées par le chat, le chien et le cheval, les pollens de graminées avec le mélange de cinq graminées et l'ivraie vivace, les pollens d'herbacées avec l'armoise et le plantain, les pollens d'arbre avec l'aulne, le bouleau et le noisetier, et *Alternaria alternata*.

La France a également réalisé des prick-tests cutanés pour évaluer la sensibilisation cutanée pour 18 allergènes : 12 allergènes respiratoires (acariens - *Dermatophagoïdes pteronyssinus* et *Dermatophagoïdes farinae* - chat, pollen de bouleau, pollen de graminées et de dactyle, alternaria dès l'âge de 1 an puis à partir de 4,5 ans, pollens de noisetier et d'olivier, chien et à partir de 6 ans, armoise et plantain) et six allergènes alimentaires (lait, jaune d'œuf, blanc d'œuf, arachide dès l'âge de 1 an et soja à partir de 4,5 ans). Suite à la publication des résultats de concordance entre tests cutanés et IgE spécifiques au sein de la cohorte française (97), le groupe d'étude PASTURE a décidé de réaliser les tests cutanés pour la totalité de la cohorte à partir de l'âge de 10,5 ans pour huit allergènes (acariens - *Dermatophagoïdes pteronyssinus* et *Dermatophagoïdes farinae* - chat, chien, pollen de bouleau, pollen de graminées, alternaria et arachide).

1.4 Les sibilants et l'atopie parentale

La présence de sifflements a été évaluée par plusieurs items du questionnaire PASTURE, d'une façon similaire à la toux, en prenant en compte, la présence ou non d'une infection concomitante, la fréquence de ces épisodes de sibilants, la durée des épisodes, les symptômes entre les épisodes... Des sibilants incessants étaient définis par la présence de sibilants sans avoir été malade ou de symptômes respiratoires rapportés par les parents entre les épisodes de sibilants au moins une fois entre l'âge de 18 mois et de 10,5 ans.

L'atopie parentale était définie par le fait qu'au moins un des parents ait déclaré avoir eu de l'asthme, une rhinite allergique ou une dermatite atopique.

1.5 L'environnement périnatal dans la cohorte PASTURE

Pour évaluer l'environnement périnatal, nous avons pris en compte les variables obtenues par le questionnaire du 3^{ème} trimestre de grossesse ainsi que par le questionnaire à 1 an.

- Les variables spécifiques à l'environnement fermier

Pendant la période prénatale (données du questionnaire du 3^{ème} trimestre de grossesse), les variables spécifiques à l'environnement fermier suivantes ont été étudiées : le travail ou la présence de la mère dans les étables, dans les granges, le nombre d'espèces animales avec lequel la mère est en contact, la consommation de lait de ferme (bouilli ou non bouilli).

Pendant la période postnatale (données du questionnaire à 1 an), les variables spécifiques à l'environnement fermier suivantes ont été étudiées : la présence de l'enfant dans l'étable (durée, fréquence et présence durant l'alimentation du bétail), consommation de lait de ferme (bouilli ou non bouilli), la durée de l'allaitement maternel, le score de diversité alimentaire à 1 an, la consommation de yaourt et la consommation de fromage à 1 an.

- Les variables environnementales d'intérêt pour la toux

Pendant la période prénatale, les variables d'intérêt étaient les suivantes : tabagisme maternel, tabagisme parental, contact avec les animaux domestiques (chat, chien), présence d'une fratrie.

Pendant la période postnatale, les variables d'intérêt étudiées étaient les suivantes : infections ORL ou respiratoires, contact avec les animaux domestiques (chat, chien), contact avec d'autres enfants, mode de garde, tabagisme passif, mode de chauffage, l'exposition aux moisissures ou à l'humidité.

1.6 Les analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été conduites à l'aide du logiciel SAS version 9.4.

a. Trajectoires de toux : analyse en classes latentes

Une analyse en classes latentes a été réalisée pour identifier les différentes trajectoires de toux entre l'âge de 1 et 10,5 ans (98). Trois variables « toux » mesurées à chaque suivi ont été utilisées : la présence d'une toux sans infection, la présence d'une toux sans infection la nuit et la présence de facteurs déclenchants. Les variables « toux en dehors d'une infection » et « toux en dehors d'une infection la nuit » ont été recodées en variable binaire pour différencier les enfants n'ayant jamais eu une telle toux de ceux en ayant eu au moins une fois sur les 6 ou 12 derniers mois. La variable « facteur déclenchant de la toux », disponible à partir de l'âge de 2 ans, a également été dichotomisée : aucun facteur déclenchant versus au moins un facteur déclenchant.

Ces trois variables mesurées à chaque visite, soit un total de 22 variables, ont été incluses dans le modèle de classes latentes. Les enfants pour lesquels il y avait plus de deux suivis manquants, c'est-à-dire ayant participé à moins de 6 visites sur 8, ont été exclus de cette analyse (n=172).

Afin de choisir le modèle de classes latentes le plus adapté, nous avons pris en considération le critère d'information Bayesian (BIC), le critère d'information d'Akaike (AIC) et l'entropie (99). Ayant identifié une discordance entre les différents paramètres statistiques pour établir le modèle le plus adapté,

nous avons considéré que le BIC était le paramètre statistique le plus fiable et nous avons réalisé un test de vraisemblance avec une méthode d'inférence statistique basée sur la réplication multiple des données à partir du jeu de données étudié (bootstrap) pour départager les modèles ayant les meilleurs critères statistiques (100).

Des analyses de sensibilités ont été réalisées au sein de la totalité de la cohorte (n=1133), quel que soit le nombre de données manquantes ainsi que chez les enfants n'ayant aucune donnée manquante pour les trois variables « toux » étudiées (n=625). Les paramètres des modèles obtenus par ces analyses de sensibilité sont en annexe de l'article 1.

b. Association avec les maladies allergiques

Une régression logistique a été utilisée pour évaluer l'association entre les maladies allergiques (considérées comme la variable à expliquer) et les trajectoires de toux (considérées comme la variable explicative). Les modèles multivariés ont été ajustés sur le centre, l'atopie parentale, le sexe et le fait d'avoir grandi à la ferme ou non.

Des analyses stratifiées ont été réalisées pour identifier une éventuelle modulation de l'association entre les maladies respiratoires allergiques et les trajectoires de toux par la présence ou l'absence de sibilants incessants.

c. Association avec les caractéristiques de la population et l'environnement périnatal

Une régression logistique multinomiale a été utilisée pour évaluer l'association entre les différentes trajectoires de toux et les caractéristiques de la population (sexe, centre, atopie parentale, fermier) ainsi que les variables d'environnement périnatal décrites dans le point précédent (variables spécifiques à l'environnement fermier et variables d'intérêt pour la toux).

Pour les variables d'environnement postnatal, une analyse de sensibilité en excluant les enfants ayant déjà des symptômes de toux sans être enrhumé à l'âge de 1 an a été réalisée.

2. Partie expérimentale

2.1 Le modèle animal d'hyperréactivité bronchique d'origine allergique

Le modèle animal utilisé pour l'étude est le lapin néozélandais sensibilisé à l'ovalbumine. Ce modèle expérimental a déjà été largement utilisé pour l'étude de l'hyperréactivité bronchique, telle que celle observée chez l'homme dans l'asthme. Ce modèle reproduit en effet plusieurs caractéristiques observées dans l'asthme telles que la réponse précoce et tardive des voies respiratoires suite à l'exposition allergénique, une inflammation à éosinophiles au niveau de la paroi bronchique et du liquide broncho-alvéolaire et des signes de remodelage bronchique (101,102). Ces caractéristiques peuvent être étudiées par la mesure de réactivité bronchique (103), de l'hyperréactivité bronchique aux agents bronchoconstricteurs et du réflexe de toux provoquée par la stimulation chimique et mécanique. L'utilisation du lapin anesthésié a été largement éprouvé pour les études sur la physiologie et la pharmacologie de la bronchomotricité et de la toux au sein du laboratoire DevAH (103–108) mais aussi par d'autres équipes (109,110).

L'équipe du laboratoire DevAH dispose d'une expérience de l'étude des réflexes de défense pendant la maturation, dès la naissance, ainsi que des soins des lapines au cours de gestation et des lapereaux au cours de la phase d'allaitement et de sevrage (111,112). L'utilisation d'un modèle lapin est justifié par le fait que le modèle rongeur ne peut pas être utilisé dans la recherche sur la toux, les rats et les souris n'exprimant pas ce réflexe de défense (113).

L'utilisation des lapins du laboratoire de race Néo-Zélandais paraît tout à fait appropriée pour l'étude de l'effet protecteur de l'environnement fermier contre les maladies atopiques. Cette race, originaire des Etats-Unis a été initialement sélectionnée (au début de 20^{ème} siècle) pour l'élevage dans les fermes pour ses qualités de production de viande avant d'être utilisée comme un animal d'expérience. Son éloignement du milieu fermier et des contacts avec les autres animaux. Son élevage en milieu de laboratoire ayant une faible biodiversité d'exposition microbiologique, selon des règles d'hygiène

strictes comme l'absence de contact avec d'autres animaux du milieu de laboratoire évoque les changements de mode de vie des humains vers le mode de vie moderne des pays occidentaux.

2.2 L'environnement spécifique

Trois groupes de lapereaux ont été exposés à trois environnements spécifiques en pré et post-natal : durant les trois dernières semaines de grossesse de la mère et leurs six premières semaines de vie. Les trois environnements spécifiques étaient : la zone exempte d'organisme pathogène spécifique (EOPS) correspondant au groupe « contrôle », la stabulation de la ferme de la Bouzule correspondant au groupe « ferme moderne » et l'étable des veaux de la ferme de la Bouzule correspondant au groupe « ferme traditionnelle ».

a. Zone EOPS

Un groupe contrôle, non-exposé à la poussière de ferme, a été hébergé à l'animalerie du campus Brabois santé de l'université de Lorraine (ACBS) dans une zone ayant un statut sanitaire EOPS afin de modéliser un environnement exempt de biodiversité d'exposition microbiologique et allergénique en période périnatale.

Ce groupe de trois lapines gestantes a donné naissance les 24/25 octobre 2020 à 27 lapereaux. Six lapereaux sont décédés en zone EOPS, soit par sélection naturelle au cours des premiers jours de la vie (difficultés à se nourrir au sein d'une grande portée...) soit par accident après la première semaine de vie, liée à une taille inférieure à l'écart entre les barreaux pour certains lapereaux (sortie de la cage).



Lapereaux issus des portées hébergées dans la zone EOPS de l'ACBS de l'Université de Lorraine. Crédit : Cédric Garcia

b. Le domaine de la Bouzule

La ferme de la Bouzule est une exploitation de type polyculture-élevage, propriété de l'ENSAIA (Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires) depuis le milieu des années 60. Il s'agit d'une ferme vivante de ses productions, notamment laitière et fromagère mais aussi d'un outil pédagogique pour les élèves-ingénieurs, d'un laboratoire à ciel ouvert par la mise en œuvre et l'expérimentation de nouvelles techniques d'élevage et de culture et d'un modèle pour imaginer et concevoir une ferme durable fondée sur le renouvelable, l'autonomie et le respect de la biodiversité.

Elle comprend un élevage bovin et caprin. Concernant l'élevage bovin, en plus de l'élevage d'une cinquantaine de vaches allaitantes, la ferme de la Bouzule regroupe 80 vaches laitières, de race Prim'Holstein, en stabulation libre. La production laitière de la Bouzule est particulièrement importante. Alors que la moyenne nationale est de 6000 litres de lait pour une vache et par an, celle de la Bouzule est de 10 000 l/an. Cette productivité importante est en lien avec l'alimentation fournie au troupeau, s'inspirant en cela du travail de recherche de l'unité de recherche « Animal et fonctionnalités des produits animaux » visant à étudier l'optimisation de la production par l'alimentation animale. Les vaches disposent d'une table d'alimentation où elles se nourrissent à volonté. Elles bénéficient également lors de la traite d'un concentré de production comprenant un mélange de céréales, tourteaux et minéraux. Chaque neuf mois, les vaches de la Bouzule donnent naissance à des veaux, élevés à la ferme qui enregistre un taux de renouvellement de 30%. Ces veaux sont hébergés dans une étable à quelques centaines de mètres de la stabulation où nourriture et litière sont déposées manuellement. Alexandre Laflotte, directeur de la ferme de la Bouzule depuis 2013, a accueilli notre projet avec enthousiasme et nous avons pu avoir l'aide de deux agriculteurs.

La stabulation : modèle de la ferme moderne, très aérée avec délivrance de la nourriture et du paillage par des machines agricoles (se rapprochant du mode agricole des populations hutérites)



Stabulation de la ferme de la Bouzule. Crédit : le domaine de la Bouzule.



Stabulation et dépôt du foin pour la nourriture du bétail en hiver à la ferme de la Bouzule. Crédit : Amandine Divaret-Chauveau

Les cages des lapines gestantes étaient installées au milieu de la stabulation, à proximité de la salle de traite, dans un espace fermé par des barrières et en partie abrité.

Les lapines ont mis bas le 19 février 2021. Les portées de lapereaux issues de ce groupe ont subi un taux de mortalité extrêmement élevé, très précoce. Seuls trois lapereaux avaient survécu au troisième jour de vie et un des trois lapereaux est décédé quelques semaines plus tard, nous n'avons donc pas pu obtenir de donnée issue de ce groupe.



*Installation des cages pour les lapines gestantes au milieu de la stabulation de la ferme de la Bouzule. Crédit :
Amandine Divaret-Chauveau et Silvia Demoulin-Alexikova*



*Un des lapereaux vivant parmi les portées hébergées dans la stabulation de la ferme de la Bouzule. Crédit :
Silvia Demoulin-Alexikova*

L'étable des veaux : modèle de la ferme traditionnelle, avec délivrance manuelle de la nourriture et de la litière (se rapprochant du mode agricole des populations amish)



Vue extérieure de l'étable des veaux de la ferme de la Bouzule. Crédit : Amandine Divaret-Chauveau



Vues intérieures de l'étable des veaux de la ferme de la Bouzule. Crédit : Amandine Divaret-Chauveau et Silvia Demoulin-Alexikova



Installation des es lapines gestantes dans l'étable des veaux de la ferme de la Bouzule. Crédit : Amandine Divaret-Chauveau

Les trois lapines ont donné naissance à un total de 27 lapereaux le 02 avril 2021 et un seul lapereau est décédé dans les premiers jours de vie. Il est possible que les températures plus douces et la plus faible pollution sonore aient joué un rôle sur ce faible taux de mortalité.



Lapereaux issus des portées hébergées dans l'étable des veaux de la ferme de la Bouzule à 15 jours de vie. Crédit : Amandine Divaret-Chauveau



Lapereaux issus des portées hébergées dans l'étable des veaux de la ferme de la Bouzule à respectivement 3 et 4 semaines de vie. Crédit : Amandine Divaret-Chauveau



Lapereaux issus des portées hébergées dans l'étable des veaux de la ferme de la Bouzule à 5 semaines de vie. Crédit : Amandine Divaret-Chauveau

Une fois les lapereaux nés, les soins (eau, nourriture, vérification du nombre de lapereaux et de leur état) étaient réalisés tous les jours par quatre intervenants : Cédric Garcia, Bruno Demoulin, Silvia Demoulin-Alexikova et Amandine Divaret-Chauveau.

c. L'analyse de l'environnement spécifique

Les deux types d'environnement fermier ont été caractérisés par l'analyse des endotoxines aéroportées et de l'environnement microbien par séquençage haut débit sur prélèvements de poussière, à proximité des cages des lapins. Les prélèvements ont été réalisés par le laboratoire de métrologie des aérosols de l'INRS de Vandoeuvre les Nancy (Pauline Loison, Xavier Simon et Lise Alonso) à l'aide de cassettes 3 pièces en polystyrène de 37mm (Millipore®, France). Les cassettes à face fermée ont été montées avec un filtre en fibre de verre comme support de collecte et un filtre similaire comme support arrière. Les filtres en fibre de verre ont été préalablement chauffés à 250°C pendant 120 minutes pour les rendre apyrogènes. Les cassettes ont été connectées à des pompes portables à débit constant (Apex2, Casella, USA) et le prélèvement a été effectué à un débit de 2 L/min. Le débit a été calibré et contrôlé avant et après le prélèvement à l'aide d'un débitmètre à bulle (Gilian®, Gilibrator, USA). Tous les échantillons ont été prélevés à environ 1,7 m du sol pour la mesure des endotoxines, à 90 cm et à 1,7 m du sol pour l'analyse de l'environnement microbien.

La concentration en endotoxine a été évaluée au laboratoire de métrologie des aérosols de l'INRS de Vandoeuvre les Nancy en introduisant 5 ml d'eau apyrogène dans chaque cassette, puis en agitant pendant 20 minutes à 2000 tr/min (agitateur Multi-Reax®, Heidolph®, Allemagne). La concentration d'endotoxines dans l'extrait a été dosée à l'aide du test de détection chromogénique cinétique LAL en suivant les recommandations du fabricant, à l'aide des kits Kinetic-QCL® (Lonza Group Ltd). La limite de détection de l'analyse des endotoxines était de 0,005 UE/mL soit 0,025 UE par filtre. Le volume d'air prélevé a été calculé en fonction du débit et de la durée du prélèvement (environ cinq heures), et la concentration d'endotoxines aéroportées a ainsi été exprimée en unités d'endotoxines (UE) par mètre cube (UE/m³).

L'analyse de l'environnement microbien par séquençage haut débit a été réalisée par l'unité de microbiologie de l'École des hautes études en santé publique de Rennes (Pr Pierre Le Cann, professeur de Microbiologie, Département Santé-Environnement-Travail et Génie Sanitaire). Les cassettes de prélèvements réceptionnées au laboratoire dans les 48h suivant le prélèvement ont été conservées à -80°C jusqu'à finalisation de la convention de collaboration. Le traitement des cassettes de prélèvements a consisté en la remise en suspension dans un tampon des poussières contenant les micro-organismes suivie d'une centrifugation pour concentrer les poussières. Le matériel génétique des microorganismes contenus dans les poussières d'environnement a été extrait par une méthode de lyse mécanique suivie d'une lyse chimique. Un séquençage nouvelle génération (NGS), aussi appelé séquençage haut débit, a ensuite été réalisé sur trois cibles : 16S pour les bactéries, 18S pour les eucaryotes, et ITS pour les moisissures sur plateforme Illumina (prestataire externe). Les données de séquençage ont été analysées à l'aide du logiciel QIIME et les indices de diversité Shannon et Simpson ont été calculés. Ces analyses ayant été transmises en novembre 2022, leur interprétation n'a pas pu être intégrée à ce manuscrit de thèse.

La zone EOPS n'a pas pu faire l'objet de prélèvements de poussière du fait de la difficulté à apporter le matériel de prélèvement dans cette zone protégée pour être exempt d'agent pathogène.

2.3 Les expérimentations animales

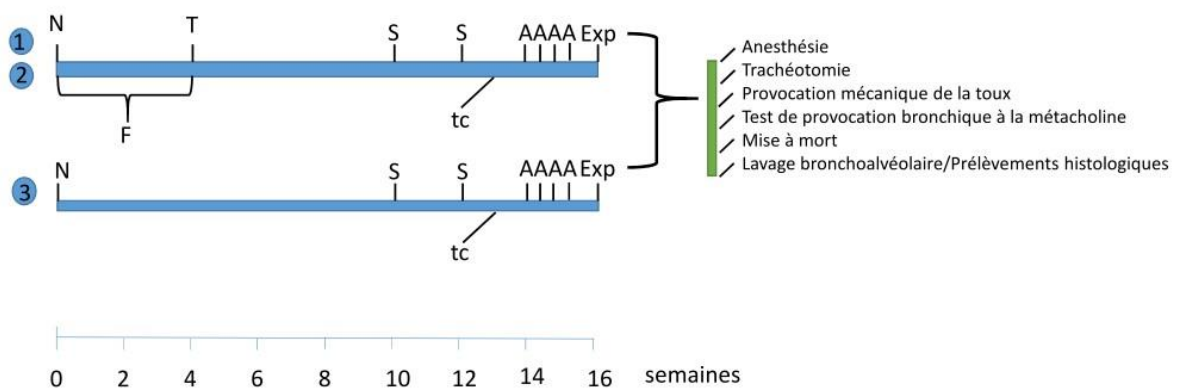
A leur 7^{ème} semaine de vie, les groupes de lapereaux ont été transférés dans la zone conventionnelle de l'ACBS.



Lapereaux hébergés en zone conventionnelle de l'ACBS de l'Université de Lorraine. Crédit : Silvia Demoulin-Alexikova

Procédure expérimentale

- N:** naissance des lapereaux (à la ferme pour 1&2; dans la zone EOPS de l'ACBS pour 3)
- F:** exposition à la poussière de ferme
- T:** transport vers la zone conventionnelle ACBS
- S:** sensibilisation (0,1 mg d'Ovalbumine)
- tc:** test cutané (22ème jour après le début de sensibilisation)
- A:** Aérosols d'allergène (40 mg d' Ovalbumine/ NaCl)
- Exp:** Le jour d'expérimentation finale

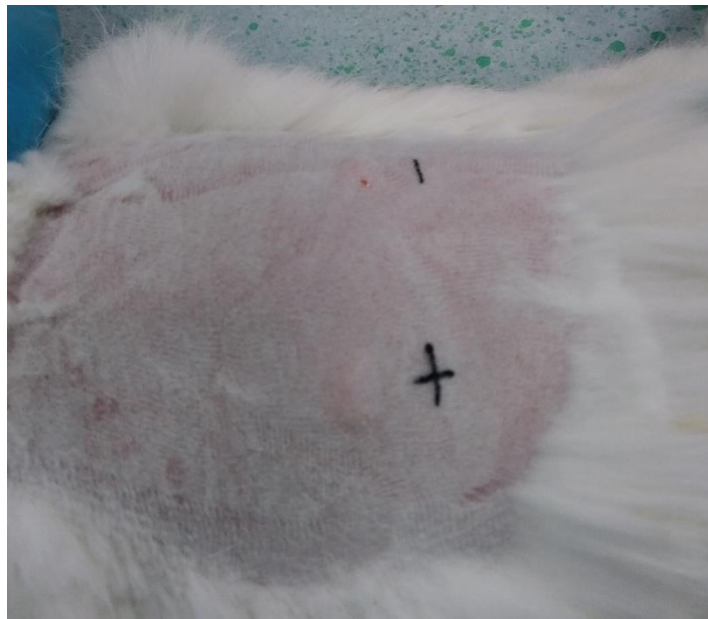


a. Sensibilisation à l'ovalbumine

La sensibilisation à l'ovalbumine (OVA) a consisté en une administration intra-péritonéale de deux injections espacées de 14 jours de 0,1 mg d'OVA (Sigma-Aldrich 5503) et 10 mg d'hydroxyde d'aluminium, dilués dans 1 ml de NaCl 0,9% (114).

La réponse à la sensibilisation intra-péritonéale a été évaluée par :

- un test intradermique : intradermoréaction à une solution d'ovalbumine (25 µL à 200 µg/mL) comparée à une intradermoréaction à une solution de sérum salé NaCl 0,9%, réalisées sur le dos de l'animal 21j après la première injection d'OVA ;
- le dosage des IgE spécifiques ovalbumine lors des expérimentations finales sur sérum non dilué avec l'utilisation d'un kit ELISA spécifique au dosage des IgE spécifiques anti-OVA pour lapin de MyBioSource (San Diego, CA, USA).



Intra-dermoréactions à l'Ovalbumine réalisées sur le dos d'un lapereau. Crédit : Silvia Demoulin-Alexikova

Les deux premiers groupes de lapin (zone EOPS et ferme moderne) ont été sensibilisés à partir de la 11^{ème} semaine de vie (11 à 13 semaines de vie). Du fait de la fermeture estivale de l'ACBS, les expérimentations animales du groupe « ferme traditionnelle » ont dû être avancées et la sensibilisation a été réalisée à partir de la 8^{ème} semaine de vie (8 à 10 semaines de vie).

En raison d'une incohérence constatée dans la lecture des tests du groupe « ferme traditionnelle », les résultats des intra-dermoréactions n'ont pas été exploités. De ce fait, le dosage des IgE spécifiques nous a paru être plus fiable pour refléter la sensibilisation atopique dans le cadre de nos expérimentations.

b. Exposition à l'ovalbumine

Chaque lapin a été exposé à l'OVA par voie inhalée avec la réalisation d'un aérosol d'OVA sur 20 minutes 4 jours de suite, avec réalisation du premier aérosol 10 jours après la fin de la sensibilisation.

Les aérosols d'OVA ont été administrés à l'aide d'un nébuliseur à ultrasons (LS 290, SYSTAM®) produisant des gouttelettes d'un diamètre aérodynamique massique de 3,5 µm (60 % des particules avaient une taille comprise entre 1 et 5 µm) relié à un dispositif sur mesure créé dans notre laboratoire. Le système était une chambre fermée en plexiglas (33 x 33 x 51,5 cm) constituée d'un espace dédié à la tête de l'animal et isolé de l'espace prévu pour le corps. Les lapins ont été positionnés de manière à permettre une proximité entre le nez du lapin et l'ouverture d'arrivée de l'aérosol. Pour réaliser les provocations par aérosol, les lapins ont été placés dans le système de contention qui avait une ouverture pour la tubulure reliée à un nébuliseur contenant 20 ml d'une solution d'OVA (2,5 mg/mL d'OVA dans une solution saline). Une nébulisation de 20 minutes a permis l'aérosolisation de près de 40 mg d'OVA. Tous les aérosols ont été administrés dans une enceinte de sécurité de classe I pour des raisons de sécurité.

Les lapins ont été exposés au dernier aérosol d'OVA 48 heures avant les provocations mécaniques et chimiques de la toux. Durant les cinq jours précédant l'administration de l'aérosol d'OVA, cinq séances d'accoutumance de cinq minutes chacune avec un aérosol de solution saline ont été réalisées afin de réduire le stress lié à la manipulation et à la restriction de mouvement imposée par le système de nébulisation.



Installation pour réalisation des aérosols d'Ovalbumine. Crédit : Silvia Demoulin-Alexikova

c. Expérimentations finales

Les expérimentations finales se sont étalées sur trois semaines pour chaque groupe, avec la réalisation des expérimentations pour deux lapins par jour pendant 3 jours chaque semaine. Les lapins avaient donc entre 15 et 18 semaines de vie au moment des expérimentations finales pour le groupe EOPS et « ferme moderne » et entre 12 et 15 semaines de vie pour le groupe « ferme traditionnelle ».

Provocation chimique de la toux à l'état vigile

Une solution saline suivie de quatre solutions d'acide citrique (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) à différentes concentrations (0,2M, 0,4M, 0,8M et 1,6M) ont été nébulisées à l'aide d'un nébuliseur à ultrasons (LS 290, SYSTAM®) pendant une minute chacun dans la même chambre en Plexiglas que celle utilisée pour les aérosols d'OVA. Chaque aérosol était séparé d'au moins une minute. La réponse à la nébulisation d'acide citrique a été quantifiée par le nombre de réflexes de défense (réflexe expiratoire ou réflexe de toux) comptés par un observateur à chaque concentration. Le seuil chimique a été défini comme la plus faible concentration de solution d'acide citrique qui

provoque un réflexe de défense. Le nombre cumulé de réflexes de défense au cours des quatre solutions différentes a été calculé.

Analgesie/Anesthésie

L'analgesie a été induite par une injection intramusculaire de buprénorphine (0,02 mg/kg). Quinze minutes après la prémédication, une anesthésie a été induite avec du propofol (3 mg/kg) (Ceva Santé Animale, Libourne, France) et de la kétamine (3 mg/kg) (Virbac, France ; Carros, France) injectés par la veine de l'oreille. L'anesthésie a ensuite été maintenue par une perfusion continue de propofol (0,8 mg/kg/min) et de kétamine (0,2 mg/kg/min). La surveillance de l'analgesie et de la profondeur de l'anesthésie a été effectuée à des intervalles de 15 minutes en évaluant l'évolution des paramètres physiologiques (fréquence cardiaque et respiratoire) et l'absence de réponses de retrait aux pincements compressifs des oreilles et des orteils. Le débit de perfusion était adapté en fonction de ce suivi (cf fiche de surveillance ci-dessous). A la fin de l'expérience, les animaux ont été mis à mort par une injection intraveineuse de 3 mL d'Euthasol (400 mg de pentobarbital/mL, Dechra).

Feuille d'enregistrement des signes vitaux

Date : 25/06/11

N° Expérimentation : 25BF
 Animal ID : _____
 Poids : 1,835

Heure :		14h02	14h17														
Résistance à l'écartement des mâchoires		<input checked="" type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input checked="" type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non
Extension de la langue, rétraction		<input type="radio"/> oui	<input checked="" type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input checked="" type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non
Extension de la patte et pincement entre deux doigts de patte	flexion de la patte	<input checked="" type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input checked="" type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non
	mouvement du corps	<input type="radio"/> oui	<input checked="" type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input checked="" type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non
	cri	<input type="radio"/> oui	<input checked="" type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input checked="" type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non
Pincement de l'oreille	mouvement de la tête	<input type="radio"/> oui	<input checked="" type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input checked="" type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non
	mouvement des moustaches	<input type="radio"/> oui	<input checked="" type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input checked="" type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non
Réflexe cornéen, clignement		<input checked="" type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input checked="" type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	<input type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non
Couleurs des membranes muqueuses	oreilles (pincement et retour à la couleur naturelle, en seconde)	<u>rose</u>		<u>rose</u>													
	nez	<u>u</u>		<u>u</u>													
Température °C		<u>39°C</u>		<u>38°</u>													
Fréquence cardiaque (bpm)		<u>250</u>		<u>260</u>													
Fréquence respiratoire (cy/min)		<u>24</u>		<u>36</u>													
Volume courant (mL)				<u>13</u>													

Feuille : 1

Exemple de fiche de surveillance des signes vitaux des lapins en cours d'anesthésie.

Préparation de l'animal

L'animal anesthésié était placé en décubitus dorsal. Sa température rectale était surveillée en continu avec une thermistance électrique (Physitemp Instruments, YSI 402 Clifton, NJ, USA) et maintenue à 38°C à l'aide d'un tapis de circulation d'eau chaude. La fréquence cardiaque et respiratoire était surveillée à l'aide d'un scope avec 3 électrodes. L'activité électromyographique du muscle droit de l'abdomen était mesurée par l'insertion d'électrodes bipolaires isolées en fil d'acier inoxydable fin (A-M Systems INC, Sequim, WA 98,382) introduites sous contrôle visuel dans le muscle transverse de l'abdomen ou dans les muscles abdominaux obliques externes pour différencier davantage l'expiration active de la respiration augmentée (103,115).



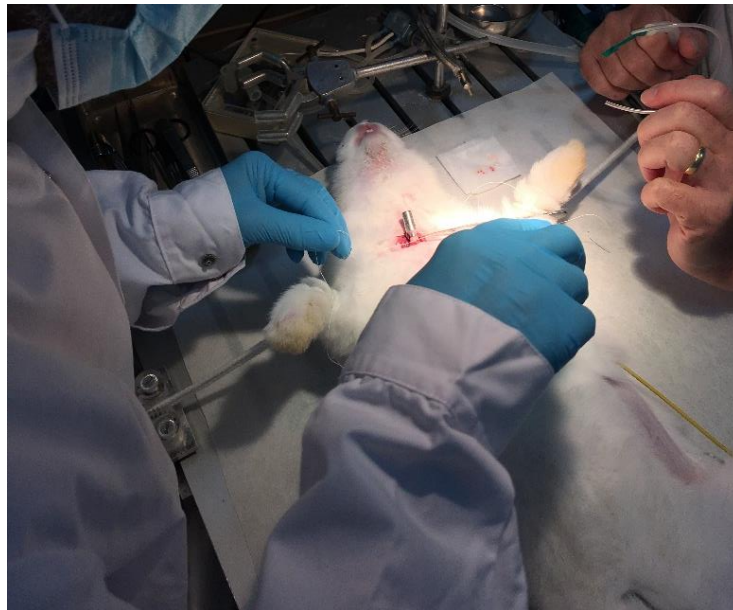
Vue d'ensemble lors de la réalisation des expérimentations finales. Crédit : Amandine Divaret-Chauveau



Préparation de l'animal (anesthésie, pose de l'EMG, l'ECG et la sonde rectale thermique). Crédit : Amandine Divaret-Chauveau et Silvia Demoulin-Alexikova

Trachéotomie

Une trachéotomie cervicale haute a permis l'insertion d'une canule trachéale reliée à l'appareil de stimulation mécanique et à un pneumotachographe (pneumotachographe Fleisch n°0 avec une plage linéaire de $\pm 250 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$). Le pneumotachographe a été étalonné avant chaque expérience à l'aide d'une seringue d'étalonnage de 20 ml.



Mise en place de la trachéotomie. Crédit : Amandine Divaret-Chauveau

Provocation mécanique de la toux

Un cathéter en silicone silastic était introduit dans la trachée via la trachéotomie puis un mouvement rotatif de ce cathéter était entraîné par un petit moteur électrique (116). L'extrémité du cathéter frottait alors la muqueuse des voies respiratoires pendant une courte période. Le signal électrique du moteur a servi de marqueur pour une identification précise de la durée de la stimulation mécanique. Comme le réflexe de toux est significativement plus fréquemment provoqué pendant l'inspiration que pendant l'expiration, des stimulations mécaniques ont été déclenchées pendant la phase inspiratoire. Le début de l'inspiration était détecté électroniquement dès que le signal de débit atteignait une valeur positive. Quatre durées de stimulation (50, 150, 300 et 600 ms) répétées chacune deux fois dans un

ordre pseudo-aléatoire ont été réalisées. Un intervalle d'au moins une minute de respiration calme et régulière a été laissé entre deux stimuli, au cours duquel le volume courant de référence (VT) a été déterminé (112). Après chaque stimulation, quatre cycles respiratoires ont été enregistrés afin d'étudier le type et l'intensité de la réponse.



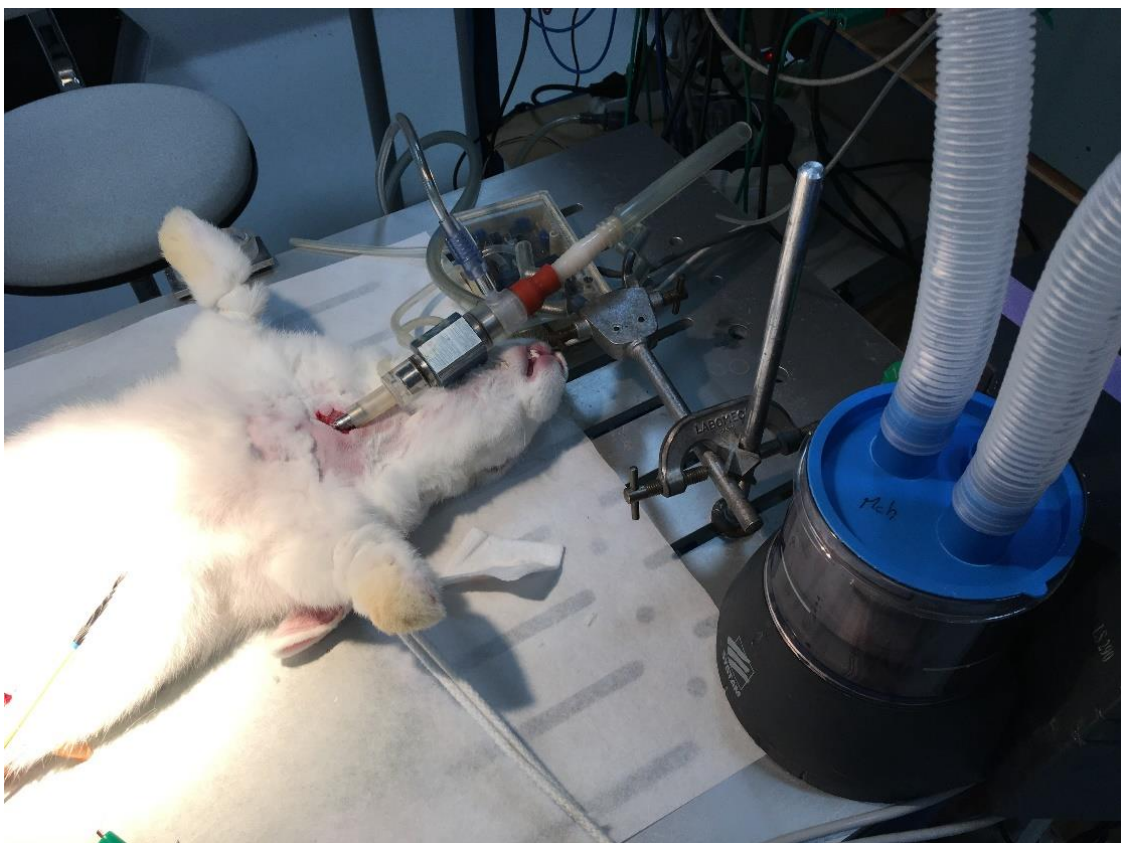
Installation du mécanisme pour provoquer une stimulation mécanique de la toux. Crédit : Silvia Demoulin-Alexikova

Mesure de l'hyperréactivité bronchique

Le débit d'air a été mesuré au niveau de la trachéotomie à l'aide d'un pneumotachographe Fleisch relié à un capteur de pression différentielle dont le signal était intégré au volume. La pression transrespiratoire a été mesurée au niveau d'un orifice latéral de la canule à l'aide d'un transducteur de pression identique. Le calibre des voies respiratoires a été évalué par la résistance respiratoire (R_{rs}) en utilisant la technique d'oscillation forcée (117). Un haut-parleur a généré une onde sinusoïdale, forçant un signal à 20 Hz et la R_{rs} a été calculée comme la partie réelle du rapport complexe de la pression transrespiratoire au débit (impédance respiratoire [Z_{rs}]). Les valeurs proches du débit respiratoire nul

ont été retenues afin de minimiser la composante dépendante du débit de la Rrs. Un test de provocation à la méthacholine (Mch) a été réalisé : des doses de Mch (Sigma-Aldrich, France) successivement quadruplées (0,016, 0,065, 0,25, 1 et 4mg/mL) ont été délivrées pendant 30 secondes par un nébuliseur à ultrasons (LS 290, SYSTAM®, France) connecté à la canule trachéale. La Rrs a été évaluée avant (Rrs initiale) et après chaque dose d'aérosol Mch (Rrs post-Mch). Le test de provocation était arrêté à la dose de Mch ayant induit une augmentation d'au moins 100% de la Rrs pré-Mch.

Deux mesures de Rrs initiale ont été effectuées pendant 60 secondes et moyennées par la suite pour fournir les données de base pour les courbes dose-réponse de Mch. L'hyperréactivité bronchique d'origine allergique induite a été calculée comme la concentration de Mch nécessaire pour induire une augmentation de 50 % (PD50) et de 100 % (PD100) de la Rrs post-Mch par rapport à la Rrs initiale.



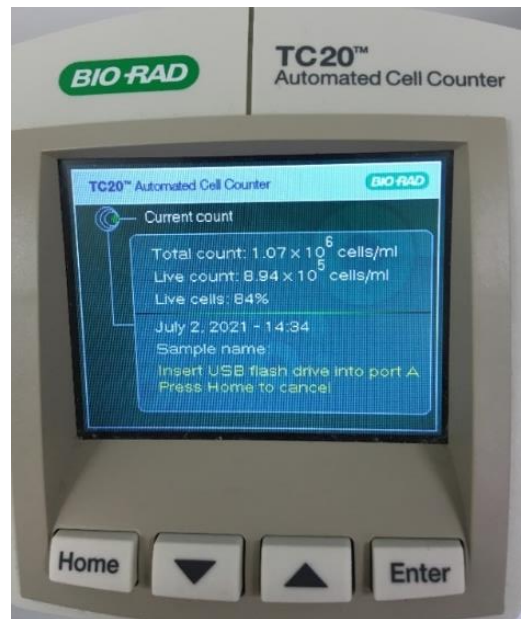
Mécanisme utilisé pour la réalisation du test de provocation à la méthacholine. Crédit : Amandine Divaret-Chauveau

Prélèvements d'échantillons biologiques

Lors des expérimentations finales, trois types d'échantillons biologiques ont été recueillis :

- des selles, prélevées en début d'expérimentation par simple pression abdominale : pour analyse du microbiote digestif, congelées dans un tube sec à -80°C dans l'attente d'un partenariat avec Christelle Knudsen de l'INRAE de Toulouse ;
- du liquide broncho-alvéolaire, prélevé en toute fin d'expérimentation : sur tubes autoclavés, centrifugés à 400G à +4°C pendant 10 min pour extraire le surnageant qui a été réparti en plusieurs aliquots de 1000µL : deux aliquots ont été de nouveau centrifugés à 16 000 G à +4°C pendant 10 min et le culot sec a été conservé à -80°C dans l'objectif de réaliser des analyses microbiologiques ; les autres aliquots de surnageant ont été conservés à -80°C sans nouvelle centrifugation dans le but de dosage ultérieur de cytokines et d'anticorps ;
- du sang, prélevé en cours d'expérimentation animale, au niveau de la veine saphène la plupart du temps ou au niveau de l'artère de l'oreille : un tube de 4 mL était centrifugé à 2500 G à +4°C pendant 20 min puis le serum était aliquoté en microtubes de 500µL pour analyse des IgE spécifiques anti-OVA et dosage de cytokines et un tube de 7 à 10 mL de sang était utilisé pour isoler les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC).

L'isolement des PBMC a été réalisé par Amandine Divaret-Chauveau après apprentissage de la technique auprès de membres de l'équipe 4 du laboratoire IMoPA (David Moulin, chargé de recherche et Fatouma Salem, doctorante). Le sang prélevé sur tube EDTA a été déposé dans un tube Leucosep, préalablement préparé avec 15mL de milieu de séparation (Ficoll). Le tube Leucosep a ensuite été centrifugé 10 min à 1000 G sans frein. Après centrifugation, l'anneau de cellules mononuclées était transféré dans un tube de 15mL et le tube était complété avec du RPMI puis centrifugé 5 min à 450G. Une fois le surnageant retiré, un deuxième lavage était effectué avec 15mL de RPMI suivi d'une centrifugation de 5 min à 450G. Une fois le surnageant retiré, le culot cellulaire était réhomogénéisé avec 1 mL de RPMI et le comptage cellulaire était réalisé à l'aide d'un compteur cellulaire automatique.



Exemple de résultat de comptage cellulaire donné par le compteur cellulaire automatique. Crédit : Amandine Divaret-Chauveau

Après avoir effectué le comptage cellulaire, un dernier lavage au RPMI était effectué puis le culot cellulaire était homogénéisé avec 1mL de mélange sérum de veau foetal/DMSO et placé dans un cryotube (CORNING). Le culot cellulaire était réparti dans plusieurs tubes s'il y avait plus de 10 millions de cellule par mL. Les cryotubes étaient ensuite placés dans une cryobox avec un anneau avant d'être placés dans un congélateur -80°C.

Tous ces prélèvements, stockés dans le congélateur de l'ACBS, ont été accidentellement dégelés en novembre 2022. Ils ne pourront donc pas faire l'objet d'analyse ultérieure. Seul le dosage des IgE anti-OVA avait été réalisé en amont durant l'été 2022.

Analyse des données d'expérimentation

La stimulation mécanique de la trachée a provoqué des réflexes de défense qui ont ensuite été discriminés en réflexe de toux et réflexe d'expiration en fonction du changement de volume courant de référence (VT), du débit expiratoire de pointe (V'Epeak) et de l'activité électromyographique du muscle droit de l'abdomen (EMG). Le réflexe de toux était défini par une augmentation de VT suivie

d'une augmentation de $V'E_{peak}$ associée à une poussée d'activité EMG tandis que le réflexe expiratoire était défini par une augmentation de $V'E_{peak}$ sans augmentation préalable de VT associée à une poussée d'activité EMG (118). Pour tenir compte de la variabilité spontanée entre les respirations, une différenciation non biaisée du réflexe de toux et du réflexe expiratoire a été obtenue par une évaluation statistique du VT entre la stimulation et la respiration de référence. Le VT de la respiration de référence a été déterminé comme la moyenne de trois respirations avant la stimulation et sa limite supérieure comme la moyenne + 3 écarts types. Le réflexe de toux a été identifié lorsque le VT faisant suite à la stimulation était supérieur à la limite supérieure du VT de référence. Le réflexe de défense en réponse à une stimulation mécanique consistait en un ou plusieurs réflexes de toux et/ou expiratoires. De plus, trois types de réponses ont été considérés en tenant compte de tous les réflexes de défense induits par la stimulation mécanique au cours des quatre cycles respiratoires suivants (pas seulement la première réponse) : un réflexe expiratoire uniquement, un réflexe de toux uniquement, et les deux à la fois.

L'utilisation de quatre durées de stimulation différentes a permis d'évaluer la durée seuil entraînant au moins un réflexe de défense. Cette durée seuil a été définie comme la durée la plus courte nécessaire pour provoquer un réflexe de toux ou un réflexe expiratoire. En l'absence de réflexe de défense même avec la durée de stimulation la plus longue, la durée seuil était arbitrairement fixée à 1200ms (112).

Le nombre maximum de réflexe de défense, réflexe de toux et réflexe expiratoire était défini comme le nombre cumulé de chaque réflexe parmi les quatre cycles respiratoires d'une même stimulation mécanique. Le nombre cumulé de réflexe de défense, réflexe de toux et réflexe expiratoire étaient calculé comme la somme, respectivement, des réflexes de défense, réflexe de toux et réflexe expiratoire, induits par les huit stimulations mécaniques réalisés sur un même lapin.

2.4 Les analyses statistiques

Toutes les données quantitatives ont été exprimées par la médiane [IQR 25-75%], et les comparaisons statistiques entre les groupes ont été effectuées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney. Les comparaisons statistiques entre les groupes pour les variables qualitatives ont été effectuées à l'aide du test du chi2 ou du test exact de Fisher. La corrélation entre les variables quantitatives a été explorée à l'aide du coefficient de corrélation de rang de Spearman. Un modèle mixte linéaire généralisé non paramétrique a été utilisé pour ajuster la comparaison statistique des variables quantitatives avec les variables corrélées. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS 9.4.

2.5 Le financement

Les expérimentations animales ont été financées à l'aide d'une subvention ARAIRLOR (Association Régionale d'Aide aux Insuffisants Respiratoires de Lorraine) via la bourse de recherche 2019 obtenue par le Dr Amandine Divaret-Chauveau avec l'intitulé « L'effet protecteur du milieu fermier contre l'hyper réactivité bronchique et tussigène associée à l'asthme allergique : étude pré-clinique sur un modèle de lapin ».

L'analyse des échantillons de poussière a été financée à l'aide d'un don des laboratoires NOVARTIS à l'association ADORR-FC (Association pour le Développement et l'Organisation de la Réhabilitation Respiratoire en Franche Comté) pour le projet ExpoPAMPERS « Etude pré-clinique de faisabilité et pertinence de l'EXPOSITION à des micro-organismes provenant de la ferme pour la Prévention de l'AsthMe chez l'enfant par la Poussière de fERmeS ».

Résultats

1. Trajectoires de toux en dehors d'une infection dans l'enfance et associations avec les maladies allergiques

Article issu de ce chapitre : Divaret-Chauveau A, Mauny F, Hose A, Depner M, Dalphin M-L, Kaulek V, Barnig C, Schaub B, Schmausser-Hechfellner E, Renz H, Riedler J, Pekkanen J, Karvonen AM, Täubel M, Lauener R, Roduit C, Vuitton DA, von Mutius E, Demoulin-Alexikova S, PASTURE study group. Trajectories of cough without a cold in early childhood and associations with atopic diseases. *Clin Exp Allergy*. Dec 2022. <https://doi.org/10.1111/cea.14257>.

Résumé de l'article

Introduction : La toux est un symptôme respiratoire fréquent et non spécifique chez l'enfant, qui, dans la majorité des cas, est présent uniquement durant une infection aiguë des voies respiratoires. Cependant, des enfants présentant des épisodes de toux non associés à une infection des voies respiratoires avec une toux fréquente ou récurrente, parfois déclenchée par des facteurs qui ne provoquent habituellement pas la toux, sont fréquemment rencontrés en pratique clinique. Ce type de toux suggère une toux par excès de sensibilité, qui peut considérablement affecter la qualité de vie de l'enfant et sa famille. Alors que l'atopie est considérée comme étant un des mécanismes étiologiques de cette toux par excès de sensibilité, très peu d'études se sont intéressées aux trajectoires de toux dans l'enfance et à leur relation avec les différentes maladies allergiques.

Objectifs : Identifier les trajectoires de toux en dehors d'une infection de l'âge de un à 10 ans et évaluer leur association avec les sibilants, l'atopie et les maladies allergiques.

Méthodes : Les données sur la toux, les sibilants et les maladies allergiques ont été recueillies à l'aide de huit questionnaires à l'âge de 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, et 10 ans dans la cohorte prospective européenne PASTURE (Protection against Allergy: STUdy in Rural Environment). Le dosage des IgE spécifiques a été réalisé à l'âge de 10 ans. La toux en dehors d'une infection, la toux nocturne en dehors d'une infection et les facteurs déclenchants de la toux ont été utilisés pour construire un modèle de classes latentes de toux durant l'enfance. Seuls les participants ayant répondu à au moins 6 des 8 questionnaires ont été inclus dans les analyses. L'association des sibilants, de l'atopie et des maladies allergiques avec les trajectoires de toux a été évaluée par un modèle de régression logistique ajusté sur le pays, l'atopie parentale, le genre et le statut fermier.

Résultats : Parmi les 961 enfants inclus dans l'étude, l'analyse en classes latentes a permis d'identifier neuf trajectoires de toux en dehors d'une infection : une trajectoire avec peu ou pas de symptômes (59,9 %), cinq trajectoires transitoires aiguës regroupées (24,1 %), une trajectoire transitoire modérée (6,8 %), une trajectoire persistante à début tardif (4,8 %), et une trajectoire persistante à début précoce



(4,4 %). En comparaison avec la trajectoire peu ou pas de symptômes, les autres trajectoires étaient significativement associées avec les sibilants, l'asthme et la rhinite allergique. Pour l'asthme, l'association la plus forte était pour la trajectoire persistante à début précoce (OR=31,00 [14,03–68,51]). Cette trajectoire était inversement associée à l'environnement fermier (OR=0,39 [0,19–0,77]) et présentait une forte prévalence de facteurs déclenchants de la toux ainsi que de sibilants incessants. L'allergie alimentaire était associée aux trajectoires persistantes à début précoce et tardif. La sensibilisation atopique était associée uniquement à la trajectoire de toux persistante à début tardif.

Conclusion : Les trajectoires de toux persistantes à début précoce et tardif sont positivement associées avec les maladies allergiques respiratoires et les allergies alimentaires. Les enfants présentant une toux en dehors d'une infection récurrente avec une toux nocturne et des facteurs déclenchants devraient bénéficier d'une évaluation allergologique complète en plus d'une évaluation de l'asthme. Grandir dans une ferme est associé à une réduction du risque de toux persistante à début précoce et de toux transitoire aiguë.

ORIGINAL ARTICLE

Epidemiology of Allergic Disease

Trajectories of cough without a cold in early childhood and associations with atopic diseases

Amandine Divaret-Chauveau^{1,2,3}  | Frederic Mauny^{3,4} | Alexander Hose⁵ |
 Martin Depner⁶ | Marie-Laure Dalphin⁷ | Vincent Kaulek⁸ | Cindy Barnig^{8,9} |
 Bianca Schaub^{5,10} | Elisabeth Schmausser-Hechfellner⁶ | Harald Renz^{11,12} |
 Josef Riedler¹³ | Juha Pekkanen^{14,15} | Anne M. Karvonen¹⁴ | Martin Täubel¹⁴  |
 Roger Lauener^{16,17} | Caroline Roduit^{16,18} | Dominique Angèle Vuitton¹⁹ |
 Erika von Mutius^{5,6,10} | Silvia Demoulin-Alexikova² | the PASTURE study group

¹Paediatric Allergy Department, University Hospital of Nancy, Vandoeuvre-les-Nancy, France

²EA3450 Développement Adaptation et Handicap (DevAH), University of Lorraine, Nancy, France

³UMR 6249 Chrono-environment, CNRS and University of Franche-Comté, Besançon, France

⁴Unité de Méthodologie en Recherche Clinique, Épidémiologie et Santé Publique, CIC Inserm 143, University Hospital of Besançon, Besançon, France

⁵Department of Paediatric Allergology, Dr von Hauner Children's Hospital, Ludwig Maximilian University of Munich, Munich, Germany

⁶Institute for Asthma and Allergy Prevention, Helmholtz Zentrum München, German Research Centre for Environmental Health, Neuherberg, Germany

⁷Paediatrics, University Hospital of Besançon, Besançon, France

⁸Respiratory Diseases Department, University Hospital of Besançon, Besançon, France

⁹INSERM, EFS BFC, LabEx LipSTIC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur, Ingénierie Cellulaire et Génique, Bourgogne Franche-Comté University, Besançon, France

¹⁰Comprehensive Pneumology Center Munich (CPC-M), Member of the German Centre for Lung Research, Neuherberg, Germany

¹¹Institute for Medicine Laboratory, Pathobiochemistry and Molecular Diagnostics, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany

¹²Laboratory of Immunopathology, Department of Clinical Immunology and Allergology, Sechenov University, Moscow, Russia

¹³Children's Hospital Schwarzach, Schwarzach, Austria

¹⁴Department of Health Security, Finnish Institute for Health and Welfare, Kuopio, Finland

¹⁵Department of Public Health, University of Helsinki, Helsinki, Finland

¹⁶Christine Kühne Centre for Allergy Research and Education (CK-CARE), Davos, Switzerland

¹⁷Children's Hospital of Eastern Switzerland, St Gallen, Switzerland

¹⁸University Children's Hospital Zurich, Zurich, Switzerland

¹⁹EA 3181, University of Franche-Comté, Besançon, France

Correspondence

Amandine Divaret-Chauveau, Paediatric Allergy Department, University Hospital of Nancy, Rue du Morvan, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy, France.
 Email: a.chauveau@chru-nancy.fr

Abstract

Background: Although children can frequently experience a cough that affects their quality of life, few epidemiological studies have explored cough without a cold during childhood.

The members of the PASTURE study group are (in alphabetical order by study centre): Kirjavainen P. V., Roponen M. (Finland); Laurent L. (France), Theodorou J., Böck A., Pechlivanis S., Ege M., Genuneit J., Illi S., Kabesch M., Pfeifferle P. (Germany); Frei R (Switzerland).

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Clinical & Experimental Allergy* published by John Wiley & Sons Ltd.

Funding information

Academy of Finland, Grant/Award Number: 139021, 287675 and 338679; CK-CARE/Kühne Foundation; European Commission, Grant/Award Number: QLK4-CT 2001-00250, FOOD-CT-2006-31708 and KBBE-2007-; European Research Council, Grant/Award Number: 250268; EVO/VTR-funding; Finnish Institute for Health and Welfare; Finnish Cultural Foundation; French National Program for Hospital Research, Grant/Award Number: PHRC IR 2004, 2007 and 2012 DIRC EST PATURE I, II, IV; Juho Vainion Säätiö; Päivikki ja Sakari Sohlbergin Säätiö; Suomen Kulttuurirahasto; Yrjö Jahnssonin Säätiö

Objectives: The objective of the study was to describe the latent class trajectories of cough from one to 10 years old and analyse their association with wheezing, atopy and allergic diseases.

Methods: Questions about cough, wheeze and allergic diseases were asked at 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6 and 10 years of age in the European prospective cohort of Protection against Allergy: STUdy in Rural Environment (PASTURE). Specific IgE assays were performed at 10 years of age. Questions regarding a cough without a cold were used to build a latent class model of cough over time.

Results: Among the 961 children included in the study, apart from the never/infrequent trajectory (59.9%), eight trajectories of cough without a cold were identified: five grouped acute transient classes (24.1%), moderate transient (6.8%), late persistent (4.8%) and early persistent (4.4%). Compared with the never/infrequent trajectory, the other trajectories were significantly associated with wheezing, asthma and allergic rhinitis. For asthma, the strongest association was with the early persistent trajectory ($OR_a = 31.00 [14.03-68.51]$), which was inversely associated with farm environment ($OR_a = 0.39 [0.19-0.77]$) and had a high prevalence of cough triggers and unremitting wheeze. Late and early persistent trajectories were also associated with food allergy. Atopic sensitization was only associated with the late persistent trajectory.

Conclusion: Late and early persistent coughs without a cold are positively associated with atopic respiratory diseases and food allergy. Children having recurrent cough without a cold with night cough and triggers would benefit from an asthma and allergy assessment. Growing up on a farm is associated with reduced early persistent cough.

KEYWORDS

allergic diseases, asthma, atopy, childhood, cough

1 | INTRODUCTION

Cough is a frequent and non-specific respiratory symptom in children that may considerably reduce their quality of life.¹ In the majority of otherwise healthy children, cough is a symptom related to a self-limiting viral upper respiratory tract infection that resolves within a week.²

However, children with coughs that are not associated with a respiratory infection but are often triggered by normally innocuous stimuli are commonly seen in paediatric practice. This type of cough is more frequent in children who also wheeze and the presence of the two concomitant symptoms is well documented in asthma. Regardless of associated asthma, coughs triggered by normally non-tussigenic stimuli highly suggest cough hypersensitivity, where dysregulated afferent neural pathways and/or the central processing of the cough are likely mechanisms^{3,4} with atopy as one of the aetiological mechanisms.⁵

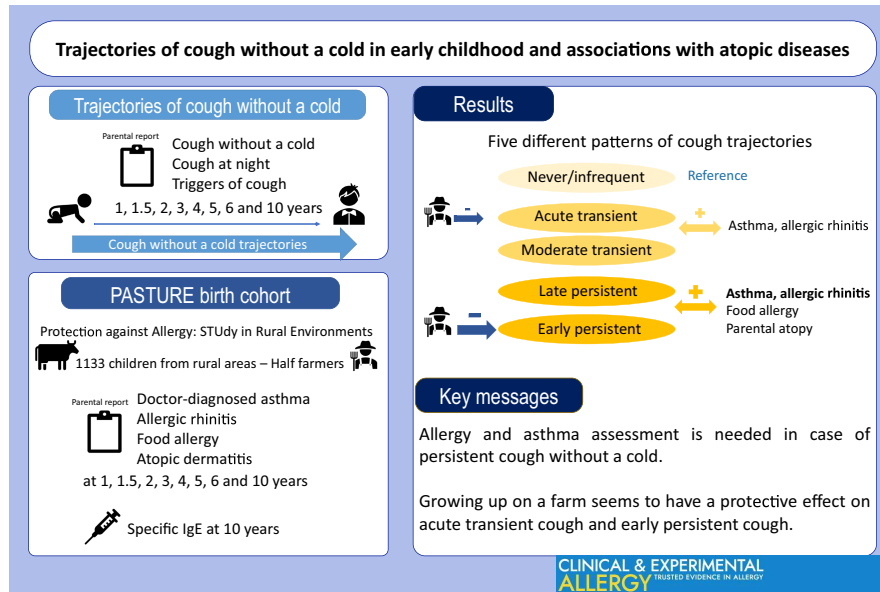
Understanding of the mechanisms behind the transition to chronic cough is still a great challenge. Recently published European Respiratory Society guidelines on the diagnosis and treatment of chronic cough refer to its predominant causes in children.⁶

Key messages

- Age at onset, triggers and persistence of symptoms are important to better characterize cough.
- Recurrent cough with night cough and triggers should lead to allergy and asthma assessment.
- Growing up on a farm is associated with reduced early persistent cough.

Systematic reviews and studies reveal that cough aetiology, frequency and sensitivity differ in many ways throughout childhood^{5,7} and between children and adults,^{8,9} so these guidelines recommend exploring the natural history of cough over time through observational cohort studies.

A data-driven approach, based on unsupervised statistical methods such as (LCA), has increasingly been used to explore the natural course of respiratory symptoms. Most studies using this approach focus on asthma,^{10,11} and a few focus on allergic rhinitis and atopic sensitization.^{12,13} Cough data have been mostly used to



GRAPHICAL ABSTRACT

Five different patterns of cough trajectories during early childhood have been highlighted. Recurrent cough without a cold, with night cough and triggers should lead to allergy and asthma assessment. Growing up on a farm seems to have a protective effect on acute transient cough and early persistent cough.

determine wheeze and asthma phenotypes.¹⁴ While atopy and Th2 cell-mediated inflammation have been considered one of the aetiological mechanisms of cough hypersensitivity syndrome, no study has explored the relationship between cough and all atopic diseases, including food allergy and atopic dermatitis. In most studies that have investigated respiratory symptoms' trajectories throughout childhood, cough, wheezing and asthma were grouped together. Thus, cough is always explored as an asthma symptom and no studies focus on cough patterns.

The European prospective birth cohort PASTURE (Protection against Allergy STUdy in Rural Environment) involves children from rural areas and aims to evaluate risk and protective factors for allergic diseases, offering the opportunity to explore trajectories of cough without a cold in childhood and investigate their link with atopic diseases.

This study aims to assess trajectories of cough without a cold in childhood from 1 to 10 years old in the PASTURE cohort and their associations with atopic diseases, including asthma and the farming environment.

2 | METHODS

2.1 | Study design and population

The PASTURE/EFRAIM (Mechanisms of early protective exposures on allergy development) study focuses on a prospective birth cohort involving children born in 2002 and 2003 in rural areas in five European countries (Austria, Finland, France, Germany and Switzerland) to evaluate risk factors and protective factors for

allergic diseases. The design of the PASTURE study has been described in detail elsewhere¹⁵ and the inclusion and exclusion criteria of this study, detailed in online supplements, were those of the overall PASTURE study.¹⁶ To briefly summarize, pregnant women were recruited during their third trimester of pregnancy and divided into two groups: women who lived on family-run farms where livestock was kept (farm group) and women from the same rural areas who did not live on a farm (non-farmer group). In total, 1133 children were included in this birth cohort. The study was approved by the local research ethics committee in each country, and written informed consent was obtained from the parents.

2.2 | Questionnaires

Questionnaires were self-administered by the parents when the children were 12, 18, 24, 36, 48, 60 and 72 months old and then at 10 years of age. The questionnaires were based on items from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood,¹⁷ the Asthma Multi-centre Infants Cohort Study¹⁸ and the American Thoracic Society.¹⁹ At all time-points, parents were asked "How often has your child had a cough without a cold during the last 12 months?" (or during the last 6 months at the 18- and 24-month follow-ups). The possible answer categories were "never," "less than once a month," "once a month" and "at least twice a month." The same question was asked for "cough at night without a cold." When the children reached 2 years of age, parents were also asked "Has your child ever had an attack of cough without a cold caused by one of the following factors: physical exercise, excitation, change of temperature?"

The length and characteristics of cough are described in the Appendix S1.

Unremitting wheeze was defined by the prevalence of wheeze without a cold or symptoms between wheezes reported by the parents at least once between 18 months and 10 years of age. Children were considered as having unremitting wheeze if the parents answered “one or more” to the question “How many attacks of wheezing has your child had in the last 12 months apart from a cold?” or “no” to the question “Is your child completely cured (without any respiratory complaints) between these episodes?”

Children were defined as having doctor-diagnosed asthma if the parents reported that the child had been diagnosed with asthma by a doctor at least once or if the child had had at least two doctor-diagnosed spastic, obstructive or asthmatic bronchitis in questionnaires at age 4, 5, 6 and 10, independent of a diagnosis reported in the first 3 years of life.

Allergic rhinitis was defined by the simultaneous presence of nasal and eye symptoms without a cold (itchy, runny or blocked nose and red, itchy eyes) and/or a doctor-diagnosed allergic rhinitis from 3 to 10 years of age.

Definitions of atopic dermatitis, food allergy, parental history of atopy and specific IgE (sIgE) measurements are provided in the Appendix S1.

2.3 | Statistical analysis

A LCA was used to identify subtypes of cough symptoms over time.²⁰ The variables “cough without a cold” and “cough without a cold at night” were coded in binary variables “never” versus “at least once during the last 12 months” at each visit. Cough triggered by physical exercise, change of temperature and/or excitation was coded in binary variables “no trigger” versus “at least one trigger” at each visit. The three defined variables were incorporated into the LCA model. As we decided to focus on the three items that supported the diagnosis of asthma as described by the Global Initiative for Asthma (GINA), we did not incorporate the length and characteristics of cough without a cold into the LCA model.

Children with data on cough symptom at less than six of the eight visits were excluded ($n = 172$). Bayesian information criterion (BIC), consistent Akaike information criterion (cAIC), and entropy were used to define the number of classes that best fit the data.²¹ BIC was considered as the most reliable fit statistic and bootstrapped likelihood ratio test was performed in case of discordance between two statistical parameters.²² The probability of an individual belonging to each class was estimated based on conditional probabilities of cough symptoms at each time given a class membership.²³ For sensitivity analyses, a LCA was performed on children with information on cough symptoms at all eight time-points and among the entire PASTURE population.

Multinomial logistic regression was used to investigate the associations between latent class trajectories of cough (outcomes) and

the characteristics of the population (exposures). Logistic regression was used to investigate the associations between atopic diseases (outcomes) and the trajectories of cough (exposures). Multivariable models were adjusted for centre, parental history of atopy, gender and farming status, as there were known associations with allergic diseases and the centres used in the study population selection. Stratified analyses were performed to investigate the associations between respiratory atopic diseases and trajectories of cough according to unremitting wheeze. A data analysis was performed using SAS software version 9.4 (SAS Institute Inc.).

3 | RESULTS

3.1 | Study population

Of the 1133 children enrolled in the PASTURE birth cohort, 961 (84.8%) participated in at least six visits and 80.1% of them ($N = 770$) had a follow-up at the 10-year visit. Population characteristics are presented in Table S1.

Regarding allergic diseases, 815 subjects presented available data for atopic dermatitis, 781 for food allergy, 773 for allergic rhinitis and 775 for doctor-diagnosed asthma. sIgE assays were performed on 521 children at the age of 10.

The point prevalence of cough symptoms during the first 10 years of life is presented in Table 1.

3.2 | Selection of the class solution that best fit the data

According to BIC and entropy, the nine-class solution was identified as the best model to fit the data (Table 2). cAIC was the lowest for the eight-class solution but the bootstrapped likelihood ratio test was significant in favour of the nine-class solution ($p = .01$). Apart from one large class ($n = 576$; 59.9%), the eight other classes represented 4.4% ($n = 42$) to 6.8% ($n = 65$) of the population. Sensitivity analyses are described in the online supplements.

3.3 | Trajectories of cough without a cold

Out of the nine classes of cough without a cold (called cough from now on), five were identified as acute transient trajectories, because only one time-point had >50% of children with a cough (Figure S1). Assuming that having a cough once at 3, 4, 5, 6 or 10 years old is similar, these five classes have been grouped into one trajectory called acute transient ($n = 232$; 24.1%). Together with this acute transient trajectory, the four other classes served to define five different cough trajectories (Figure 1; Figure S2). The never/infrequent (reference) trajectory ($n = 576$; 59.9%) had a low prevalence of a cough and a cough at night during the first 2 years, and then no symptoms after 2 years, and no triggers. The

TABLE 1 Point prevalence of cough symptoms up to 10 years of age.

	1 year	1.5 year	2 years	3 years	4 years	5 years	6 years	10 years
Cough^a								
N	NA	670/931	675/947	802/938	804/953	837/950	784/920	563/770
% (95%CI)		72 (69–75)	71 (68–74)	85 (83–88)	84 (82–87)	88 (86–90)	85 (83–87)	73 (70–76)
Cough without a cold^a								
N	197/947	111/925	136/947	162/938	164/953	182/950	138/919	104/758
% (95%CI)	21 (18–23)	12 (10–14)	14 (12–17)	17 (15–20)	17 (15–20)	19 (17–22)	15 (13–17)	14 (11–16)
Cough without a cold at night^a								
N	29/948	73/926	97/947	11/938	114/933	114/921	106/918	68/758
% (95%CI)	3 (2–4)	8 (6–10)	10 (8–12)	12 (10–14)	12 (10–14)	12 (10–14)	11 (9–14)	9 (7–11)
At least one trigger of cough without a cold								
N	NA	NA	51/944	50/937	61/953	72/950	56/918	41/755
% (95%CI)			5 (4–7)	5 (4–7)	6 (5–8)	8 (6–9)	6 (4–8)	5 (4–7)
Cough triggered by sport								
N	NA	NA	24/945	26/937	41/953	49/950	40/919	33/756
% (95%CI)			2 (1–3)	3 (2–4)	4 (3–6)	5 (4–7)	4 (3–6)	4 (3–6)
Cough triggered by excitation								
N	NA	NA	21/946	18/937	24/953	26/950	19/918	12/756
% (95%CI)			2 (1–3)	2 (1–3)	2 (1–3)	3 (2–4)	2 (1–3)	2 (1–2)
Cough triggered by change of temperature								
N	NA	NA	27/945	23/937	31/953	33/950	37/919	19/757
% (95%CI)			3 (2–4)	2 (1–3)	3 (2–4)	3 (2–5)	4 (3–5)	2 (1–4)
Out of children with cough without a cold								
Duration of cough (more than 2 weeks)								
N	NA	5/106	19/117	13/161	13/164	18/134	14/138	9/104
% (95%CI)		4 (1–8)	14 (8–20)	8 (4–12)	8 (4–12)	12 (7–17)	10 (5–15)	9 (3–14)
Dry cough								
N	NA	57/107	83/132	120/159	104/144	106/153	100/138	87/104
% (95%CI)		53 (44–63)	63 (55–71)	75 (69–82)	72 (65–79)	69 (62–77)	72 (65–80)	84 (77–91)
Productive cough								
N		50/107	49/132	42/159	44/144	51/153	41/138	21/104
% (95%CI)	NA	47 (37–56)	37 (29–45)	26 (20–33)	31 (23–38)	33 (26–41)	30 (22–37)	20 (12–28)

Abbreviations: CI, confidence interval; NA, not applicable.

^aAt least once in the last 12 months (6 months at the 1.5- and 2-year follow-up).

moderate transient trajectory ($n = 65$; 6.8%) had the highest prevalence of a cough, a cough at night, and triggers at 2 years of age, and then decreased, with 15% of children still having a cough at 10 years old. The late persistent trajectory ($n = 46$; 4.8%) had the highest prevalence of a cough, a cough at night, and triggers at 5 years of age, with >50% of children having a cough at 10 years old but only 20% of children reporting triggers. The early persistent trajectory ($n = 42$; 4.4%) had a high prevalence of a cough and a cough at night increasing from 1 to 5 years of age, and more than a 60% prevalence rate of a cough at 10 years old. The early persistent trajectory had the highest prevalence of triggers (from 30% to 60%).

In all trajectories, most coughing episodes lasted less than a week (Figure S3). In both persistent trajectories, about 50% of children

with a cough had episodes lasting a week or more and about 10% had coughing episodes lasting more than 2 weeks. Apart from the reference, dry cough was predominant (Figure S4).

3.4 | Association of cough trajectories with the characteristics of the study population

Growing up on a farm was inversely associated with the acute transient and early persistent cough trajectories (Table 3). These associations persisted after adjustment for the centre and parental history of atopy. Parental history of atopy was positively associated with the acute transient, late and early persistent trajectories. Gender was not associated with cough trajectories.

3.5 | Association of cough trajectories with atopic diseases and sensitization

Unremitting wheeze was associated with all cough trajectories, with the strongest association for the persistent trajectories (Table 4).

Both doctor-diagnosed asthma and allergic rhinitis were positively associated with all cough trajectories, with the strongest associations for early persistent. Regarding pooling asthma or allergic

TABLE 2 Model parameters of performed with the population that participated in at least 6 visits (N = 961).

Number of classes	BIC	cAIC	Entropy
2	4906	4951	0.92
3	4545	4613	0.92
4	4329	4420	0.91
5	4222	4336	0.94
6	4149	4286	0.93
7	4099	4259	0.94
8	4069	4252	0.95
9	4066	4272	0.96
10	4100	4329	0.96

Note: Bold values are the lowest values for BIC and cAIC and the highest value for entropy.

Gray shade: selected model.

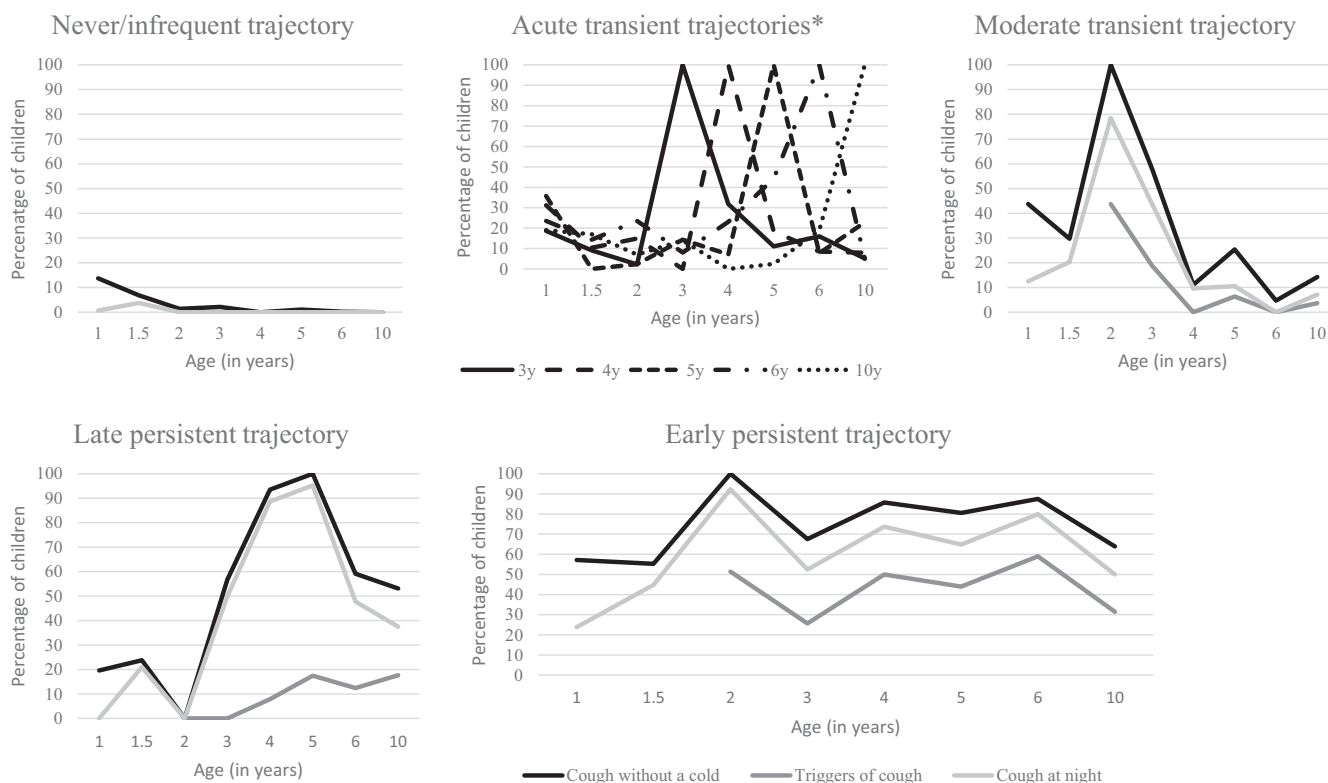
rhinitis diagnosis, 40.5% of children in the early persistent trajectory had neither allergic rhinitis nor asthma (vs. 89.8% in the reference trajectory).

Of all children with doctor-diagnosed asthma, 87% provided information about their age when they were first diagnosed. Among those, 57.5% were first diagnosed before or at the age of three and 8.0% were diagnosed aged six or over. There was no statistical difference in age at the first diagnosis of asthma according to cough trajectories ($p = .2225$). The cumulative prevalence of asthma according to the different cough trajectories is presented in Figure 2. Most asthma diagnoses were reported by the age of five, even in the late persistent trajectory. However, the early persistent trajectory had the highest proportion of reported asthma diagnoses after the age of five (22.7%).

Food allergy was associated with late and early persistent trajectories (Table 4). Atopic dermatitis was not associated with any cough trajectories. sIgE sensitization to seasonal and perennial aeroallergens was associated with the late persistent trajectory.

3.6 | Stratified analyses according to unremitting wheeze

In children with unremitting wheeze (Table 5), doctor-diagnosed asthma was positively associated only with persistent trajectories whereas in children without unremitting wheeze only the association



*Triggers of cough and cough at night for acute transient trajectories are described in Figure E1

FIGURE 1 Description of the five latent classes of cough (after grouping acute transient trajectories together): trajectories of the prevalence of a cough without a cold, a cough without a cold at night and a cough triggered by at least one factor from one to 10 years of age.

TABLE 3 Association between farming status, parental atopy, centre, gender and the latent class trajectories of cough without a cold.

		LCA trajectories of cough without a cold						
All		Reference (n = 576)	Acute transient (n = 232)	Moderate transient (n = 65)	Late persistent (n = 46)	Early persistent (n = 42)	p-value	
Farmer								
No./Total no. (%)	464/960 (48.3)	308/576 (53.5)	91/232 (39.2)	29/64 (45.3)	23/46 (50.0)	13/42 (30.9)	.0007	
OR (95% CI)	NA	1 (reference)	0.56 (0.41–0.77)	0.72 (0.43–1.21)	0.87 (0.48–1.59)	0.39 (0.20–0.77)		
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.58 (0.42–0.80)	0.69 (0.40–1.17)	1.02 (0.54–1.91)	0.39 (0.19–0.77)		
Parental atopy								
No./Total no. (%)	507/957 (53.0)	273/574 (47.6)	138/231 (59.7)	35/65 (53.8)	31/45 (68.9)	30/42 (71.4)	.0003	
OR (95% CI)	NA	1 (reference)	1.64 (1.20–2.23)	1.29 (0.77–2.15)	2.44 (1.27–4.69)	2.76 (1.38–5.49)		
Centre								
Finland								
No./Total no. (%)	173/961 (18.0)	80/576 (13.9)	48/232 (20.7)	17/65 (26.1)	12/46 (26.1)	16/42 (38.1)		
OR (95% CI)	NA	1 (reference)	1.31 (0.81–2.11)	1.36 (0.67–2.78)	1.41 (0.61–3.24)	2.71 (1.14–6.43)		
Austria								
No./Total no. (%)	192/961 (20.0)	127/576 (22.0)	45/232 (19.4)	9/65 (13.8)	9/46 (19.6)	2/42 (4.8)		
OR (95% CI)	NA	1 (reference)	0.77 (0.48–1.23)	0.45 (0.20–1.04)	0.66 (0.27–1.61)	0.21 (0.04–1.01)		
Switzerland								
No./Total no. (%)	204/961 (21.2)	137/576 (23.8)	41/232 (17.7)	9/65 (13.8)	8/46 (17.4)	9/42 (21.4)		
OR (95% CI)	NA	1 (reference)	0.65 (0.41–1.04)	0.42 (0.18–0.97)	0.55 (0.22–1.37)	0.89 (0.34–2.31)		
France								
No./Total no. (%)	173/961 (18.0)	110/576 (19.1)	42/232 (18.1)	11/65 (16.9)	4/46 (8.7)	6/42 (14.3)		
OR (95% CI)	NA	1 (reference)	0.83 (0.52–1.34)	0.64 (0.29–1.41)	0.34 (0.11–1.08)	0.74 (0.25–2.14)		
Germany								
No./Total no. (%)	219/961 (22.8)	122/576 (21.2)	56/232 (20.7)	19/65 (28.3)	13/46 (28.3)	9/42 (21.4)		
OR (95% CI)	NA	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)		
Gender (girls vs. boys)								
No./Total no. (%)	466/961 (48.6)	291/575 (50.6)	104/232 (44.8)	33/64 (51.6)	23/46 (50.0)	15/42 (35.7)	.2641	
OR (95% CI)	NA	1 (reference)	0.79 (0.58–1.08)	1.04 (0.62–1.74)	0.98 (0.53–1.78)	0.54 (0.28–1.04)		

Note: Values in bold: $p < .05$.
 Abbreviation: OR^a, odds ratio adjusted for centre and parents with a history of allergy.

TABLE 4 Association between the latent class trajectories of cough without a cold and unremitting wheeze, atopic diseases up to 10 years of age (asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis and food allergy) and sensitization to food and inhalant allergens at 10 years of age (>0.7 IU/ml).

	All	LCA trajectories of cough without a cold					p-value
		Reference (n = 576)	Acute transient (n = 232)	Moderate transient (n = 65)	Late persistent (n = 46)	Early persistent (n = 42)	
Unremitting wheeze							
No./Total no. (%)	194/933 (20.8)	55/558 (9.9)	59/227 (24.3)	30/63 (47.6)	25/43 (58.1)	25/42 (59.5)	<.0001
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	3.03 (1.20–4.60)	9.18 (5.10–16.52)	13.21 (6.64–26.3)	12.50 (6.22–25.14)	
Asthma							
No./Total no. (%)	100/939 (10.6)	21/561 (3.7)	30/229 (13.1)	11/64 (17.2)	14/43 (32.6)	24/42 (57.1)	<.0001
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	3.48 (1.93–6.30)	5.41 (2.41–12.14)	12.90 (5.78–28.81)	31.00 (14.03–68.51)	
Allergic rhinitis							
No./Total no. (%)	143/938 (15.2)	45/561 (8.0)	50/228 (21.9)	15/64 (23.4)	15/43 (34.9)	18/42 (42.9)	<.0001
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	2.65 (1.69–4.17)	3.08 (1.56–6.08)	5.70 (2.77–11.72)	5.99 (2.92–12.30)	
Asthma or allergic rhinitis							
No./Total no. (%)	180/939 (19.2)	57/561 (10.2)	65/229 (28.4)	17/64 (26.6)	16/43 (37.2)	25/42 (59.5)	<.0001
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	2.96 (1.97–4.47)	2.94 (1.54–5.60)	4.91 (2.44–9.90)	9.85 (4.85–20.02)	
Atopic dermatitis							
No./Total no. (%)	328/933 (35.2)	175/555 (31.5)	85/141 (37.6)	27/65 (41.5)	20/45 (44.4)	21/42 (50.0)	.1920
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.23 (0.88–1.72)	1.37 (0.79–2.38)	1.58 (0.83–3.01)	1.91 (0.98–3.72)	
Food allergy							
No./Total no. (%)	76/930 (8.2)	28/555 (5.0)	21/226 (9.3)	5/60 (7.7)	11/42 (26.2)	11/42 (26.2)	<.0001
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.71 (0.93–3.14)	1.29 (0.47–3.53)	5.71 (2.51–13.00)	5.17 (2.25–11.87)	
Sensitization to perennial aeroallergens							
No./Total no. (%)	105/521 (20.1)	48/296 (16.2)	30/136 (26.1)	7/38 (18.4)	11/22 (50.0)	9/29 (31.03)	.0550
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.32 (0.78–2.24)	1.10 (0.45–2.24)	3.79 (1.50–9.62)	2.06 (0.86–4.91)	
Sensitization to seasonal aeroallergens							
No./Total no. (%)	158/521 (30.3)	71/296 (24.0)	49/136 (36.0)	13/38 (34.2)	12/22 (54.5)	13/29 (44.8)	.0423
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.53 (0.97–2.43)	1.50 (0.71–3.17)	3.33 (1.31–8.41)	1.95 (0.88–4.35)	
Sensitization to food allergens							
No./Total no. (%)	112/521 (21.5)	59/296 (19.9)	29/136 (21.3)	11/38 (28.9)	6/22 (27.3)	7/29 (24.1)	.8061
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.95 (0.56–1.60)	1.62 (0.73–3.56)	1.15 (0.42–3.15)	1.07 (0.43–2.71)	

Note: Values in bold: $p < .05$.

Abbreviation: OR^a, odds ratio adjusted for farmer, centre, sex and parents with a history of allergy.

with the late persistent trajectory remained significant. Allergic rhinitis was positively associated with all trajectories only in children with unremitting wheeze and remained associated only with the acute transient trajectory in children without unremitting wheeze. Prevalence of other atopic diseases and sensitization according to unremitting wheeze are presented in Table S2.

4 | DISCUSSION

To the best of our knowledge, this study is the first to assess trajectories of cough without a cold during the first 10 years of life using statistical methods without a priori assumptions. Apart from children who never or infrequently suffered from a cough in the absence

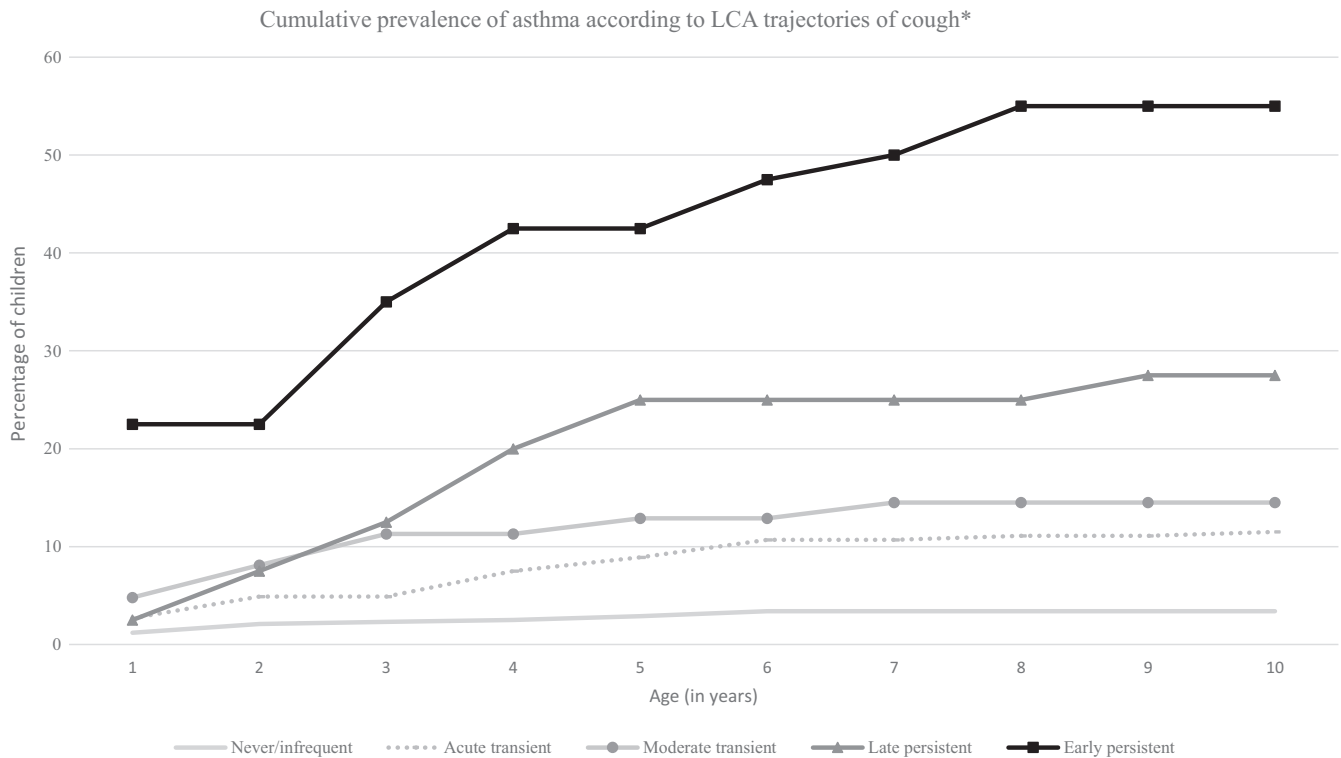


FIGURE 2 Age at first diagnosis of asthma according to latent class trajectories of cough.

of infection (59.9%), eight types of trajectories were identified: five with acute transient cough, two with an early-onset cough that differed thereafter by the degree of resolution, and one with a late-onset cough. Doctor-diagnosed asthma and allergic rhinitis were positively associated with all these trajectories. The strongest associations were found for the late and early persistent trajectories, and both were associated with food allergy and parental history of atopy. Farming status was associated with a lower risk of acute transient and early persistent trajectories.

Even though it was not designed to explore cough, the PASTURE study allowed the present research to study the longitudinal course of cough without a cold in almost 1000 children. The eight measures repeated over time with identical questions at each follow-up, the non-selected nature of this prospective birth cohort, and the high number of participants with available cough data in at least six of the eight follow-ups allowed us to minimize major bias. Multivariable models were used to investigate the association between atopic diseases and cough trajectories and were adjusted for several confounders to minimize confounding bias.

However, one limitation of our study, as in most epidemiological studies, is the reported nature of the symptoms and medical diagnoses. Collected data did not allow us to differentiate chronic from acute cough nor explore other symptoms sought during cough assessment.⁶ A cough without a cold was defined as having such a cough at least once in the past 12 months because of the low number of children having a cough once a month or more. This criterion could be perceived as too broad. However, almost 60% of children

did not report such a cough in the absence of infection. Due to the relatively small size for persistent trajectories, confidence intervals for logistic regressions are wide, reflecting some uncertainty in the value of odd ratios for these trajectories. For these reasons, stratified analyses should be interpreted with caution.

Regarding statistical and theoretical decisions for the LCA, indicator variables were selected to explore the trajectories over time of the three items that supported asthma diagnosis as described by the GINA. Class-solution selection based on multiple fit statistics and sensitivity analyses were performed. The differences in fit statistics found in the population with no missing data could be explained by the reduction in sample size. Finally, the decision to group the five acute transient classes was based on the absence of theoretical and clinical sense to differentiate a cough reported only once by the age of occurrence. Replication in other cohorts would be of interest to validate this model.

Regarding the point-prevalence of a cough without a cold during the first 10 years of life, it ranged from 12% to 21%, with the highest prevalence at 1 year of age. That might be explained by physiological gastro-oesophageal reflux disease in the early infancy, as this aetiology of cough apart from colds has been described as frequent.²⁴ In our cohort, dry cough was predominant except in the reference trajectory. A predominant wet cough in this trajectory suggests a post-viral cough. The prevalence of a cough without a cold, a cough at night and cough triggers were lower than in the Leicestershire cohort (from 34% to 55% from a cough without a cold, 20% to 31% for a night cough and 18% to 26% for triggers).²⁵ This difference could

TABLE 5 Association between the latent class trajectories of cough without a cold, asthma and allergic rhinitis up to 10 years of age in children according to unremitting wheeze.

In children with unremitting wheeze	All (n = 194)	LCA trajectories of cough without a cold						p-value
		Reference (n = 55)	Acute transient (n = 59)	Moderate transient (n = 30)	Late persistent (n = 25)	Early persistent (n = 25)		
Asthma								
No./Total no. (%)	71/190 (37.4)	9/52 (17.3)	19/58 (32.8)	9/30 (30.0)	12/25 (48.0)	22/25 (88.0)		.0001
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	2.28 (0.86–6.06)	1.76 (0.56–5.53)	4.00 (1.25–12.74)	35.38 (7.81–160.28)		
Allergic rhinitis								
No./Total no. (%)	61/189 (32.3)	3/52 (5.8)	17/57 (29.8)	10/30 (33.3)	14/25 (56.0)	17/25 (68.0)		<.0001
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	7.45 (1.86–29.86)	7.52 (1.73–32.71)	25.18 (5.63–112.74)	28.56 (6.12–133.17)		
Asthma or allergic rhinitis								
No./Total no. (%)	86/190 (45.3)	8/52 (15.4)	30/58 (51.7)	11/30 (36.7)	15/25 (60.0)	22/25 (88.0)		<.0001
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	6.62 (2.43–18.02)	2.98 (0.96–9.24)	7.74 (2.42–24.80)	33.38 (7.41–150.32)		
In children without unremitting wheeze								
All (n = 739)								
Reference (n = 503)								
Acute transient (n = 168)								
Moderate transient (n = 33)								
Late persistent (n = 18)								
Early persistent (n = 17)								
Asthma								
No./Total no. (%)	29/738 (3.9)	12/490 (2.4)	11/168 (6.5)	2/33 (6.1)	2/18 (11.1)	2/17 (11.8)		.0472
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	2.55 (1.09–5.99)	2.73 (0.57–13.07)	6.47 (1.24–33.62)	4.97 (0.99–25.05)		
Allergic rhinitis								
No./Total no. (%)	82/738 (11.1)	42/502 (8.4)	33/168 (19.6)	5/33 (15.1)	1/18 (5.6)	1/16 (5.9)		.0282
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	2.19 (1.31–3.65)	1.79 (0.64–5.05)	0.60 (0.08–4.78)	0.53 (0.07–4.18)		
Asthma or allergic rhinitis								
No./Total no. (%)	94/738 (12.7)	49/502 (9.8)	35/133 (26.3)	6/33 (18.1)	1/18 (5.6)	3/17 (17.6)		.0633
OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.97 (1.21–3.23)	1.89 (0.72–4.98)	0.50 (0.06–3.94)	1.59 (0.42–5.99)		

Note: Values in bold: $p < .05$.

Abbreviation: OR^a, odds ratio adjusted for farmer, centre, sex and parents with a history of allergy.

be due to population characteristics: rural in the PASTURE cohort and mostly urban in the Leicestershire cohort. The prevalence of a night cough in the Leicestershire cohort was even higher than in the PARIS birth cohort (14%–18%), including children born in the area of Paris.²⁶

The comparison with other cohorts highlights the originality of our prospective study, which includes several repeated questions about coughing throughout the first 10 years of life. In the PARIS birth cohort,²⁶ apart from the never or infrequent phenotype, two dry night cough phenotypes were identified from one to 4 years old: transient and rising. Due to the difference in age assessment, the rising phenotype might correspond to early persistent or moderate transient trajectories; a late persistent trajectory could not be identified. In the Leicestershire cohort, five phenotypes of cough and wheeze were identified with only two follow-ups (8–13 and 13–18 years): transient (with and without wheeze) and persistent (with and without wheeze/with atopy).¹⁴ A replication in another English cohort with earlier follow-up ages led to differences in three of the five phenotypes,²⁷ highlighting the importance of symptom assessment age.

The protective effect of the farm environment on atopic diseases has already been demonstrated in several studies.^{28–30} Here, we found an inverse association between growing up on a farm and the acute transient and early persistent cough trajectories. The strongest association was for the early persistent trajectory, suggesting that growing up on a farm can protect children from developing an early persistent cough. Studying the different exposures specific to the farm environment could help to better understand the relationship between the farm environment and different cough trajectories.

The association of all the cough trajectories with doctor-diagnosed asthma and allergic rhinitis demonstrates the close relationship between cough, asthma and allergic rhinitis. The association between these atopic diseases, parental history of atopy and acute transient trajectories is contradictory to previous studies.^{14,24,25} Even in children without unremitting wheeze, the acute transient trajectory was associated with doctor-diagnosed asthma and allergic rhinitis. These results suggest that a cough without a cold, even acute, is not physiological and could be related to an allergic hypersensitivity.

The highest prevalence of doctor-diagnosed asthma and allergic rhinitis was found in children with the early persistent trajectory. About 40% of children presenting this cough trajectory did not have a diagnosis of asthma or allergic rhinitis at 10 years of age. These results confirm that an isolated cough without a cold, even at night, is not always asthma.³¹ In our study, doctor-diagnosed asthma was mostly reported before the age of three. At this young age, an asthma diagnosis is clinical based on the child's history of wheezing,³² and we cannot exclude that some children outgrow their asthma later in life. In the presence of unremitting wheeze, almost 90% of children in the early persistent trajectory had doctor-diagnosed asthma. Association of persistent trajectories with doctor-diagnosed asthma was stronger in children with unremitting

wheeze, but it remained positive in children without unremitting wheeze. On the other hand, allergic rhinitis remained significantly associated with all cough trajectories only in children with unremitting wheeze. Even if these analyses need to be interpreted with caution due to the small size of some classes, it confirms that a persistent cough trajectory (with early or late onset) should lead to asthma and allergic investigations, especially if associated with unremitting wheeze.

The late persistent trajectory was the only trajectory associated with aeroallergens sensitization. Sensitization to seasonal and perennial aeroallergens has already been described as positively associated with allergic rhinitis and late-onset symptoms,^{12,33} but sensitization to perennial aeroallergens is also frequently associated with severe and early profiles of allergic rhinitis and asthma,³⁴ which we did not find in the early persistent trajectory.

Finally, the new finding is the positive association of both persistent trajectories with food allergy. Atopy and Th2 inflammation have been considered one of the aetiological mechanisms of cough hypersensitivity syndrome in which the immune system initiates neuroimmune crosstalk. The involvement of neuromodulation, described in numerous studies for cough,³⁵ has also been explored in a few studies for allergic diseases.^{36,37} The association of persistent trajectories with all atopic diseases (except atopic dermatitis), especially if associated with unremitting wheeze, suggests the need to explore atopy with asthma and allergy assessment in case of a persistent cough without a cold and with a high prevalence of night cough and triggers. An isolated cough even with night cough and triggers is not sufficient to diagnose asthma; a history of wheezing should be sought, and objective tests should be performed from the age of five.³⁸ The screening and management of allergic diseases associated with a persistent cough should be part of cough management and could help reduce the burden of a cough. Associated atopic diseases could be a predictive factor for a persistent cough, helping to identify high-risk subgroups likely to benefit from early treatment of atopic diseases in order to avoid instauration of cough hypersensitivity syndrome.

5 | CONCLUSION

We investigated trajectories of cough without a cold from one to 10 years old in a rural prospective birth cohort non selected for risk of atopy. In this population, we identified nine different cough trajectories. The late and the early persistent trajectories, which represent 9.2% of children in our cohort, had the strongest association with asthma and allergic rhinitis and were also associated with food allergy and parental atopy. In clinical practice, these results allow to conclude that children having recurrent cough without a cold and with night cough and triggers should benefit from an asthma and allergy assessment. The strong inverse association between farm environment and an early persistent cough deserves further exploration to seek the prevention of severe cough phenotypes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.D.-C. was involved in acquisition of data, was responsible for statistical analysis and interpretation of data and drafted the manuscript; F.M., A.H. and M.D. were involved in statistical analysis and interpretation; M.-L.D., V.K., C.B., B.S., A.M.K., M.T., C.R. and D.-A.V. were involved in acquisition and interpretation of data; E.S.-H. was involved in data management; H.R. was responsible for laboratory analyses; S.D.-A. was involved in interpretation of data and first draft of the manuscript; E.v.M., J.R., J.P. and R.L. obtained funds, set up the PASTURE birth cohort and were responsible for data collection and management of the study, and all authors reviewed the article critically and approved the final version of the manuscript. The PASTURE study group was involved in the acquisition, management and interpretation of data in Austria, Finland, France, Germany and Switzerland. The members of the PASTURE study group contributed substantially to the design, conception and conduct of the study or the acquisition or analysis of data.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the fieldworkers and other PASTURE/EFRAIM team members. We would like to dedicate this manuscript to Jean-Charles Dalphin, one of the founders of the PASTURE study, who passed away in 2019. We are very grateful to him for his investment in the PASTURE cohort from the outset.

FUNDING INFORMATION

The PASTURE study was supported by the European Commission (research grants QLK4-CT-2001-00250, FOOD-CT-2006-31708 and KBBE-2007-2-2-06), the European Research Council (grant 250268), the CK-CARE/Kühne Foundation, EVO/VTR-funding; the Academy of Finland (grants 139021, 287675, and 338679), the Juho Vainio Foundation, the Yrjö Jahnsson Foundation, the Päivikki and Sakari Sohlberg Foundation, the Finnish Cultural Foundation, the Finnish Institute for Health and Welfare, and the French national program for hospital research (PHRC IR 2004, 2007 and 2012 DIRC EST PATURE I, II, IV).

CONFLICT OF INTEREST

A.D.-C. reports support from the French National Program for Hospital Research for the present manuscript; grants from Don Du Souffle, Fondation du Souffle, ARAIRLOR and Novartis for other studies; a contract with the French Public Agency ANSES as an expert in allergy and paediatric; consulting fees for expertise in food allergy for Stallergens and Aimmune Therapeutics, in paediatric allergy for ALK; support for attending meetings from Mead Johnson, Nutricia, Aimmune Therapeutics and Novartis; and stock options for Essilor Luxottica. F.M. reports a grant from the French public agency ANSES and participation on a Data Safety Monitoring Board for the clinical "Propila-Rifax." C.B. reports payment or honoraria for lectures, presentations, speakers' bureaus, manuscript writing or educational events from Edimark; support for attending meetings and/or travel from AstraZeneca, GSK, Novartis, Chiesi, Sanofi and ALK. B.S. reports support for the present manuscript from DFG, EU

and BMBF, consulting fees and payment or honoraria for lectures, presentations speakers' bureaus, manuscript writing or educational events from GlaxoSmithKline, Novartis, Sanofi and ALK. A.M.K. reports support for the present manuscript from EVO/VTR-funding; the Academy of Finland (grants 139,021, 287,675, and 338,679), the Juho Vainio Foundation, the Yrjö Jahnsson Foundation, the Päivikki and Sakari Sohlberg Foundation, the Finnish Cultural Foundation, the Finnish Institute for Health and Welfare. R.L. reports a research grant from CK-Care/Kühne Foundation, consulting fees for advisory board with Milupa and ALK. D.A.V. reports participation on a data safety monitoring board or advisory board as a member of the working group "plants" of the French Public Agency ANSES. E.v.M. reports support for the present manuscript: Funding of the PASTURE study, the EFRAIM study and the FORALLVENT study; payment made to the University Hospital of Munich (KUM, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich); Grants: Bavarian State Ministry of Health and Care for project "The role of the microbial environmental exposure for the protection against hay fever and asthma" (01/20), BMBF, German Center for Lung Research (01/21), Bavarian State Ministry of Health and Care for "URS Study," 01/21; Royalties or licences: Elsevier GmbH, Georg Thieme Verlag, Springer-Verlag GmbH, Elsevier Ltd., Springer Nature Group; Consulting fees: Chinese University of Hongkong, European Commission, HiPP GmbH & Co KG, AstraZeneca, Imperial College London, OM Pharma, ALK-Abello and Arzneimittel GmbH; Payment or honoraria for lectures, presentations, speakers bureaus, manuscript writing or educational events: Massachusetts Medical Society, Springer-Verlag GmbH, Elsevier Ltd., Böhringer Ingelheim International GmbH, European Respiratory Society (ERS), Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Universität Salzburg, Springer Medizin Verlag GmbH, Japanese Society of Paediatric Allergy and Clinical Immunology (JSPACI), Klinikum Rechts der Isar, University of Colorado, Paul-Martini-Stiftung, Astra Zeneca, Imperial College London, Children's Hospital Research Institute of Manitoba, Kompetenzzentrum für Ernährung (Kern), OM Pharma S.A., Swedish Paediatric Society for Allergy and Lung Medicine, Chinese College of Allergy and Asthma (CCAA), ALK-Abello Arzneimittel GmbH, Abbott Laboratories, Deutscher Apotheker Verlag GmbH & Co. KG; Support for attending meetings and/or travel: Verein zur Förderung der Pneumologie am Krankenhaus Großhansdorf e.V., Pneumologie Developpement, Mondial Congress & Events GmbH & Co. KG, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, Imperial College London, Margaux Orange, Volkswagen Stiftung, Böhringer Ingelheim International GmbH, European Respiratory Society (ERS), Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Österreichische Gesellschaft f. Allergologie u. Immunologie, Massachusetts Medical Society, OM Pharma S. A., Hanson Wade Ltd., iKOMM GmbH, DSI Dansk Borneastma Center, American Thoracic Society, HiPP GmbH & Co KG, Universiteit Utrecht, Faculteit Bètawetenschappen, ALK-Abello Arzneimittel GmbH, Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL), Fabio Luigi Massimo Ricciardolo/Contatto S.r.l., Fraunhofer ITEM Hannover; Patents planned, issued or pending: EvM has patent No. PCT/EP2019/085016 (Barn dust extract for the prevention and

treatment of diseases) pending (Barn dust extract for the prevention and treatment of diseases) pending, royalties paid to ProtectImmun for patent EP2361632 (Specific environmental bacteria for the protection from and/or the treatment of allergic, chronic inflammatory and/or autoimmune disorders, granted on 19 March 2014), and patents EP1411977 (Composition containing bacterial antigens used for the prophylaxis and the treatment of allergic diseases, granted on 18 April 2007), EP1637147 (Stable dust extract for allergy protection, granted on 10 December 2008), and EP 1964570 (Pharmaceutical compound to protect against allergies and inflammatory diseases, granted on 21 November 2012) licensed to ProtectImmun. Patent EP21189353.2. 2021. von Mutius E, Rankl B, Bracher F, Müller C, Walker A, Hauck SM, Merl-Pham J, inventors; PROTEINS IDENTIFIED FROM BARN DUST EXTRACT FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF DISEASES. Patent PCT/US2021/016918. 2021. Martinez FD, Vercelli D, Snyder SA, von Mutius E, Pivniouk V, Marques dos Santos M, inventors; THERAPEUTIC FRACTIONS AND PROTEINS FROM ASTHMA-PROTECTIVE FARM DUST; Participation on a Data Safety Monitoring Board or Advisory Board: Member of the EXPANSE (funded by European Commission) Scientific Advisory Board, Member of the BEAMS External Scientific Advisory Board (ESAB), Member of the Editorial Board of "The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice," Member of the Scientific Advisory Board of the Children's Respiratory and Environmental Workgroup (CREW), Member of the International Scientific & Societal Advisory Board (ISSAB) of Utrecht Life Sciences (ULS), University of Utrecht, Member of External Review Panel of the Faculty of Veterinary Science, University of Utrecht, Member of the Selection Committee for the Gottfried Wilhelm Leibniz Program (DFG), Member of the International Advisory Board of Asthma UK Centre for Applied Research (AUKCAR), Member of the International Advisory Board of "The Lancet Respiratory Medicine," Member of the Scientific Advisory Board of the CHILD (Canadian Healthy Infant Longitudinal Development) study, McMaster University, Hamilton, Canada, Asthma UK Centre for Applied Research, Paediatric Scientific Advisory Board Iceland, Abbott Allergy Risk Reduction Advisory Board. All other authors have no conflict of interest in relation to this work.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

ORCID

Amandine Divaret-Chauveau  <https://orcid.org/0000-0002-2492-9864>

Martin Täubel  <https://orcid.org/0000-0001-8082-1041>

REFERENCES

- Anderson-James S, Newcombe PA, Marchant JM, et al. An acute cough-specific quality-of-life questionnaire for children: development and validation. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5):1179-1185.e1-4.
- Wensaas KA, Heron J, Redmond N, et al. Post-consultation illness trajectories in children with acute cough and respiratory tract infection: prospective cohort study. *Fam Pract*. 2018;35(6):676-683.
- Chung KF, McGarvey L, Mazzone SB. Chronic cough as a neuro-pathic disorder. *Lancet Respir Med*. 2013;1(5):414-422.
- Singh N, Driessen AK, McGovern AE, Moe AAK, Farrell MJ, Mazzone SB. Peripheral and central mechanisms of cough hyper-sensitivity. *J Thorac Dis*. 2020;12(9):5179-5193.
- Ioan I, Poussel M, Coutier L, et al. What is chronic cough in children? *Front Physiol*. 2014;5:322.
- Morice AH, Millqvist E, Bieksiene K, et al. ERS guidelines on the diagnosis and treatment of chronic cough in adults and children. *Eur Respir J*. 2020;55(1):1901136.
- Thach BT. Maturation and transformation of reflexes that protect the laryngeal airway from liquid aspiration from fetal to adult life. *Am J Med*. 2001;111(Suppl 8A):695-775.
- Chang AB. Cough: are children really different to adults? *Cough*. 2005;1:7.
- Chang AB. Pediatric cough: children are not miniature adults. *Lung*. 2010;188(Suppl 1):S33-S40.
- Fuchs O, Bahmer T, Weckmann M, et al. The all age asthma cohort (ALLIANCE) - from early beginnings to chronic disease: a longitudinal cohort study. *BMC Pulm Med*. 2018;18(1):140.
- Bacharier LB, Beigelman A, Calatroni A, et al. Longitudinal phenotypes of respiratory health in a high-risk urban birth cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;199(1):71-82.
- Bougas N, Just J, Beydon N, et al. Unsupervised trajectories of respiratory/allergic symptoms throughout childhood in the PARIS cohort. *Pediatr Allergy Immunol*. 2019;30(3):315-324.
- Hose AJ, Depner M, Illi S, et al. Latent class analysis reveals clinically relevant atopy phenotypes in 2 birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(6):1935-1945.e12.
- Spycher BD, Silverman M, Brooke AM, Minder CE, Kuehni CE. Distinguishing phenotypes of childhood wheeze and cough using latent class analysis. *Eur Respir J*. 2008;31(5):974-981.
- Mutius E, Schmid S. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy*. 2006;61(4):407-413.
- Pfefferle PI, Büchele G, Blümer N, et al. Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: the PASTURE study. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;1:108-115.e3.
- Asher MI, Stewart AW, Mallol J, et al. Which population level environmental factors are associated with asthma, rhinoconjunctivitis and eczema? Review of the Ecological Analyses of ISAAC Phase One. *Respir Res*. 2010;11:8.
- Basagaña X, Torrent M, Atkinson W, et al. Domestic aeroallergen levels in Barcelona and Menorca (Spain). *Pediatr Allergy Immunol*. 2002;13(6):412-417.
- Ferris BG. Epidemiology standardization project (American Thoracic Society). *Am Rev Respir Dis*. 1978;118(6 Pt 2):1-120.
- Lanza ST, Collins LM, Lemmon DR, Schafer JL, PROC LCA. A SAS procedure for latent class analysis. *Struct Equ Model Multidiscip J*. 2007;14(4):671-694.
- Weller BE, Bowen NK, Faubert SJ. Latent class analysis: a guide to best practice. *J Black Psychol*. 2016;46(4):287-311.
- McLachlan GJ, Peel D. *Finite Mixture Models*. John Wiley & Sons; 2004:450.
- Roduit C, Frei R, Depner M, et al. Phenotypes of atopic dermatitis depending on the timing of onset and progression in childhood. *JAMA Pediatr*. 2017;171(7):655-662.
- Chang AB, Robertson CF, Van Asperen PP, et al. A multicenter study on chronic cough in children: burden and etiologies based on a standardized management pathway. *Chest*. 2012;142(4):943-950.

25. Jurca M, Ramette A, Dogaru CM, et al. Prevalence of cough throughout childhood: a cohort study. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177485.
26. Rancière F, Nikasinovic L, Momas I. Dry night cough as a marker of allergy in preschool children: the PARIS birth cohort. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(2):131-137.
27. Spycher BD, Silverman M, Pescatore AM, Beardsmore CS, Kuehni CE. Comparison of phenotypes of childhood wheeze and cough in 2 independent cohorts. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(5):1058-1067.
28. Lluís A, Depner M, Gaugler B, et al. Increased regulatory T-cell numbers are associated with farm milk exposure and lower atopic sensitization and asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):551-559.
29. Roduit C, Frei R, Ferstl R, et al. High levels of butyrate and propionate in early life are associated with protection against atopy. *Allergy*. 2019;74(4):799-809.
30. Depner M, Taft DH, Kirjavainen PV, et al. Maturation of the gut microbiome during the first year of life contributes to the protective farm effect on childhood asthma. *Nat Med*. 2020;26(11):1766-1775.
31. Jurca M, Goutaki M, Latzin P, Gaillard EA, Spycher BD, Kuehni CE. Isolated night cough in children: how does it differ from wheeze? *ERJ Open Res*. 2020;6(4):00217-2020.
32. Reddel HK, Bacharier LB, Bateman ED, et al. Global initiative for asthma strategy 2021: executive summary and rationale for key changes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022;205(1):17-35.
33. Yavuz ST, Oksel Karakus C, Custovic A, Kalayci Ö. Four subtypes of childhood allergic rhinitis identified by latent class analysis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2021;32(8):1691-1699.
34. Gabet S, Rancière F, Just J, et al. Asthma and allergic rhinitis risk depends on house dust mite specific IgE levels in PARIS birth cohort children. *World Allergy Organ J*. 2019;12(9):100057.
35. McGovern AE, Short KR, Kywe Moe AA, Mazzone SB. Translational review: Neuroimmune mechanisms in cough and emerging therapeutic targets. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(5):1392-1402.
36. Udem BJ, Taylor-Clark T. Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(6):1521-1534.
37. Oetjen LK, Kim BS. Interactions of the immune and sensory nervous systems in atopy. *FEBS J*. 2018;285(17):3138-3151.
38. Gaillard EA, Kuehni CE, Turner S, et al. European Respiratory Society clinical practice guidelines for the diagnosis of asthma in children aged 5-16 years. *Eur Respir J*. 2021;58(5):2004173.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Divaret-Chauveau A, Mauny F, Hose A, et al. Trajectories of cough without a cold in early childhood and associations with atopic diseases. *Clin Exp Allergy*. 2022;00:1-14. doi:[10.1111/cea.14257](https://doi.org/10.1111/cea.14257)

1 **Online Supplements**

2

3 **Supplementary methods**

4 *Inclusion and exclusion criteria of PASTURE study*

5 Inclusion criteria were the following: women who lived on family-run farms where livestock
6 was kept (assigned to the farm group) and women from the same rural areas who did not live
7 on a farm (assigned to the non-farmer group). Exclusion criteria were multiple pregnancies,
8 premature birth or birth at home, severe genetic abnormalities at birth, families from cities of
9 more than 5,000 inhabitants and some conditions considered as potential obstacles for follow-
10 ups (e.g., a juvenile mother, a language barrier, or the mother planned to move).

11

12 *Length and characteristics of a cough without a cold*

13 The length and characteristics of a cough without a cold were asked about at each visit using
14 the following questions: “If your child had a cough without a cold during the last 12 months,
15 how long did this cough usually last? A few days, around one week, one to two weeks or more
16 than two weeks” and “If your child had a cough without a cold during the last 12 months, was
17 this cough mostly dry or productive?”. Focusing on the cough in the absence of infection, the
18 non-productive characteristic of a cough was not selected as an indicator variable for the
19 construction of the LCA model. As data on the length of a cough did not allow for
20 differentiation between chronic and acute cough, the length was not taken into account for the
21 construction of the LCA model.

22

23 *Parental history of atopy* was defined as at least one parent having ever had asthma, allergic
24 rhinitis or atopic dermatitis.

25

26 *Atopic diseases*

27 A food allergy was defined when the parents reported that the child of up to ten years of age
28 had been diagnosed with a food allergy by a doctor at least once and/or reported specific
29 symptoms after the ingestion of food in the last 12 months at the 10-year follow-up.

30 Children were defined as having atopic dermatitis when the parents reported that the child had
31 been diagnosed with atopic dermatitis by a doctor at least once between one and ten years of
32 age, and/or had a positive SCORAD score (>0) assessed during a medical examination at the
33 age of one year, and/or had an itchy rash at specific locations in the last 12 months, reported at
34 the 10-year follow-up.

35 The child's age on the first doctor's diagnosis was reported by the parents in the six and 10-
36 year questionnaire for asthma, atopic dermatitis, and allergic rhinitis.

37

38 *sIgE measurements*

39 Blood sampling was performed according to the standard operating procedures of the
40 PASTURE study. sIgE measurements were performed for seven food allergens (hen's egg,
41 cow's milk, hazelnut, carrot, peanut, wheat flour, and soybean) and 13 aeroallergens: five
42 perennial allergens (house dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides*
43 *farinae*, cat, dog, horse) and eight seasonal allergens (ryegrass, grass pollen, *Alternaria*, hazel
44 pollen, mugwort, plantain, birch pollen, alder pollen), using the allergy screen test panel
45 (Mediwiss Analytic, Moers, Germany) (1) at 10 years of age in Finland, France, Germany and
46 Switzerland, but not in Austria. Atopic sensitisation was defined by a sIgE value superior or
47 equal to 0.7 IU/mL.

48

49

50

51 **Supplementary results**

52 *Latent class analyses*

53 A sensitivity analysis conducted on the entire PASTURE population (n=1,133) yielded similar
54 results. A sensitivity analysis conducted on children with no missing data (n=625) gave the
55 lowest BIC and cAIC for the six-class solution; however, entropy was the highest for the eight
56 to 10-class solutions.

57

58

59 **Supplementary reference**

60 1. Herzum I, Blümer N, Kersten W, Renz H. Diagnostic and analytical performance of a
61 screening panel for allergy. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(9):963–6.

62

63 **Supplementary tables**64 **Table S1:** Characteristics of the study population

	All		Farmer		Non-farmer		p-value
	N	%	N	%	N	%	
All	961	100	464	48.3	497	51.7	
Centres							0.3337
Finland	173	18.0	93	20.0	80	16.1	
Austria	192	20.0	92	19.8	100	20.1	
Switzerland	204	21.2	89	19.2	115	23.2	
France	173	18.0	88	19.0	85	17.1	
Germany	219	22.8	102	22.0	117	23.5	
Gender*							0.5635
Female	493	51.4	243	52.4	250	50.5	
Parental history of atopy*							< 0.0001
Yes	507	53.0	199	43.0	308	62.5	

65 *Missing data: sex (n=2), parental history of atopy (n=5). Values in bold: p<0.05.

66

67 **Table S2:** Prevalence of atopic dermatitis and food allergy up to 10 years of age and sensitization to food and inhalant allergens at 10 years (>
68 0.7 IU/mL) in each latent class trajectories of cough without a cold according to unremitting wheeze.

			LCA trajectories of cough without a cold						
			All	Reference (n=576)	Acute transient (n=232)	Moderate transient (n=65)	Late persistent (n=46)	Early persistent (n=42)	
In children with or without unremitting wheeze		N	No./Total no. (%)	No./Total no. (%)	No./Total no. (%)	No./Total no. (%)	No./Total no. (%)	No./Total no. (%)	p-value
Atopic dermatitis	With unremitting wheeze	188	84/188 (44.7)	22/52 (27.7)	20/57 (35.1)	12/30 (40.0)	12/24 (50.0)	18/25 (72.0)	< 0.001
	Without unremitting wheeze	735	236/735 (32.1)	150/499 (30.1)	64/168 (38.1)	14/33 (42.4)	5/13 (27.8)	3/17 (17.6)	0.130
Food allergy	With unremitting wheeze	189	29/189 (15.3)	4/52 (7.7)	5/38 (8.6)	1/30 (3.3)	10/24 (41.7)	9/25 (36.0)	< 0.001
	Without unremitting wheeze	737	45/737 (6.1)	24/502 (4.8)	16/168 (9.5)	3/33 (9.1)	0/17 (0.0)	2/17 (11.8)	0.110
Sensitization to perennial aeroallergens	With unremitting wheeze	107	35/107 (30.0)	3/24 (12.5)	11/31 (35.5)	6/17 (35.3)	9/15 (60.0)	6/20 (30.0)	0.045
	Without unremitting wheeze	413	70/413 (16.9)	45/271 (16.6)	19/105 (18.1)	1/21 (4.8)	2/7 (28.6)	3/9 (33.3)	0.317
Sensitization to seasonal aeroallergens	With unremitting wheeze	107	47/107 (43.9)	9/24 (37.5)	12/31 (38.7)	4/17 (23.5)	11/15 (73.3)	11/20 (55.0)	0.042
	Without unremitting wheeze	413	111/413 (26.9)	62/271 (22.9)	37/105 (35.2)	9/21 (42.9)	1/7 (14.3)	2/9 (22.2)	0.053
Sensitization to food allergens	With unremitting wheeze	107	28/107 (26.2)	5/24 (20.8)	6/31 (19.3)	6/17 (35.3)	6/15 (40.0)	5/20 (25.0)	0.504
	Without unremitting wheeze	413	84/413 (20.3)	54/271 (19.9)	23/105 (21.9)	5/21 (23.8)	0/7 (0.0)	2/9 (22.2)	0.708

69

70

71 **Supplementary figures**

72 **Figure S1:** Prevalence of a cough without a cold in the nine latent classes of cough
73 characterized by trajectories of the prevalence of a cough without a cold from one to 10 years
74 of age

75 **Figure S2:** Detailed description of the five acute transient classes: trajectories of the
76 prevalence of a cough without a cold at night and a cough triggered by at least one factor from
77 one to 10 years of age

78 **Figure S3:** Cough duration in children with a cough without a cold according to the five
79 classes of a cough without a cold during the first 10 years of life.

80 **Figure S4:** Characteristics of cough in children with a cough without a cold according to the
81 five classes of a cough without a cold during the first 10 years of life.

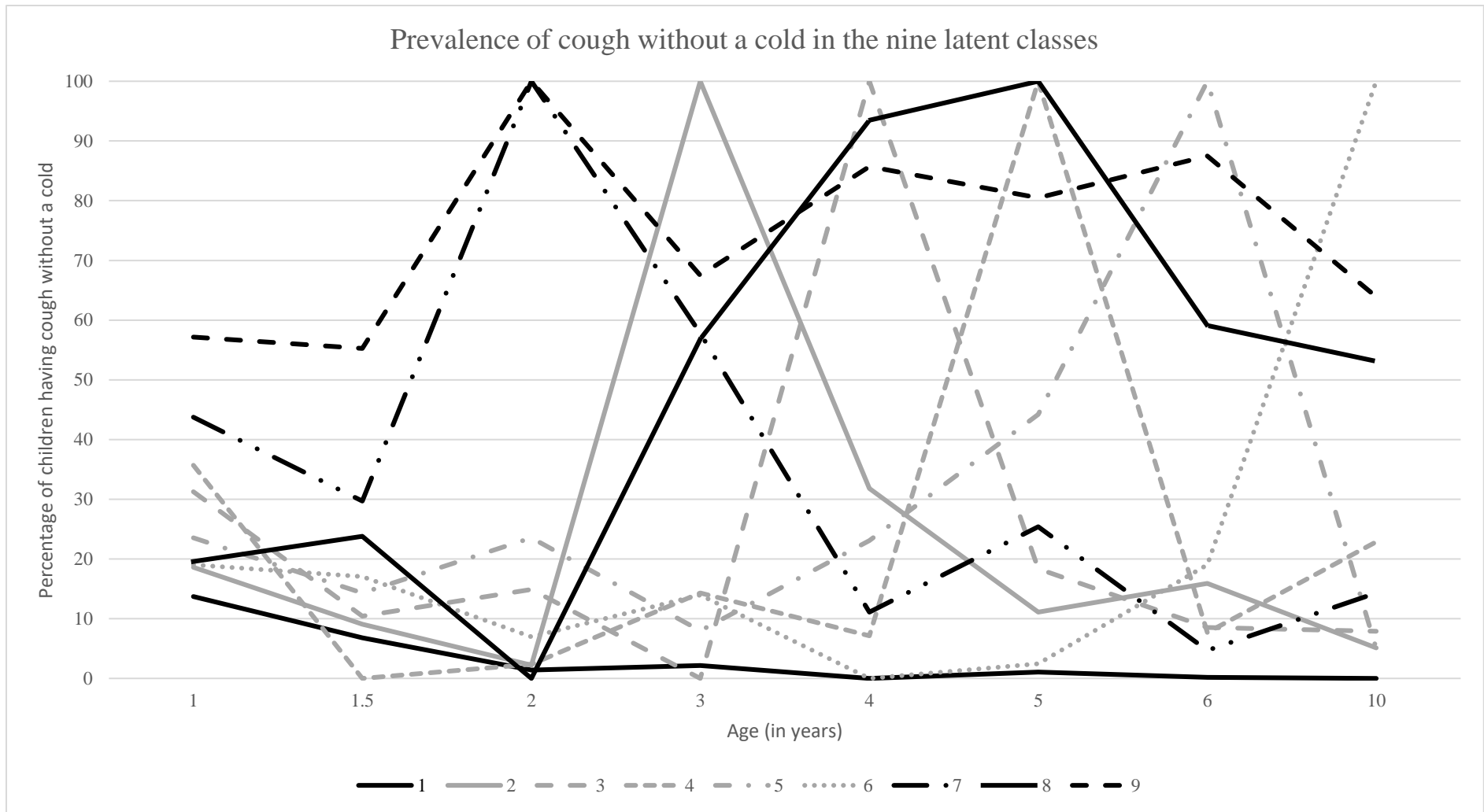


Figure S1

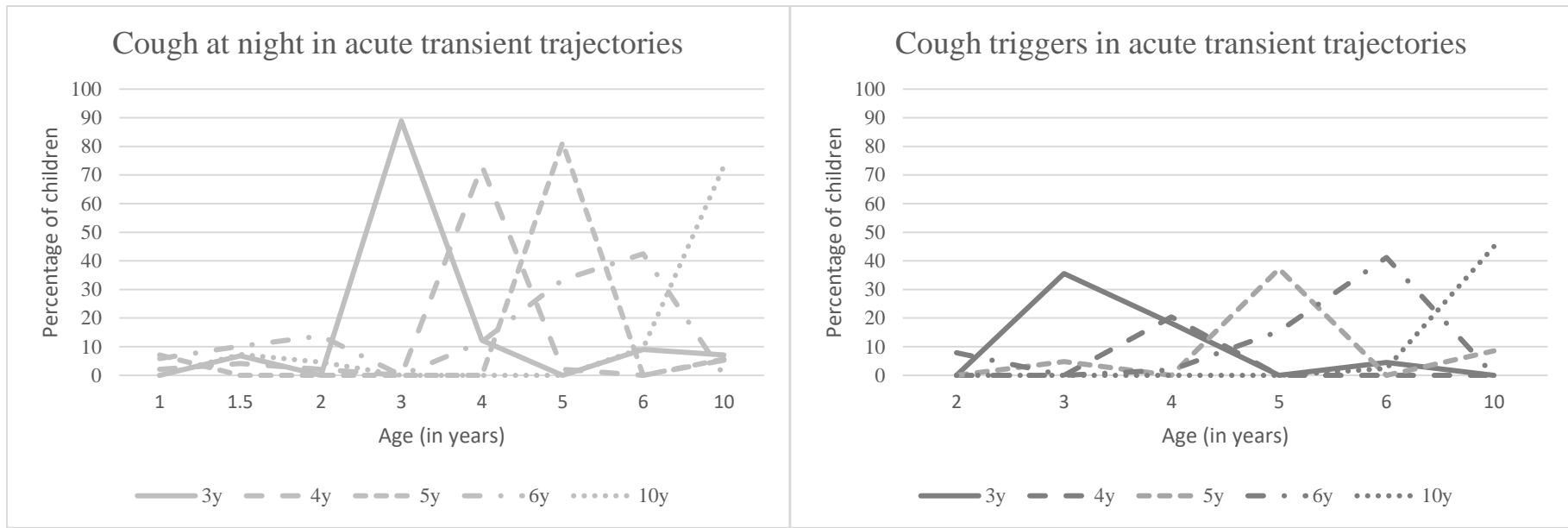


Figure S2

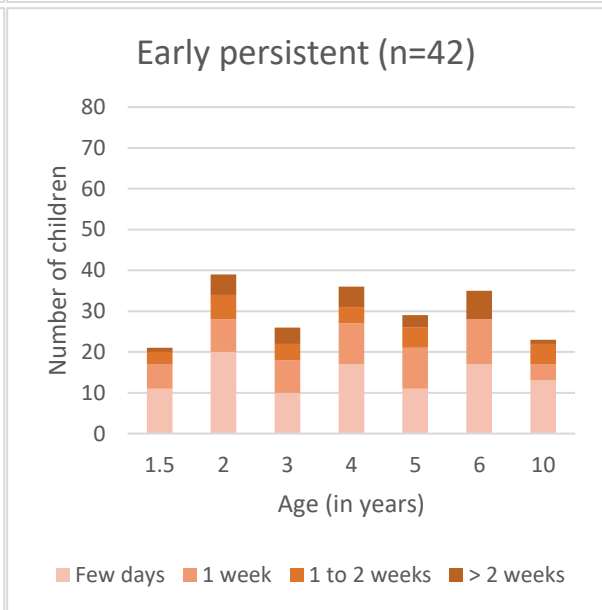
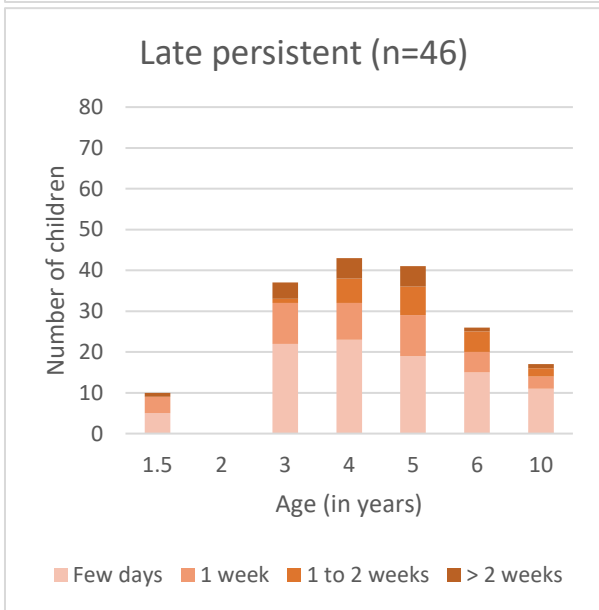
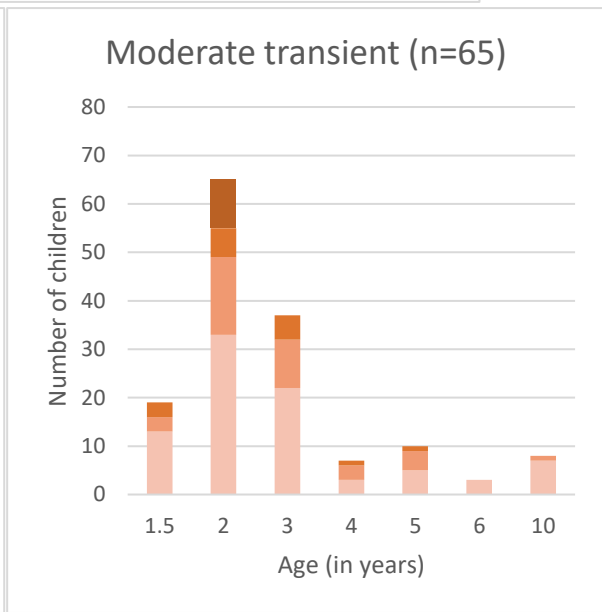
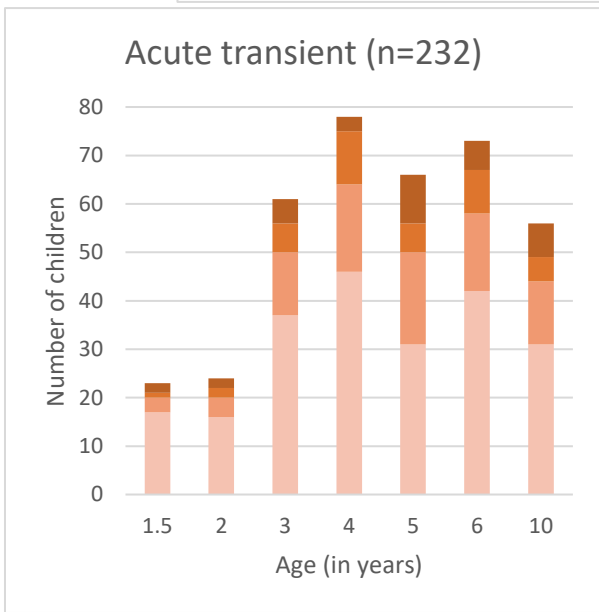
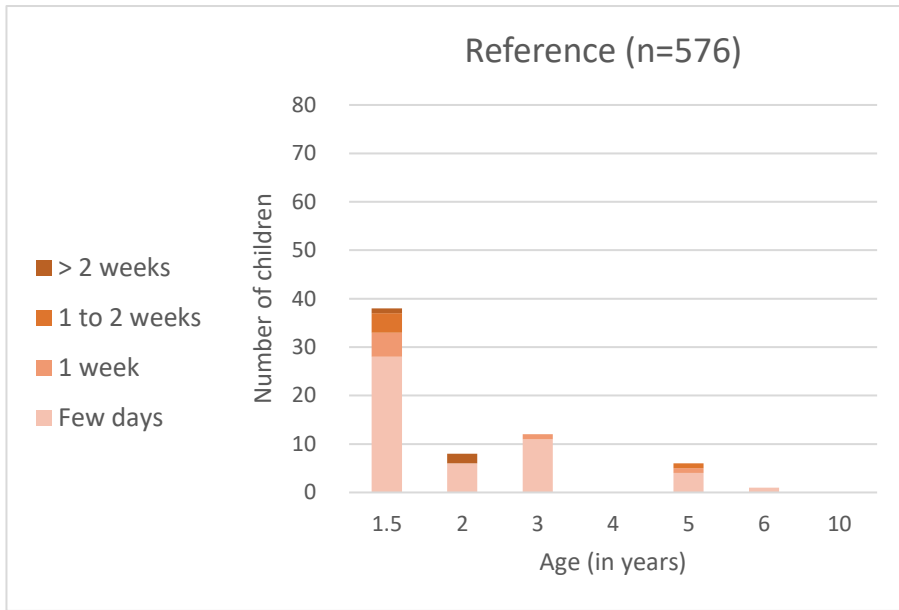


Figure S3

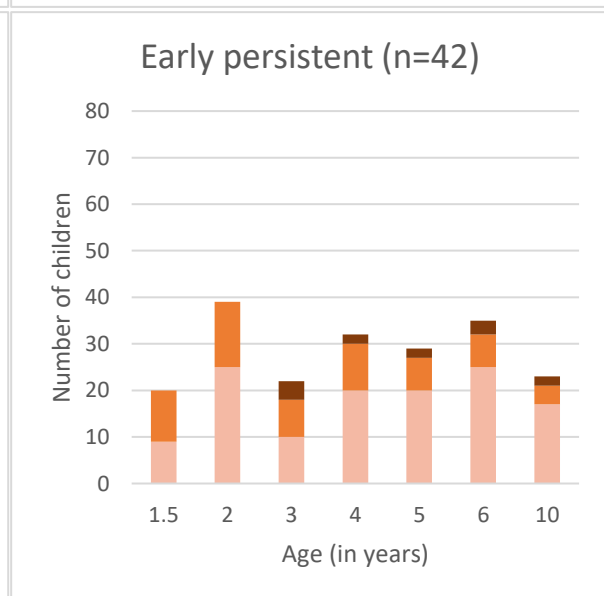
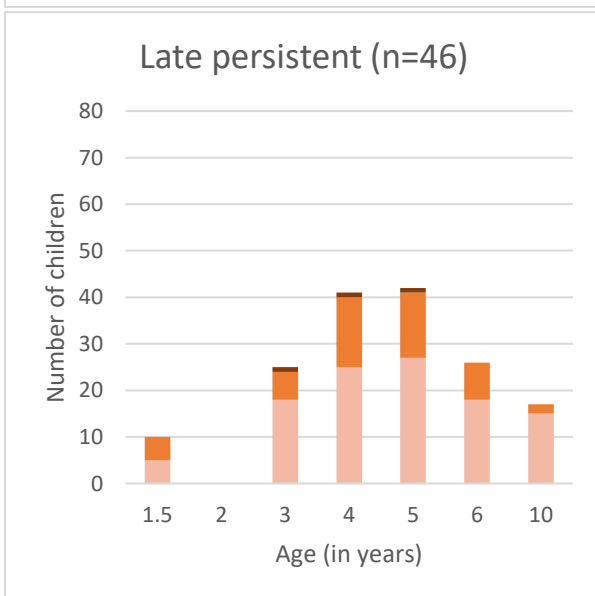
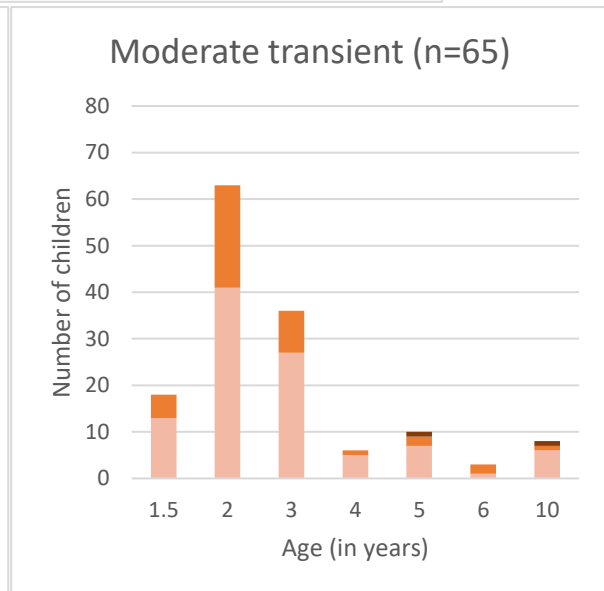
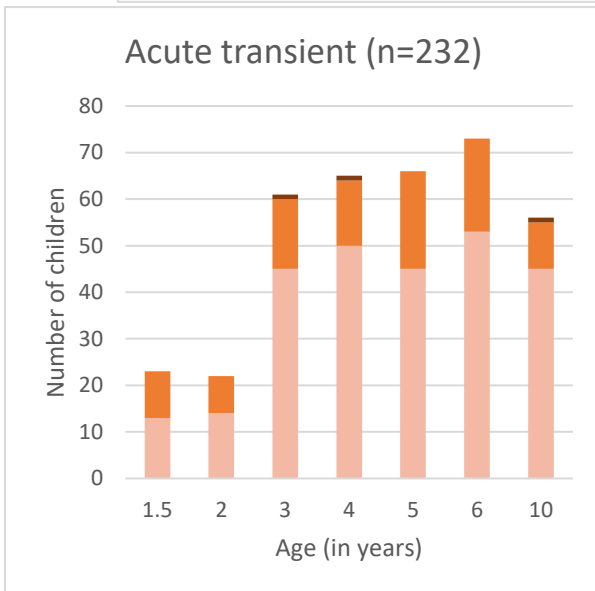
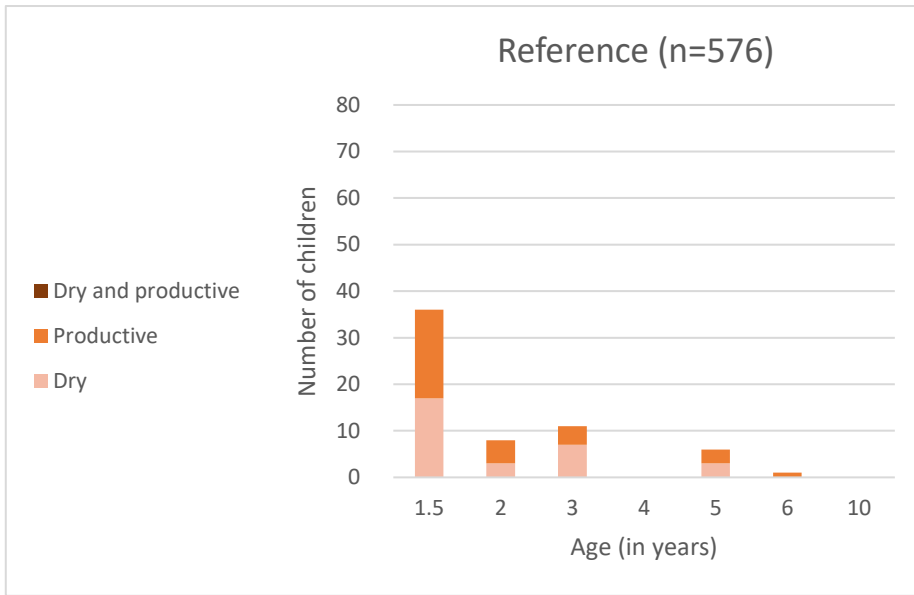


Figure S4

Annexe à l'article scientifique 1

Paramètres des modèles d'analyses en classes latentes réalisées avec la population entière et avec la population sans donnée manquante à titre d'analyse de sensibilité (données non publiées)

Table A1: Model parameters of LCA performed with the entire population (n=1,133)

	BIC	cAIC	Entropy
Number of classes			
2	5,062	5,107	0.89
3	4,693	4,761	0.88
4	4,455	4,546	0.88
5	4,343	4,457	0.91
6	4,264	4,401	0.90
7	4,201	4,361	0.91
8	4,172	4,355	0.92
9	4,177	4,383	0.92
10	4,195	4,424	0.93

Bold values are the lowest values for BIC and cAIC and the highest value for entropy

Table A2: Model parameters of LCA performed with the population without missing data (n=625)

	BIC	cAIC	Entropy
Number of classes			
2	3,324	3,369	0.92
3	3,081	3,149	0.92
4	2,953	3,044	0.93
5	2,895	3,009	0.96
6	2,858	2,996	0.97
7	2,885	3,045	0.97
8	2,926	3,109	0.98
9	2,972	3,178	0.98
10	3,045	3,274	0.98

Bold values are the lowest values for BIC and cAIC and the highest value for entropy

2. Exposition précoce à la poussière de ferme chez un modèle de lapin d'inflammation bronchique d'origine allergique : cela affecte-t-il l'hyperréactivité bronchique et tussigène ?

Article issu de ce chapitre : Divaret-Chauveau A, Foucaud L, Demoulin B, Teston C, Loison P, Le Cann P, Schweitzer C, De Carvalho Bittencourt M, Mauny F, Demoulin-Alexikova S. Early exposure to farm dust in an allergic airway inflammation rabbit model: does it affect bronchial and cough hyperresponsiveness? PLoS ONE Jan 2023; 18(1): e0279498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279498>

Résumé de l'article

Introduction : Ces 50 dernières années, la prévalence des maladies allergiques respiratoires a constamment augmenté dans les pays industrialisés. L'hypothèse de l'Hygiène explique cette progression par la diminution de la biodiversité microbienne à laquelle nous sommes exposés durant la période périnatale. L'effet de l'exposition à l'environnement fermier, modèle d'un environnement microbien riche et diversifié, sur la survenue de pathologies allergiques a été largement étudié mais aucun essai clinique de prévention primaire n'a pu voir le jour du fait de la complexité à appliquer l'environnement fermier à une cohorte de nouveaux-nés. Des études interventionnelles expérimentales chez le modèle animal doivent être développées pour préciser le type d'intervention à proposer.

Objectifs : Evaluer l'effet de l'exposition périnatale à un environnement fermier sur la réactivité bronchique et la sensibilité tussigène chez un modèle de lapin d'inflammation bronchique d'origine allergique.

Méthodes : Un environnement spécifique était appliqué aux lapines gestantes et à leurs lapereaux jusqu'à la sixième semaine après la naissance. L'environnement spécifique appliqué aux lapins correspondait à une zone exempte d'agent pathogène pour le groupe contrôle et à une étable de veaux pour le groupe ferme. A la fin de l'exposition à l'environnement spécifique, les deux groupes étaient hébergés dans la zone conventionnelle de l'Animalerie du Campus Brabois Santé de l'Université de Lorraine puis sensibilisés à l'ovalbumine par voie intrapéritonéale autour de la 12^{ème} semaine de vie. Dix jours après la sensibilisation, les lapereaux ont reçus des aérosols d'ovalbumine pour provoquer une inflammation des voies aériennes. La sensibilisation à l'ovalbumine a été évaluée par le dosage des IgE spécifiques ovalbumine. La sensibilité à la toux a été évaluée par la stimulation mécanique de la toux et la réactivité bronchique a été évaluée par un test à la méthacholine. L'environnement fermier a été caractérisé par la mesure des taux d'endotoxines.

Résultats : Trente-huit lapereaux (18 dans le groupe ferme) ont été inclus. Les taux d'endotoxines de l'environnement fermier variaient de 30 à 1854 UE/m³. Il n'y avait pas de différence significative dans les valeurs des IgE spécifiques à l'ovalbumine entre les deux groupes (p=0,826). Le seuil mécanique pour déclencher une toux ne différait pas entre les deux groupes (p=0,492). Il n'y avait pas de différence pour le nombre de toux (p=0,270) ni l'intensité de la réponse ventilatoire (p=0,735). Après avoir ajusté sur l'âge et le poids, il n'y avait pas de différence dans les résistances respiratoires avant et après le test à la méthacholine.

Conclusion : L'exposition précoce à une étable de veaux n'a pas eu d'impact sur la sensibilité tussigène ni la réactivité bronchique chez des lapins sensibilisés à l'ovalbumine. Ces résultats suggèrent que tous les environnements fermiers ne protègent pas de l'asthme et de l'atopie. Une exposition continue à plusieurs sources de diversité microbologique est probablement nécessaire.

RESEARCH ARTICLE

Early exposure to farm dust in an allergic airway inflammation rabbit model: Does it affect bronchial and cough hyperresponsiveness?

Amandine Divaret-Chauveau^{1,2,3*}, Laurent Foucaud², Bruno Demoulin², Cédric Teston², Pauline Loison⁴, Pierre Le Cann⁵, Cyril Schweitzer^{2,6}, Marcelo De Carvalho Bittencourt^{7,8}, Frédéric Mauny^{3,9}, Silvia Demoulin-Alexikova^{2,10}



1 Pediatric Allergy Department, University Hospital of Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **2** EA3450 Développement Adaptation et Handicap (DevAH), University of Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **3** UMR 6249 Chrono-environnement, CNRS and University of Franche-Comté, Besançon, France, **4** INRS (National Research and Safety Institute for the Prevention of Occupational Accidents and Diseases), Laboratory of Aerosol Metrology, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **5** EHESP School of Public Health, Inserm, IRSET (Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail), UMR_S 1085, Université de Rennes, Rennes, France, **6** Department of Pediatric Lung Function Testing, Children's Hospital, University Hospital of Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **7** Immunology Department, University Hospital of Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **8** Université de Lorraine, UMR 7365 CNRS, IMoPA, Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **9** Unité de Méthodologie en Recherche Clinique, Epidémiologie et Santé Publique, CIC Inserm 143, University Hospital of Besançon, Besançon, France, **10** CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR9017-CIIL-Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, University of Lille, Lille, France

* a.chauveau@chru-nancy.fr

OPEN ACCESS

Citation: Divaret-Chauveau A, Foucaud L, Demoulin B, Teston C, Loison P, Le Cann P, et al. (2023) Early exposure to farm dust in an allergic airway inflammation rabbit model: Does it affect bronchial and cough hyperresponsiveness? PLoS ONE 18(1): e0279498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279498>

Editor: Svetlana P. Chapoval, University of Maryland School of Medicine, UNITED STATES

Received: October 14, 2022

Accepted: December 8, 2022

Published: January 27, 2023

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279498>

Copyright: © 2023 Divaret-Chauveau et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

Abstract

Introduction

Over the past 50 years, the prevalence of allergic respiratory diseases has been increasing. The Hygiene hypothesis explains this progression by the decrease in the bio-diversity of early microbial exposure. This study aims to evaluate the effect of early-life farm exposure on airway hyperresponsiveness and cough hypersensitivity in an allergic airway inflammation rabbit model.

Method

A specific environment was applied to pregnant rabbits and their offspring until six weeks after birth. Rabbits were housed in a pathogen-free zone for the control group and a calf barn for the farm group. At the end of the specific environmental exposure, both groups were then housed in a conventional zone and then sensitized to ovalbumin. Ten days after sensitization, the rabbit pups received ovalbumin aerosols to provoke airway inflammation. Sensitization to ovalbumin was assessed by specific IgE assay. Cough sensitivity was assessed by mechanical stimulation of the trachea, and bronchial reactivity was assessed by methacholine challenge. The farm environment was characterized by endotoxin measurement.

Funding: The present study was supported by Scientific Council of ARAIRLOR (Association Régionale d'Aide aux Insuffisants Respiratoires de Lorraine). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: A.D.-C. reports support from ARAIRLOR for the present manuscript; a contract with the French Public Agency ANSES as an expert in allergy and pediatric; consulting fees for expertise in pediatric allergy for Stallergens, Aimmune Therapeutics and ALK; and support for attending meetings from Mead Johnson, Nutricia, Aimmune Therapeutics and Novartis Pharma SAS. F.M. reports a grant from the French public agency ANSES and participation on a Data Safety Monitoring Board for the clinical "Propila-Rifax". All other authors have no conflict of interest in relation to this work.

Results

A total of 38 rabbit pups were included (18 in the farm group). Endotoxin levels in the farm environment varied from 30 to 1854 EU.m⁻³. There was no significant difference in specific IgE values to ovalbumin ($p = 0.826$) between the two groups. The mechanical threshold to elicit a cough did not differ between the two groups ($p = 0.492$). There was no difference in the number of cough ($p = 0.270$) or the intensity of ventilatory responses ($p = 0.735$). After adjusting for age and weight, there was no difference in respiratory resistance before and after methacholine challenge.

Conclusion

Early exposure to the calf barn did not affect cough sensitivity or bronchial reactivity in ovalbumin-sensitized rabbits. These results suggest that not all farm environments protect against asthma and atopy. Continuous exposure to several sources of microbial diversity is probably needed.

Introduction

Over the past 50 years, the prevalence of allergic respiratory diseases has been constantly increasing in industrialized countries. This progression makes it a major public health problem and the development of prevention methods must today constitute a health priority. The Hygiene hypothesis explains this progression by our modern lifestyles, particularly by the decrease in the biodiversity of microbiological exposure in the perinatal period [1, 2]. The reduction in exposure to microbial agents during pregnancy and the first years of life may favor Th2-mediated allergic disorders [3, 4].

The European birth cohort PASTURE (Protection against Allergy: STUdy in Rural Environments), set up in the early 2000s, has focused on the protective effect of growing up on a dairy farm against Th2-driven allergic responses [5–7]. Up until now, several international cross-sectional studies have demonstrated that early farm exposure protects against allergic diseases, atopic sensitization, and asthma [8, 9]. Early exposure during pregnancy and first years of life seems to be a window of opportunity for immune homeostasis [10]. However, most of the time, farm exposure is continuous during the entire childhood so it is not known if early farm exposure followed by an exposure break is sufficient to provide protection against allergic diseases.

Even though exposure to farm dust, with a high microbial diversity content and a high endotoxin level, is a well-known protective factor from the farm environment [11–13], it is not the only pathway to biodiversity of microbial exposure. Exposures to different animal species during pregnancy, high food diversity in the first year of life, and a diet rich in dairy products, especially cheese, have also been involved in the protective effect of farming lifestyles on allergic diseases and asthma [14–17]. Moreover, the host genetic background in the host-microbiome crosstalk may play an important role [18].

Significant advances in understanding this 'farm effect' have been explored using an approach that compares and contrasts traditional and modern farming environments and populations with closely comparable genetic compositions [19]. However, setting up a clinical therapeutic trial in this direction turned out to be very complex and its attempt failed. Facing the current impossibility of carrying out a clinical therapeutic trial aimed to 'apply' the farm

environment to a cohort of newborns, experimental models would represent a good alternative.

The aim of this study is to set up early-life farm exposure in an allergic airway inflammation rabbit model in order to test the hypothesis that such exposure protects from airway hyperresponsiveness and cough hypersensitivity.

The use of a rabbit model sensitized to ovalbumin in order to model allergic airway inflammation is quite appropriate for this study. In addition to being the model of choice to explore cough reflex and asthma [20], rabbits have, such as humans, undergone a significant distancing from the farm environment to a low microbial diversity environment that occurred over several generations. The specific housing procedures for rabbits (a pathogen-free zone for the control group and an experimental farm for the farm group) were implemented from one week of gestation to six weeks after birth to 'model' an early exposure followed by an exposure break.

Material and methods

Animals

Overall, six pregnant New Zealand rabbits were purchased from HYCOLE (SARL-HYCOLE) at one week of gestation. During housing, food (Safe® 110) and water were given ad libitum and checked daily by the technical staff. The enrichment consisted of hay or small pieces of wood. The animal care and study protocol was approved by the local ethics committee on animal testing (Comité d'éthique en expérimentation animale, CEEA) which is affiliated to the University of Lorraine (Comité d'Éthique Lorrain en Matière d'Expérimentation animale CELMEA C2EA-66) followed by the validation of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche under authorization number APAFIS#26171–2020051915444165 v3 according to recommendations 86–609 CEE issued by the council of the European Communities.

Early life exposure

In order to study the early-life farm effect, pregnant rabbits were divided into two exposure groups according to the type of housing facility used. The rabbits and their offspring were kept in these specific facilities until six weeks after delivery.

The control group was housed in the pathogen-free zone of the Animal House of the University of Lorraine, in order to model an environment with low microbial diversity. In the pathogen-free zone, all material (including food and water) was sterilized before entering the zone. Animal handlers that entered the pathogen-free zone wore specific clothing that had previously been sterilized, as well as two pairs of gloves, overshoes, a mask, and a cap. The pregnant rabbits were housed in a wire mesh cage. Sterilized hemp litter was placed, without direct contact with the rabbits, under the cage to absorb excreta and was changed once a week. The newborn rabbits had a nest made of sterilized cardboard shavings. Regular sanitary controls performed during pregnancy and the offspring's first month of life revealed no pathogenic bacteria.

The farm group was housed in a calf barn at La ferme de la Bouzule, an experimental farm of the University of Lorraine. The calf barn comprises a small enclosed barn with limited wind and bird entry, where feed and bedding materials for calves are delivered by hand. The pregnant rabbits were housed in a wire mesh cage, directly next to the calves' pen, with hay and straw bedding that was changed once a week. The newborn rabbits had a nest made of straw with a direct entrance to their mothers' cage.

The rabbit feed was the same for both groups. From their seventh week of life, all the newborn rabbits were weaned and housed in the conventional zone of the Animal House of the University of Lorraine with a 16-hour day and 8-hour night cycle. After weaning, the rabbit mothers were proposed for adoption.

Endotoxin levels in the farm environment

A sampling of airborne endotoxins was performed on three occasions, using a 37 mm polystyrene 3-piece closed-face cassette (Millipore[®], France). The closed-face cassettes were mounted with a fiberglass filter (GF/B glass microfiber filter, pore size 1.0 μm , Whatman) as the collection support and another similar filter as the backing support. The fiberglass filters were previously heated at 250°C for 120 minutes to make them pyrogen-free. The cassettes were connected to portable constant flow pumps (Apex2, Casella, USA) and the sampling was performed at a flow rate of 2 L.min⁻¹. The flow rate was calibrated and controlled before and after sampling using a bubble flow meter (Gilian[®], Gilibrator, USA). All samples were taken at about 1.7 m from the ground.

The endotoxin concentration was assessed by introducing 5 mL of pyrogen-free water into each cassette, followed by shaking for 20 minutes at 2000 rpm (Multi-Reax[®] shaker, Heidolph[®], Germany). The endotoxin concentration in the extract was assayed using the LAL kinetic chromogenic detection assay following the recommendations of the manufacturer, using Kinetic-QCL[®] kits (Lonza Group Ltd). The limit of detection of the endotoxin analysis was 0.005 EU.ml⁻¹, i.e., 0.025 EU per filter. The volume of air sampled was calculated based on the flow rate and the duration of sampling (around five hours), and the airborne endotoxin concentration was thus expressed in endotoxin units (EU) per cubic meter (EU.m⁻³).

Sensitization and provocation of airway inflammation with ovalbumin

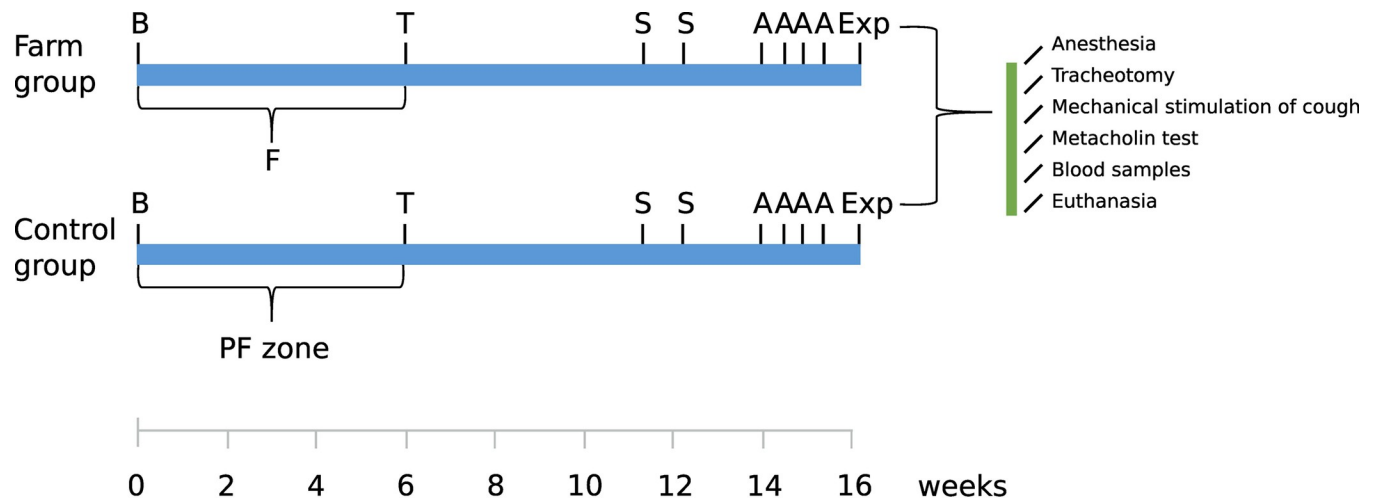
The sensitization to ovalbumin (OVA) and challenge protocol used in this study are shown in Fig 1 and described in detail in the S1 File. The anti-OVA Immunoglobulin E (IgE) antibodies (undiluted sera) were determined by using the Rabbit Anti-OVA IgE ELISA kit from MyBioSource (San Diego, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

Anesthesia and animal preparation

The anesthesia, analgesia, euthanasia, and animal preparation are detailed in the S1 File. For technical reasons, we were forced to carry out the final experiments (anesthesia and provocation of cough) earlier (20 days before) in the farm group than in the control group.

Mechanical provocation of cough in anesthetized and tracheotomized rabbits

The apparatus developed to elicit a discrete mechanical challenge to the trachea has been described in detail and validated in previous reports [21]. To describe it briefly, a rotating silastic catheter introduced in tracheotomy is driven by a small electric motor that spins the catheter and rubs its tip onto the airway mucosa for a short period. The electrical signal from the engines serves as a marker for accurate identification of the stimulus time course. As cough reflex is significantly more frequently provoked during inspiration compared to expiration, mechanical stimulations were triggered during the inspiratory phase. The beginning of inspiration was detected electronically as soon as the flow signal reached a positive value. Four stimulation durations (50, 150, 300, and 600 msec) that were each repeated twice in a pseudorandom order were performed. An interval of at least one minute of quiet and regular



B: birth of rabbits

F: farm exposure

PF zone: pathogen-free zone exposure

T: transportation to the conventional zone of Animal House

S: sensitization to ovalbumin

A: aerosol with ovalbumin

Exp: final experimentation

Fig 1. Sensitization and challenge protocol.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279498.g001>

breathing was allowed to elapse between two stimuli, during which the reference tidal volume (VT) was determined [22]. After each stimulation, four breath cycles were registered in order to study the type and intensity of the response.

The mechanical stimulation of the trachea provoked defensive reflexes (DR) that were further discriminated into a cough reflex (CR) and an expiration reflex (ER) according to the change in VT, peak expiratory flow (V'_{Epeak}), and rectus abdominis electromyographic (EMG) activity [23]. The CR was defined by an increase in VT followed by an increase in V'_{Epeak} associated with a burst of rectus abdominis EMG activity (Fig 2), and the ER was defined by an increase in V'_{Epeak} without a preceding increase in VT associated with a burst of rectus abdominis EMG activity [24]. To take into account the spontaneous between-breath variability, an unbiased differentiation of the CR and the ER was achieved by a statistical evaluation of the VT between the stimulation and reference breaths. The VT of the reference breath was determined as the mean of three breaths prior to stimulation and its upper limit as the mean plus three standard deviations. The CR was identified when the VT of the stimulation breath was higher than the upper limit of the reference VT. The defensive response to one mechanical stimulation consisted of a bout of one or several CRs and/or ERs. In addition, three types of responses were considered while taking into account all the DRs induced by the mechanical stimulation during the next four breath cycles (not only the first response): an ER only, a CR only, and both an ER and a CR.

The use of four stimulation durations allowed the assessment of the duration–response curve and enabled the assessment of the defensive response threshold (DT) to mechanical stimulation. The DT was defined as the shortest stimulation duration necessary to provoke a

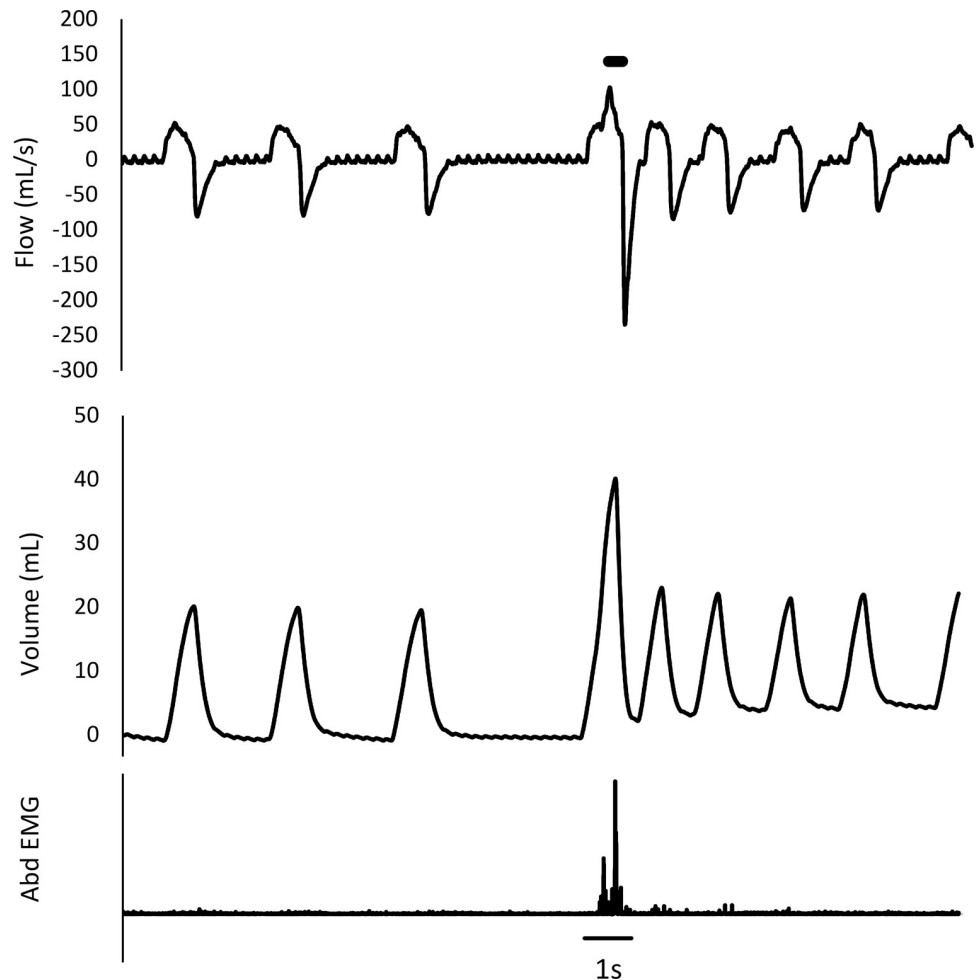


Fig 2. Typical cough reflex to mechanical stimulation of the trachea. The increased expiratory flow is associated with a burst of rectus abdominis EMG activity and preceded by an increase in the tidal volume. The thick bar on the top indicates the moment of mechanical stimulation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279498.g002>

response initiated by the CR (cough threshold [CT]) or ER (expiration reflex threshold [ET]). In the absence of any DR, even with the longest stimulation duration, the threshold was arbitrarily set to 1200 msec.

The maximal numbers of DR, CR, and ER were defined as the cumulative numbers of each reflex among the four cycles studied during one mechanical stimulation. The cumulative numbers of DR, CR, and ER were calculated as the sums of DR, CR, and ER numbers, respectively, induced by the eight mechanical stimulations performed on each rabbit.

Measurement of allergen-induced airway responsiveness to methacholine

The respiratory measurements were performed as described previously [25]. The airflow was measured at the tracheal opening using a Fleisch pneumotachograph connected to a differential pressure transducer, the signal of which was integrated with the volume. The transrespiratory pressure was measured at a side port of the cannula using an identical pressure transducer. The airway caliber was assessed by the respiratory resistance (Rrs) using the forced oscillation technique. A loudspeaker generated a sine wave, forcing a signal at 20 Hz and the

Rrs was computed as the real part of the complex ratio of transrespiratory pressure to flow (respiratory impedance [Zrs]). The values near zero breathing flow were retained in order to minimize the flow-dependent component in Rrs. A methacholine (Mch) challenge was performed: successive quadrupled doses (0.016, 0.065, 0.25, 1, and 4mg.mL⁻¹) of Mch (Sigma-Aldrich, France) were delivered for 30 seconds by an ultrasonic nebulizer (LS 290, SYSTAM[®], France) connected to the tracheal cannula. Rrs was assessed after each Mch aerosol. Challenge was stopped when the resistance was superior or equal to a two-fold initial Rrs.

Two measurements of baseline Rrs during 60 seconds were performed and averaged thereafter to provide the baseline data for the Mch dose-response curves. Allergen-induced airway responsiveness to Mch was calculated as the Mch concentration needed to induce a 50% (PD50) and a 100% (PD100) increase in the Rrs when compared to baseline.

Statistical analysis

All quantitative data were expressed by the median [IQR 25–75%], and statistical comparisons between groups were performed using non parametric Mann-Whitney U test. Statistical comparisons between groups for qualitative variables (DT, CT and ET) were performed using chi square test or exact fisher test. Correlation between quantitative variables was explored using Spearman's rank correlation coefficient. A non-parametric generalized linear mixed model was used to adjust the statistical comparison of quantitative variables with the correlated variables. Statistical analyzes were performed using SAS 9.4.

Results

A total of six pregnant rabbits were used for this study with three rabbits and their offspring in each group. A total of 38 rabbit pups were included in the present study: 20 from the pathogen-free zone group, from now on called the control group (C), and 18 from the farm group (F).

At the time of final assessment of cough and bronchial reactivity, the rabbit pups in F were lighter (F: 2272 g [2075–2435] vs. C: 2637 g [2567–2797]; $p < 0.001$) and younger (F: 90 days [84–96] vs. C: 110.5 days [104–117]; $p < 0.001$) than the rabbit pups in C.

Endotoxin level in the farm environment

Among the three samples of endotoxins in the calf barn, levels varied according to the days the samples were taken. The highest level was found in winter during the delivery of bedding material and the lowest in spring. The results were: 1854 EU.m⁻³ in February, before the housing of pregnant rabbits, 109 EU.m⁻³ in March, during the second week of pregnancy, and 30 EU.m⁻³ at the beginning of May, when the rabbit pups were one month old.

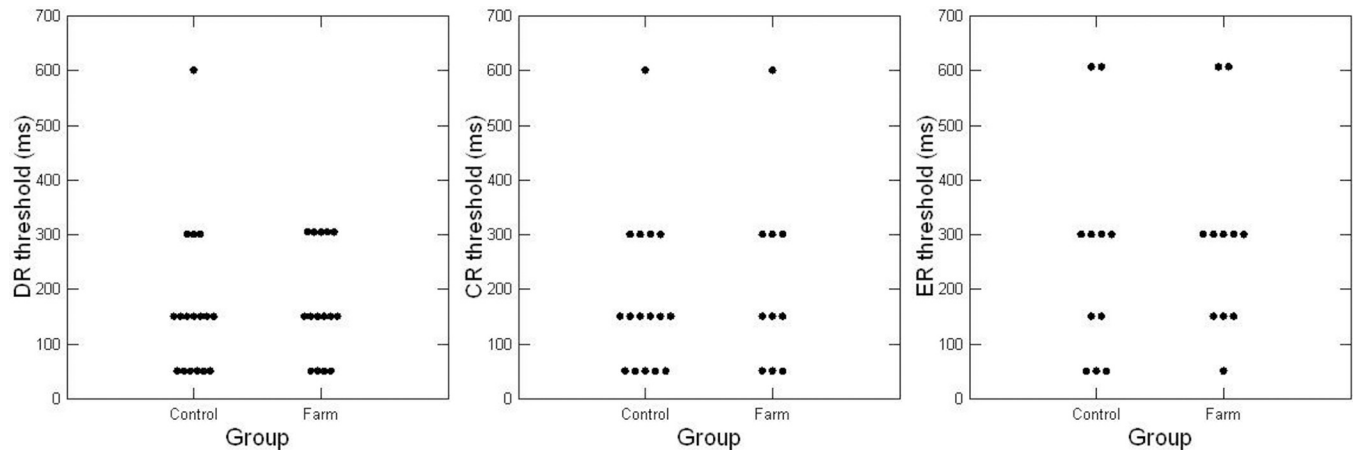
Sensitization to ovalbumin

Specific IgE to OVA assays were performed in 27 rabbits (16 from C and 11 from F). There was no difference in IgE sensitization to OVA between groups. The median was 4.66 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [4.07–6.19] in C vs 4.86 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [2.87–5.80] in F ($p = 0.826$).

Cough and expiration reflexes

Results regarding chemical stimulation of cough in conscious rabbits are reported in [S2 File](#).

Two rabbits in each group died at anesthesia induction. Thus, the following measurements are presented for 18 rabbits from C and 16 from F. There was no difference in defensive



DR: defensive reflex; CR: cough reflex; ER: expiratory reflex

Fig 3. Defensive reflexes threshold (in msec) in the control group and farm group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279498.g003>

reflexes threshold between C and F (Fig 3, $p = 0.862$ for DT, $p = 0.492$ for CT, and $p = 0.885$ for ET). Types of DR did not differ between groups (Table 1, $p = 0.249$).

The estimated median of DT was 150 msec in both groups (Table 2). There was no difference between groups in the maximal numbers of DR, CR, and ER per stimulation or in the cumulative numbers of DR, CR, and ER induced by all the mechanical stimulations (Table 2).

There was no correlation in the intensity of DR, CR, and ER with age or weight (S1 Table). The intensity of ventilatory responses did not differ between groups (Table 3), even after adjustment for age and weight (Table 4).

Bronchomotor responsiveness

Baseline Rrs was 23.13 hPa.s/L [21.17–27.43] in C and 21.86 hPa.s/L [18.06–25.66] in F and was not correlated with age or weight (S1 Table). There was no difference in baseline Rrs between groups whether before (Table 3) or after adjustment for weight (Table 4). Baseline Rrs was significantly higher in F after adjustment for age but this difference was no longer significant after adjustment for weight ($p = 0.061$, Table 4).

PD50 and PD100 were not correlated with baseline Rrs but there was a moderate correlation with weight and age (S1 Table). In the raw data analysis, there were significantly lower values for PD50 and PD100 in F (Table 3). However, after adjustment for age and/or weight, there was no significant difference between groups (Table 4).

Discussion

In our study, early exposure of rabbits to farm environment did not significantly affect response to ovalbumin sensitization, ventilatory defensive reflexes provoked by mechanical

Table 1. Type of defensive reflex.

Type of defensive response	Control Group	Farm Group
None	1	1
Expiratory only	1	5
Cough only	6	4
Mixed	10	6

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279498.t001>

Table 2. Defensive reflexes induced by mechanical stimulation (threshold, maximal number, and cumulative number).

	Control Group	Farm Group	p-value
	Median [Q1-Q3]	Median [Q1-Q3]	
Defensive reflex threshold			
Defensive Reflex	150 [50–300]	150 [100–300]	0.862
Cough Reflex	150 [50–300]	300 [150–1200]	0.492
Expiratory Reflex	450 [150–1200]	300 [225–1200]	0.885
Maximal number of defensive reflexes per stimulation			
Defensive Reflex	2 [1–3]	2.5 [1–3.5]	0.448
Cough Reflex	1 [1–2]	1 [0–2]	0.270
Expiratory Reflex	1 [0–2]	1 [1–2]	0.342
Cumulative number of defensive reflexes (induced by the eight mechanical stimulations)			
Defensive Reflex	6 [4–8]	6 [4–11]	0.744
Cough Reflex	4 [2–6]	2 [0.5–5.5]	0.289
Expiratory Reflex	3 [0–3]	2 [1–4.5]	0.626

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279498.t002>

stimulations of the trachea, or bronchomotor responsiveness to methacholine. Endotoxin levels in the farm environment had great variability depending on the season and agricultural activities.

To the best of our knowledge, this is the first study designed to explore the role of early farm exposure in the development of cough and bronchial hypersensitivity in a rabbit model of allergic airway inflammation. Recent literature shows that the rabbit model is of particular interest for the study of asthma and other lung diseases for several reasons [20, 26], and we used this model especially because mice and rats, the most frequently used animals for asthma research, do not express a typical cough reflex (at least under anesthesia). Sensitivity to cough

Table 3. Maximal intensity of ventilatory responses induced by mechanical stimulation and respiratory resistance before and after methacholine challenge.

	Control Group	Farm Group	p-value*
	Median [Q1-Q3]	Median [Q1-Q3]	
Maximal intensity of ventilatory responses induced by mechanical stimulation			
Maximal intensity of defensive reflex (%)	269.24 [193.21–387.13]	192.79 [144.46–349.40]	0.132
Maximal intensity of cough reflex (%)	224.54 [137.00–406.12]	227.29 [154.56–328.28]	0.735
Maximal intensity of expiratory reflex (%)	191.33 [128.34–324.87]	144.46 [123.60–229.07]	0.368
Respiratory resistance before and after methacholine challenge			
Baseline respiratory resistance (hPa.s/L)	23.13 [21.17–27.43]	21.86 [18.06–25.66]	0.320
PD50 (mg.mL ⁻¹)	0.30 [0.26–0.40]	0.13 [0.07–0.19]	0.026
PD100 (mg.mL ⁻¹)	0.31 [0.26–0.75]	0.12 [0.07–0.22]	0.024

*Boldface values indicate p<0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279498.t003>

Table 4. Associations between exposures (farm vs control), intensity of respiratory responses induced by mechanical stimulation, and respiratory resistance before and after methacholine challenge.

	N	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4	
		RR	95% CI	RR	95% CI	RR	95% CI	RR	95% CI
Maximal intensity of defensive reflex (%)	32	3.06	0.62–15.09	5.59	0.47–66.30	2.66	0.22–31.82	4.86	0.15–152.09
Maximal intensity of cough reflex (%)	26	1.43	0.22–9.51	4.66	0.16–139.09	0.86	0.05–15.56	1.61	0.02–114.55
Maximal intensity of expiratory reflex (%)	22	2.13	0.42–10.77	2.42	0.12–48.99	1.56	0.23–10.35	2.60	0.08–82.67
Baseline respiratory resistance (hPa.s/L)	31	2.18	0.47–10.20	28.77	1.45–571.88	8.39	0.94–75.05	45.70	0.83–>999.99
PD50 (mg.mL ⁻¹)	30	6.61	1.41–31.00	0.78	0.07–8.34	4.93	0.69–35.18	0.72	0.05–9.33
PD100 (mg.mL ⁻¹)	28	7.25	1.44–36.35	0.75	0.05–12.02	3.61	0.16–83.29	0.46	0.01–24.43

Boldface values are significant ($p < 0.05$).

Model 1: Crude.

Model 2: Model 1 + age.

Model 3: Model 1 + weight.

Model 4: Model 1 + age + weight.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279498.t004>

was explored by mechanical stimulation of trachea in anesthetized and tracheotomized rabbits. Whereas in human, cough can be elicited by inhalation of chemical agents (citric acid or capsaicin), rabbits are more responsive to mechanical stimulation than to chemical stimulation as shown in [S2 File \[27\]](#). The nasal breathing of rabbits makes them poorly responsive to aerosol of citric acid and the scarce expression of TRPV1 receptors in the rabbit respiratory system makes them unresponsive to capsaicin [28, 29]. The response to OVA sensitization used to model allergic airway inflammation was assessed by specific IgE assays in a large proportion of rabbits. Our experimentation, with four OVA aerosols administered and the last one performed 48 hours before the final experiments, was designed to study antigen-induced bronchial hyperresponsiveness [26, 30–32]. Whereas most animal studies used farm dust samples as exposure, we applied farm environment in real life to pregnant rabbits and their offspring. Even though we characterized this farm environment by endotoxin measures, one limitation of this real-life approach is the variability of the farm environment, which is affected by several factors (season, ventilation, number of calves, mulch, etc.) [33]. Endotoxin levels in the pathogen free zone were not able to be tested because it was not possible to enter this zone with the sampling equipment. However, as the procedures to enter the zone and to care for the animals were intended to limit microbial exposure, we assume that endotoxin levels would have been very low.

Most animal and human studies focused on the protective effect of farm environment on asthma and atopic diseases without taking into account the associated cough hypersensitivity. In clinical settings, cough as a symptom is not specifically evaluated in the asthma control questionnaire [34] or test [35] and its evaluation is excluded from key asthma intervention trials. However, in the absence of infection, a cough provoked by different stimuli, and that worsens at night, is strongly associated with asthma. In our study, we chose to explore the impact of the farm environment on cough hyperreactivity because of the protective effect of farm on atopy and Th2 inflammation, one of the several etiological mechanisms of chronic cough hypersensitivity syndrome [36]. The absence of a significant protective effect of farm environment on cough hyperreactivity may be explained by other factors linked to the development of cough hyperreactivity and neuromodulation [37, 38]. Some studies suggest that dust and exposure to allergens may directly activate afferent nerves and provoke long-lasting cough hypersensitivity [39, 40]. However, up until now, no study has shown an increase in cough sensitivity after exposition to a farm environment. Whereas several human cohort studies have

shown a protective effect of farm environment on asthma [17, 41], our study failed to demonstrate the link between farm environment and bronchial responsiveness.

Previous animal studies using mice showed that chronic pre-exposure to lipopolysaccharide can reduce the sensitivity to house dust mite sensitization and suppress all of the key asthma features [42]. In our study, it seems that early exposure to farm did not affect sensitivity to OVA sensitization, bronchial responsiveness or cough sensitivity in response to OVA challenge. There may be several explanations for the absence of farm effect on atopic and respiratory outcomes in our study. First of all, farm exposure was not maintained during OVA-sensitization and challenge. Most studies have shown that even though early exposure is needed to obtain a protective effect [13], continuous exposure might also be needed. Furthermore, the route of sensitization influences the immune response. The intraperitoneal route is the route of choice in allergic rabbit models [20, 43]. It induces a stronger immune response than the intra-gastric, respiratory, or cutaneous route [44, 45] and is also less similar to real-life routes. Thus, early farm exposure might have been insufficient to protect against this strong route of sensitization. Further analysis of inflammatory mediators, cell distribution, and Th1/Th2 cytokines secretion in rabbits might help to better understand the impact of early exposure to farm dust on immune response to OVA sensitization.

Regarding the farm environment, the rabbits were housed in the calf barn where endotoxin levels were expected to be high due to the small enclosed area with limited wind entry and the use of hay and straw as feeding and bedding material. The study of allergy and asthma prevalence in Amish and Hutterites populations has shown that a high level of endotoxin exposure is needed to protect against allergy and asthma [19], and other studies have shown that there is a dose-response effect [3, 13]. However, the level of endotoxin exposure needed to protect against asthma has not been established yet. In our study, endotoxin levels found in the calf barn are similar to those described in other studies in cow sheds [46] and dairy cattle [47] from modern farms but lower than in older studies in dairy barns [48]. The wide range of endotoxin levels, with the highest one measured in winter after bedding activities, has already been described in cow sheds and dairy cattle or barns in a same place but with different settings [49]. Irrespective of the season during housing of pregnant rabbits and their offspring, the number of calves present in the barn might also affect the level of endotoxins [33].

Finally, not all farm environments protect against asthma and atopy [50]. In the past 20 years, traditional dairy farms have been studied in European cohorts to understand the specific factors of dairy farm environment involved in the protection of asthma and allergic diseases [5, 8, 9]. In addition to the exposure to a high endotoxin level, those studies have shown a protective effect of the consumption of raw cow's milk during pregnancy and in the first year of life [8] and also a protective effect of a diversity of early exposures [51], such as high food diversity [15] and exposure to different animal species [14]. Together with our results, these studies suggest that the protective effect of farm environment is not only due to the exposure to dairy farm's dust but also to several other factors. Finally, another interesting result of these cohorts is the variability of the protective effect of farm exposure according to genetic factors [14, 18, 52] that may be different in rabbits compared to humans.

Conclusion

The advantage of animal models is the ability to analyze the impact of one factor at a time while controlling all other factors. In our study, we analyzed the relationship between early exposure to farm dust and allergic and respiratory outcomes in an allergic airway inflammation rabbit model. Early farm exposure during the rabbits' pregnancy and the offspring's six weeks of life did not affect allergic sensitization, cough sensitivity, and bronchial hyperactivity.

Unlike children living on a farm, in our animal model, the rabbits were exposed to a farm environment for a limited amount of time and were only exposed to farm dust. These results suggest that early exposure to farm dust alone is not sufficient and that continuous exposure to several sources of microbial diversity (dust, food, animals, etc.) is needed to prevent atopy and asthma.

Supporting information

S1 Table. Correlation between quantitative variables (Spearman's rank correlation coefficient).

(DOCX)

S2 Table. Defensive reflexes provoked by nebulization of acid citric aerosol.

(DOCX)

S1 File. Supporting methods.

(DOCX)

S2 File. Supporting results.

(DOCX)

S1 Dataset.

(XLSX)

Acknowledgments

We thank Alexandre Laflotte, director of the experimental farm, La Bouzule (ENSAIA), all the fieldworkers from the farm, all the fieldworkers from the animal house facility at the University of Lorraine; Lise Alonso and Xavier Simon from the National Institute of Research and Security (INRS) in Nancy for dust samples; and David Moulin from IMoPA at the University of Lorraine for his help with blood lab work.

Author Contributions

Conceptualization: Amandine Divaret-Chauveau, Laurent Foucaud, Silvia Demoulin-Alexikova.

Data curation: Amandine Divaret-Chauveau, Bruno Demoulin, Silvia Demoulin-Alexikova.

Formal analysis: Amandine Divaret-Chauveau, Pauline Loison, Marcelo De Carvalho Bittencourt, Frédéric Mauny.

Funding acquisition: Amandine Divaret-Chauveau, Silvia Demoulin-Alexikova.

Investigation: Amandine Divaret-Chauveau, Laurent Foucaud, Bruno Demoulin, Cédric Teston, Pauline Loison, Silvia Demoulin-Alexikova.

Methodology: Laurent Foucaud, Bruno Demoulin, Cyril Schweitzer, Frédéric Mauny, Silvia Demoulin-Alexikova.

Project administration: Laurent Foucaud, Silvia Demoulin-Alexikova.

Resources: Laurent Foucaud, Bruno Demoulin, Cédric Teston, Pauline Loison, Pierre Le Cann, Marcelo De Carvalho Bittencourt, Silvia Demoulin-Alexikova.

Supervision: Laurent Foucaud, Frédéric Mauny, Silvia Demoulin-Alexikova.

Validation: Pierre Le Cann, Cyril Schweitzer, Marcelo De Carvalho Bittencourt.

Writing – original draft: Amandine Divaret-Chauveau.

Writing – review & editing: Amandine Divaret-Chauveau, Laurent Foucaud, Bruno Demoulin, Cédric Teston, Pauline Loison, Pierre Le Cann, Cyril Schweitzer, Marcelo De Carvalho Bittencourt, Frédéric Mauny, Silvia Demoulin-Alexikova.

References

1. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis.” *Thorax*. 2000 Aug; 55(Suppl 1):S2–10.
2. von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis—the epidemiological evidence. *Immunobiology*. 2007 Jun; 212(6):433–9. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.03.002> PMID: 17544828
3. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WOCM, Braun-Fahrlander C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*. 2011 Feb 24; 364(8):701–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007302> PMID: 21345099
4. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *The Lancet*. 2001 Oct 6; 358(9288):1129–33. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06252-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06252-3) PMID: 11597666
5. von Mutius E, Schmid S. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy*. 2006 Apr; 61(4):407–13. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01009.x> PMID: 16512801
6. Pfefferle PI, Büchele G, Blümer N, Roponen M, Ege MJ, Krauss-Etschmann S, et al. Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: The PASTURE Study. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jan; 125:108–115.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.019> PMID: 19969338
7. Kääriö H, Huttunen K, Karvonen AM, Schaub B, von Mutius E, Pekkanen J, et al. Exposure to a farm environment is associated with T helper 1 and regulatory cytokines at age 4.5 years. *Clin Exp Allergy*. 2016 Jan; 46(1):71–7. <https://doi.org/10.1111/cea.12636> PMID: 26362849
8. Loss G, Apprich S, Waser M, Kneifel W, Genuneit J, Büchele G, et al. The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: The GABRIELA study. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Oct; 128(4):766–773.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.07.048> PMID: 21875744
9. Alfven T, Braun-Fahrlander C, Brunekreef B, Mutius E, Riedler J, Scheynius A, et al. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle—the PARSIFAL study. *Allergy*. 2006 Apr; 61:414–21. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00939.x> PMID: 16512802
10. Torow N, Hornef MW. The Neonatal Window of Opportunity: Setting the Stage for Life-Long Host-Microbial Interaction and Immune Homeostasis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017 Jan 15; 198(2):557–63. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601253> PMID: 28069750
11. Karvonen AM, Hyvärinen A, Gehring U, Korppi M, Doekes G, Riedler J, et al. Exposure to microbial agents in house dust and wheezing, atopic dermatitis and atopic sensitization in early childhood: a birth cohort study in rural areas. *Clin Exp Allergy* 2012 Aug; 42(8):1246–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.04002.x> PMID: 22805472
12. Karvonen AM, Hyvärinen A, Rintala H, Korppi M, Täubel M, Doekes G, et al. Quantity and diversity of environmental microbial exposure and development of asthma: a birth cohort study. *Allergy*. 2014 Aug; 69(8):1092–101. <https://doi.org/10.1111/all.12439> PMID: 24931137
13. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*. 2002 Sep 19; 347(12):869–77. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020057> PMID: 12239255
14. Roduit C, Wohlgensinger J, Frei R, Bitter S, Bieli C, Loeliger S, et al. Prenatal animal contact and gene expression of innate immunity receptors at birth are associated with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jan; 127:179–185.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.010> PMID: 21112617
15. Roduit C, Frei R, Depner M, Schaub B, Loss G, Genuneit J, et al. Increased food diversity in the first year of life is inversely associated with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Apr; 133(4):1056–64. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1044> PMID: 24508301
16. Nicklaus S, Divaret-Chauveau A, Chardon ML, Roduit C, Kaulek V, Ksiazek E, et al. The protective effect of cheese consumption at 18 months on allergic diseases in the first 6 years. *Allergy*. 2019 Apr; 74(4):788–98.

17. Depner M, Taft DH, Kirjavainen PV, Kalanetra KM, Karvonen AM, Peschel S, et al. Maturation of the gut microbiome during the first year of life contributes to the protective farm effect on childhood asthma. *Nat Med*. 2020 Nov; 26(11):1766–75. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1095-x> PMID: 33139948
18. Loss GJ, Depner M, Hose AJ, Genuneit J, Karvonen AM, Hyvärinen A, et al. The Early Development of Wheeze. Environmental Determinants and Genetic Susceptibility at 17q21. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Apr 15; 193(8):889–97. <https://doi.org/10.1164/rccm.201507-1493OC> PMID: 26575599
19. Stein MM, Hrusch CL, Gozdz J, Igartua C, Pivniouk V, Murray SE, et al. Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *N Engl J Med*. 2016 Aug 4; 375(5):411–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1508749> PMID: 27518660
20. Keir SD, Spina D, Douglas G, Herd C, Page CP. Airway responsiveness in an allergic rabbit model. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2011 Oct; 64(2):187–95. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2011.08.003> PMID: 21854860
21. 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 Oct; 23(5):397–402. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2010.05.008> PMID: 20538068
22. Varechova S, Demoulin B, Leblanc AL, Coutier L, Ioan I, Bonabel C, et al. Neonatal hyperoxia up regulates cough reflex in young rabbits. *Respir Physiol Neurobiol*. 2015 Mar; 208:51–6. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2015.01.003> PMID: 25583662
23. Varechova S, Poussel M, Schweitzer C, Demoulin B, Chenuel B, Marchal F. Stimulus response latency of cough and expiration reflex depends on breathing in the rabbit. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012 Jun; 25(3):242–7. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2012.03.006> PMID: 22465564
24. Foucaud L, Demoulin B, Leblanc AL, Ioan I, Schweitzer C, Demoulin-Alexikova S. Modulation of protective reflex cough by acute immune driven inflammation of lower airways in anesthetized rabbits. *PLoS One*. 2019 Dec; 14(12):e0226442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226442> PMID: 31887143
25. Marchal F, Demoulin B, Schweitzer C, Leblanc AL, Bertin N. Airway response to induced muscular contraction in spontaneously breathing rabbits. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008 Feb 1; 160(2):224–31. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2007.10.002> PMID: 18036999
26. Keir S, Page C. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008 Oct; 21(5):721–30.
27. Hanáček J, Davies A, Widdicombe JG. Influence of lung stretch receptors on the cough reflex in rabbits. *Respir Int Rev Thorac Dis*. 1984; 45(3):161–8. <https://doi.org/10.1159/000194614> PMID: 6463386
28. Tatár M, Pécová R, Karcolová D. [Sensitivity of the cough reflex in awake guinea pigs, rats and rabbits]. *Bratisl Lek Listy*. 1997 Oct; 98(10):539–43.
29. Tatar M, Hanacek J, Widdicombe J. The expiration reflex from the trachea and bronchi. *Eur Respir J*. 2008 Feb; 31(2):385–90. <https://doi.org/10.1183/09031936.00063507> PMID: 17959638
30. Marsh WR, Irvin CG, Murphy KR, Behrens BL, Larsen GL. Increases in airway reactivity to histamine and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. *Am Rev Respir Dis*. 1985 Jun; 131(6):875–9. <https://doi.org/10.1164/arrd.1985.131.6.875> PMID: 4003939
31. Larsen GL, Wilson MC, Clark RA, Behrens BL. The inflammatory reaction in the airways in an animal model of the late asthmatic response. *Fed Proc*. 1987 Jan; 46(1):105–12. PMID: 3542571
32. Coyle AJ, Page CP, Atkinson L, Sjoerdsma K, Touvy C, Metzger WJ. Modification of allergen-induced airway obstruction and airway hyperresponsiveness in an allergic rabbit model by the selective platelet-activating factor antagonist, BN 52021. *J Allergy Clin Immunol*. 1989 Dec; 84(6 Pt 1):960–7.
33. Pfister H, Madec L, Cann PL, Costet N, Chouvet M, Jouneau S, et al. Factors determining the exposure of dairy farmers to thoracic organic dust. *Environ Res*. 2018 Aug; 165:286–93. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.04.031> PMID: 29758401
34. Juniper EF, O'Byrne PM, Guyatt GH, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur Respir J*. 1999 Oct; 14(4):902–7.
35. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, Schatz M, Li JT, Marcus P, et al. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Jan; 113(1):59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.09.008> PMID: 14713908
36. Morice AH, Millqvist E, Bieksiene K, Birring SS, Dicpinigaitis P, Domingo Ribas C, et al. ERS guidelines on the diagnosis and treatment of chronic cough in adults and children. *Eur Respir J*. 2020 Jan; 55(1).
37. Singh N, Driessen AK, McGovern AE, Moe AAK, Farrell MJ, Mazzone SB. Peripheral and central mechanisms of cough hypersensitivity. *J Thorac Dis*. 2020 Sep; 12(9):5179–93. <https://doi.org/10.21037/jtd-2020-icc-007> PMID: 33145095
38. Chung KF, McGarvey L, Mazzone SB. Chronic cough as a neuropathic disorder. *Lancet Respir Med*. 2013 Jul; 1(5):414–22. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70043-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70043-2) PMID: 24429206

39. Udem BJ, Taylor-Clark T. Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jun; 133(6):1521–34. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.027> PMID: 24433703
40. Chen CY, Bonham AC, Schelegle ES, Gershwin LJ, Plopper CG, Joad JP. Extended allergen exposure in asthmatic monkeys induces neuroplasticity in nucleus tractus solitarius. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Oct; 108(4):557–62. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.118132> PMID: 11590381
41. Kirjavainen PV, Karvonen AM, Adams RI, Täubel M, Roponen M, Tuoresmäki P, et al. Farm-like indoor microbiota in non-farm homes protects children from asthma development. *Nat Med*. 2019 Jul; 25(7):1089–95. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0469-4> PMID: 31209334
42. Schuijs MJ, Willart MA, Vergote K, Gras D, Deswarte K, Ege MJ, et al. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science*. 2015 Sep 4; 349(6252):1106–10. <https://doi.org/10.1126/science.aac6623> PMID: 26339029
43. Patel HJ, Douglas GJ, Herd CM, Spina D, Giembycz MA, Barnes PJ, et al. Antigen-induced bronchial hyperresponsiveness in the rabbit is not dependent on M(2)-receptor dysfunction. *Pulm Pharmacol Ther*. 1999 Aug; 12(4):245–55. <https://doi.org/10.1006/pupt.1999.0204> PMID: 10500004
44. Briard M, Guinot M, Grauso M, Guillon B, Hazebrouck S, Bernard H, et al. Route of Sensitization to Peanut Influences Immune Cell Recruitment at Various Mucosal Sites in Mouse: An Integrative Analysis. *Nutrients*. 2022 Feb 14; 14(4):790. <https://doi.org/10.3390/nu14040790> PMID: 35215440
45. Baeten LA, Podell BK, Sluder AE, Garritsen A, Bowen RA, Poznansky MC. Standardized guinea pig model for Q fever vaccine reactogenicity. *PloS One*. 2018 Oct; 13(10):e0205882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205882> PMID: 30312355
46. Berger I, Schierl R, Ochmann U, Egger U, Scharrer E, Nowak D. Concentrations of dust, allergens and endotoxin in stables, living rooms and mattresses from cattle farmers in southern Bavaria. *Ann Agric Environ Med AAEM*. 2005; 12(1):101–7. PMID: 16028874
47. Schierl R, Heise A, Egger U, Schneider F, Eichelser R, Nesper S, et al. Endotoxin concentration in modern animal houses in southern Bavaria. *Ann Agric Environ Med AAEM*. 2007; 14(1):129–36. PMID: 17655190
48. Kullman GJ, Thorne PS, Waldron PF, Marx JJ, Ault B, Lewis DM, et al. Organic dust exposures from work in dairy barns. *Am Ind Hyg Assoc J*. 1998 Jun; 59(6):403–13. <https://doi.org/10.1080/15428119891010668> PMID: 9670470
49. Samadi S, Wouters IM, Heederik DJJ. A review of bio-aerosol exposures and associated health effects in veterinary practice. *Ann Agric Environ Med AAEM*. 2013; 20(2):206–21. PMID: 23772565
50. Ege MJ, Frei R, Bieli C, Schram-Bijkerk D, Waser M, Benz MR, et al. Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 May; 119:1140–7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.01.037> PMID: 17349684
51. Vuitton DA, Divaret-Chauveau A, Dalphin ML, Laplante JJ, von Mutius E, Dalphin JC. Protection contre l'allergie par l'environnement de la ferme : en 15 ans, qu'avons-nous appris de la cohorte européenne « PASTURE » ? *Bull Académie Natl Médecine*. 2019 Oct 1; 203(7):618–30.
52. Ege MJ, Strachan DP, Cookson WOCM, Moffatt MF, Gut I, Lathrop M, et al. Gene-environment interaction for childhood asthma and exposure to farming in Central Europe. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jan; 127(1):138–44, 144.e1-4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.041> PMID: 21211648

1 **Supporting methods**

2 **Sensitization and provocation of airway inflammation with** 3 **ovalbumin**

4 All rabbits were sensitized around their 12th week of life by two intraperitoneal (IP)
5 injections of a 1 mL suspension containing 0.1 mg ovalbumin (OVA) (Sigma-Aldrich, Saint
6 Quentin Fallavier, France) and 10 mg aluminum hydroxide (Sigma-Aldrich, Saint Quentin
7 Fallavier, France) in sterile saline (0.9% NaCl) on days 0 and 13 (1). The solutions were
8 suspended for a 30-minute agitation on ice before the IP injections.

9 From day 23, that is, 10 days after the end of sensitization, the rabbits received an OVA
10 aerosol for 20 minutes each day for four days. The OVA aerosols were administered using an
11 ultrasonic nebulizer (LS 290, SYSTAM[®]) that produced droplets with a mass media
12 aerodynamic diameter of 3.5 μm (60% of particles had a size between 1 and 5 μm) connected
13 to a custom-built device created in our laboratory. The system was a closed Plexiglas chamber
14 (33 x 33 x 51.5 cm) consisting of a head chamber isolated from a body chamber. The rabbits
15 were positioned in order to permit proximity between the rabbit's nose and the opening for
16 aerosol diffusion. To achieve the aerosol challenges, the rabbits were placed in the restraining
17 system that had an opening for tubing connected to a nebulizer containing 20 mL of an OVA
18 solution (2.5 mg.mL⁻¹ OVA in saline). A 20-minute nebulization allowed for the aerosolization
19 of almost 40 mg of OVA. All aerosols were performed in a class I safety enclosure for safety
20 reasons. The rabbits were exposed to the last OVA aerosol 48 hours before the mechanical and
21 chemical cough challenges. During the five days preceding the allergen aerosol administration,
22 five habituation sessions of five minutes each using a saline solution were performed in order

23 to reduce the stress associated with handling and the movement restriction imposed by the
24 nebulization system.

25 **Chemical stimulation in conscious rabbits**

26 A saline solution followed by four citric acid (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier,
27 France) solutions with different concentrations (0,2M, 0,4M, 0,8M and 1,6M) were nebulized
28 using an ultrasonic nebulizer (LS 290, SYSTAM®) during one minute for each in the same
29 Plexiglas chamber that the one used for OVA aerosols. Each aerosol was separated by at least
30 one minute. Cough response to nebulization of citric acid was quantified by the number of
31 defensive reflex (DR) counted by an observer at each concentration. Chemical threshold was
32 defined as the lower concentration of acid citric solution that elicit a DR. The cumulative
33 number of DR during the four different solutions was calculated.

34

35 **Anesthesia and animal preparation**

36 **Anesthesia, analgesia, and euthanasia**

37 Analgesia was induced by an intra-muscular injection of buprenorphine (0.02 mg.kg⁻¹).
38 Fifteen minutes after pre-medication, anesthesia was induced with propofol (3 mg.kg⁻¹) (Ceva
39 Santé Animale, Libourne, France) and ketamine (3 mg.kg⁻¹) (Virbac, France; Carros, France)
40 injected through the ear vein. The anesthesia was then maintained by a continuous perfusion of
41 propofol (0.8 mg.kg⁻¹.min⁻¹) and ketamine (0.2 mg.kg⁻¹.min⁻¹). Monitoring of analgesia and
42 anesthetic depth was performed in 15-minute intervals by assessing the change in physiological
43 parameters (heart and respiratory rate) and the absence of withdrawal responses to compressive
44 ear and toe pinches. The perfusion rate was adapted according to this monitoring.

45 At the end of the experiment, the animals were sacrificed by intravenous injection of 3
46 mL of Euthasol (400 mg of pentobarbital per milliliter, Dechra).

47 **Animal preparation**

48 The anesthetized animal was placed in the supine position. Its rectal temperature was
49 continuously monitored with an electrical thermistor (Physitemp Instruments, YSI 402 Clifton,
50 NJ, USA) and maintained at 38°C using a warm water circulation pad. The electromyographic
51 activity of the rectus abdominis muscle was measured by the insertion of bipolar insulated fine
52 stainless steel wire electrodes (A-M Systems INC, Sequim, WA 98,382) introduced under
53 visual control into either the transversus abdominis or external oblique abdominal muscles
54 according to Basmajian and Stecko (2) to further differentiate the active expiration from the
55 augmented breath (3). An upper cervical tracheotomy allowed the insertion of a tracheal
56 cannula that was connected to the mechanical stimulation apparatus and a pneumotachograph
57 (No. 0 Fleisch pneumotachograph with a linear range of $\pm 250 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$). The pneumotachograph
58 was calibrated before each experiment using a 20 ml calibration syringe.

59

Supporting results

Among the 37 rabbits challenged by acid citric nebulization, only 8 rabbits (21.6%) had at least one DR to chemical stimulation without statistical difference between groups (3 in C and 4 in F, $p=0.693$). Chemical threshold and cumulative number of DR provoked by nebulization of acid citric are described in Table S2. Chemical threshold was different between groups ($p=0.036$) whereas the cumulative number of DR was not ($p=0.567$).

Supporting Table 1

S1 Table. Correlation between quantitative variables (Spearman's rank correlation coefficient)

		Weight	DR maximal intensity	CR maximal intensity	ER maximal intensity	Initial respiratory resistance	PD50	PD100
Age	rho	0.70516	0.20075	-0.03218	0.1974	-0.05592	0.57117	0.58756
	p-value	<0.0001	0.2706	0.876	0.3786	0.7651	0.001	0.001
	N	38	32	26	22	31	30	28
Weight	rho		0.17657	0.20075	0.14585	-0.16376	0.3445	0.40246
	p-value		0.3337	0.3254	0.5172	0.3787	0.0623	0.0337
	N		32	26	22	31	30	28
DR maximal intensity	rho			0.85983	0.63298	0.25567	0.12589	0.15009
	p-value			<0.0001	0.0016	0.1807	0.5233	0.4643
	N			26	22	29	28	26
CR maximal intensity	rho				0.22647	0.05565	-0.167	-0.11124
	p-value				0.399	0.7962	0.4463	0.6221
	N				16	24	23	22
ER maximal intensity	rho					0.06316	0.53767	0.57108
	p-value					0.7973	0.0214	0.0166
	N					19	18	17
Initial respiratory resistance	rho						-0.09811	-0.1538
	p-value						0.606	0.4346
	N						30	28
PD50	rho							0.98962
	p-value							<0.0001
	N							27

1 **Supporting Table 2**

2 **S2 Table. Defensive reflexes provoked by nebulization of acid citric aerosol**

	Control Group	Farm Group
Acid citric threshold to elicit at least one defensive reflex		
0.2	0	3
0.4	3	0
0.8	0	1
1.6	0	0
None	16	14
Cumulative number of defensive reflexes		
None	16	14
1-2	3	2
3-5	0	0
>5	0	2

3

4

3. Environnement précoce et trajectoires de toux en dehors d'une infection dans la cohorte européenne de naissance PASTURE

Article issu de ce chapitre : Divaret-Chauveau A, Demoulin-Alexikova S, Dalphin M-L, Barnig C, Kaulek V, Hose A, Depner M, Schaub B, Schmausser-Hechfellner E, Skevaki C, Riedler J, Pekkanen J, Karvonen AM, Täubel M, Lauener R, Roduit C, Vuitton DA, Mauny F, von Mutius E, PASTURE study group. Early environment and trajectories of cough without a cold in the European birth cohort PASTURE. En cours de relecture pour soumission à Allergy.

Résumé de l'article

Introduction : Les trajectoires persistantes de toux en dehors d'une infection chez l'enfant sont associées aux pathologies allergiques et ce type de toux peut considérablement affecter la qualité de vie des enfants. Alors que l'exposition précoce à un environnement microbien riche et diversifié est connue pour être un facteur protecteur des maladies allergiques, peu d'études ont évalué le rôle de l'environnement précoce sur le développement de la toux durant l'enfance.

Objectif : Evaluer l'association entre l'environnement périnatal et les trajectoires de toux en dehors d'une infection de l'âge de un à 10 ans.

Méthodes : L'environnement périnatal a été évalué par les expositions spécifiques à l'environnement fermier ainsi que par l'exposition à l'environnement intérieur, infectieux et alimentaire durant la grossesse et la première année de vie dans la cohorte européenne PASTURE (Protection against Allergy: STUdy in Rural Environment). Ces expositions ont été recueillies à l'aide d'un questionnaire au troisième trimestre de grossesse, d'un questionnaire au deuxième mois de vie de l'enfant et de journaux hebdomadaires remplis durant la première année de vie de l'enfant. L'association entre l'environnement périnatal et les trajectoires de toux en dehors d'une infection entre l'âge de un et 10 ans a été évaluée par un modèle de régression logistique multinomiale ajusté sur le pays, l'atopie parentale, le genre et le statut fermier. Une analyse de sensibilité avec ajustement sur l'asthme a été réalisée.

Résultats : Parmi les 961 enfants inclus dans l'étude, l'analyse en classes latentes a permis d'identifier cinq trajectoires de toux en dehors d'une infection : une trajectoire avec peu ou pas de symptôme (59,9 %), une trajectoire aiguë transitoire (24,1 %), une trajectoire transitoire modérée (6,8 %), une trajectoire persistante à début tardif (4,8 %), et une trajectoire persistante à début précoce (4,4 %). Les trajectoires persistantes étaient associées aux pathologies respiratoires allergiques et aux allergies alimentaires. La seule exposition spécifique à l'environnement fermier significativement associée à une diminution du risque de toux persistante à début précoce (OR=0,17 [0,04-0,72]) et de toux transitoire aiguë (OR=0,59 [0,39-0,90]), même après ajustement sur l'asthme, était la consommation

de lait de ferme bouilli durant la première année de vie. Le tabagisme maternel à l'âge de 2 mois était associé à une augmentation du risque de trajectoires de toux transitoires. Une otite dans les quatre premiers mois et des infections respiratoires non sifflantes pendant 8 semaines ou plus durant la première année de vie étaient significativement associées à un risque plus élevé de toux persistante à début précoce.

Conclusion : Alors que les otites précoces et les infections respiratoires répétées ou prolongées durant la première année de vie sont des facteurs de risque de la toux persistante à début précoce, l'exposition microbienne précoce, particulièrement via la consommation de lait de ferme, a un effet protecteur envers la toux persistante à début précoce.

1 **Early environment and trajectories of cough without a cold in the**
2 **European birth cohort PASTURE**

3

4 Amandine Divaret-Chauveau^{1,2,3} MD, Silvia Demoulin-Alexikova^{2,4} MD, PhD, Marie-Laure
5 Dalphin⁵ MD, Cindy Barnig^{6,7} MD, PhD, Vincent Kaulek⁶ PhD, Alexander Hose⁸ MA, MPH,
6 Martin Depner⁹ PhD, Bianca Schaub^{8,10} MD, PhD, Elisabeth Schmausser-Hechfellner⁹ BSc,
7 Chrysanthi Skevaki¹¹ MD, PhD, Josef Riedler¹² MD, PhD, Juha Pekkanen^{13,14} MD, PhD,
8 Anne M Karvonen¹³ PhD, Martin Täubel¹³ PhD, Roger Lauener^{15,16} MD, PhD, Caroline
9 Roduit^{15,16,17} MD, PhD, Dominique Angèle Vuitton¹⁷ MD, PhD, Frederic Mauny^{3,19} MD,
10 PhD, Erika von Mutius^{8,9,10} MD, MSc, and the PASTURE study group

11 ¹*Pediatric Allergy Department, University Hospital of Nancy, France*

12 ²*EA3450 Développement Adaptation et Handicap (DevAH), University of Lorraine, Nancy, France*

13 ³*UMR 6249 Chrono-environment, CNRS and University of Franche-Comté, Besançon, France*

14 ⁴*CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR9017-CIIL-Centre d'Infection et*
15 *d'Immunité de Lille, University of Lille, Lille, France*

16 ⁵*Pediatrics, University Hospital of Besançon, France*

17 ⁶*Respiratory Diseases Department, University Hospital of Besançon, France*

18 ⁷*INSERM, EFS BFC, LabEx LipSTIC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur, Ingénierie*
19 *Cellulaire et Génique, Bourgogne Franche-Comté University, Besançon, France*

20 ⁸*Dr von Hauner Children's Hospital, Department of Pediatric Allergology, Ludwig Maximilian*
21 *University of Munich, Germany*

22 ⁹*Institute for Asthma and Allergy Prevention, Helmholtz Zentrum München, German Research Center*
23 *for Environmental Health, Neuherberg, Germany*

24 ¹⁰*CPC-M, Member of the German Center for Lung Research*

25 ¹¹*Institute for Medicine Laboratory, Pathobiochemistry and Molecular Diagnostics, Philipps-*
26 *University Marburg, Germany*

27 ¹²*Children's Hospital Schwarzach, Austria*

28 ¹³*Department of Health Security, Finnish Institute for Health and Welfare, P.O. Box 95 FI-70701*
29 *Kuopio, Finland*

30 ¹⁴*Department of Public Health, University of Helsinki, Finland*

31 ¹⁵*Christine Kühne Center for Allergy Research and Education (CK-CARE), Davos, Switzerland*

32 ¹⁶*Children's Hospital of Eastern Switzerland, St Gallen, Switzerland*

33 ¹⁷*University Children's Hospital Zurich, Switzerland*

34 ¹⁸*EA 3181, University of Franche-Comté, Besançon, France*

35 ¹⁹*Unité de méthodologie en recherche clinique, épidémiologie et santé publique, CIC Inserm 143,*
36 *University Hospital of Besançon, France*

37 Short title: Early environment and cough in childhood

38

39 Corresponding author:

40 Dr Amandine Divaret-Chauveau MD

41 University Hospital of Nancy

42 Pediatric Allergy Department

43 Rue du Morvan

44 54511 Vandoeuvre-les-Nancy

45 France

46 Email: a.chauveau@chru-nancy.fr

47 Tel. +33 (0)383155230

48 Fax +33 (0)383154686

49 The members of the PASTURE study group are (in alphabetical order by study center):

50 Kirjavainen PV, Roponen M (Finland); Laurent L (France), Böck A., Ege M, Genuneit J, Illi S,

51 Kabesch M, Pechlivanis S., Pfefferle P, Renz H., Theodorou J., (Germany); Frei R

52 (Switzerland).

53

54 **Acknowledgments**

55 We thank all the fieldworkers and other PASTURE/EFRAIM team members. We would like to

56 dedicate this manuscript to Jean-Charles Dalphin, one of the founders of the PASTURE study,

57 who passed away in 2019. We are very grateful to him for his investment in the PASTURE

58 cohort from the outset.**Funding**

59 The PASTURE study was supported by the European Commission (research grants QLK4-CT-

60 2001-00250, FOOD-CT-2006-31708 and KBBE-2007-2-2-06), the European Research

61 Council (grant 250268), the CK-CARE/Kühne Foundation, EVO/VTR-funding; the Academy

62 of Finland (grants 139021, 287675, and 338679), the Juho Vainio Foundation, the Yrjö

63 Jahnsson Foundation, the Päivikki and Sakari Sohlberg Foundation, the Finnish Cultural

64 Foundation, the Finnish Institute for Health and Welfare, and the French national program for

65 hospital research (PHRC IR 2004, 2007 and 2012 DIRC EST PATURE I, II, IV).

66 **Conflict of interest**

67 A.D-C. reports support from the French National Program for Hospital Research for the present

68 manuscript; grants from Don Du Souffle, Fondation du Souffle, ARAIRLOR and Novartis for

69 other studies; a contract with the French Public Agency ANSES as an expert in allergy and

70 pediatric; consulting fees for expertise in food allergy for Stallergens and Aimmune

71 Therapeutics, in pediatric allergy for ALK; support for attending meetings from Mead Johnson,

72 Nutricia, Aimmune Therapeutics and Novartis; and stock options for Essilor Luxottica. C.B.
73 reports payment or honoraria for lectures, presentations, speakers' bureaus, manuscript writing
74 or educational events from Edimark; support for attending meetings and/or travel from
75 AstraZeneca, GSK, Novartis, Chiesi, Sanofi and ALK. B.S. reports consulting fees from
76 GlaxoSmithKline, Novartis, Sanofi; participation on a Data Safety Monitoring Board or
77 Advisory Board for Sanofi, GSK, Novartis. A.M.K. reports support for the present manuscript
78 from EVO/VTR-funding; the Academy of Finland (grants 139021, 287675, and 338679), the
79 Juho Vainio Foundation, the Yrjö Jahnsson Foundation, the Päivikki and Sakari Sohlberg
80 Foundation, the Finnish Cultural Foundation, the Finnish Institute for Health and Welfare.
81 R.L. reports a research grant from CK-Care/Kühne Foundation, consulting fees for advisory
82 board with Milupa and ALK. D.A.V reports participation on a data safety monitoring board or
83 advisory board as a member of the working group "plants" of the French Public Agency
84 ANSES. F.M. reports a grant from the French public agency ANSES and participation on a
85 Data Safety Monitoring Board for the clinical "Propila-Rifax". E.v.M. reports support for the
86 present manuscript: Funding of the PASTURE study, the EFRAIM study and the
87 FORALLVENT study; payment made to the University Hospital of Munich (KUM, Ludwig-
88 Maximilians- Universität, Munich); Grants: Bavarian State Ministry of Health and Care for
89 project "The role of the microbial environmental exposure for the protection against hay fever
90 and asthma" (01/20), BMBF, German Center for Lung Research (01/21), Bavarian State
91 Ministry of Health and Care for "URS Study", 01/21; Royalties or licenses: Elsevier GmbH,
92 Georg Thieme Verlag, Springer-Verlag GmbH, Elsevier Ltd.; Consulting fees: Chinese
93 University of Hongkong, European Commission, HiPP GmbH & Co KG, AstraZeneca,
94 Imperial College London, OM Pharma; Payment or honoraria for lectures, presentations,
95 speakers bureaus, manuscript writing or educational events: Massachusetts Medical Society,
96 Springer-Verlag GmbH, Elsevier Ltd., Böhringer Ingelheim International GmbH, European

97 Respiratory Society (ERS), Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Universität
98 Salzburg, Springer Medizin Verlag GmbH, Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical
99 Immunology (JSPACI), Klinikum Rechts der Isar, University of Colorado, Paul-Martini-
100 Stiftung, Astra Zeneca, Imperial College London, Children's Hospital Research Institute of
101 Manitoba, Kompetenzzentrum f r Ern hrung (Kern), OM Pharma S.A., Swedish Pediatric
102 Society for Allergy and Lung Medicine, , Chinese College of Allergy and Asthma (CCAA);
103 Support for attending meetings and/or travel: Verein zur F rderung der Pneumologie am
104 Krankenhaus Grohansdorf e.V., Pneumologie Developpement, Mondial Congress & Events
105 GmbH & Co. KG, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, Imperial College
106 London, Margaux Orange, Volkswagen Stiftung, Böhringer Ingelheim International GmbH,
107 European Respiratory Society (ERS), Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde,
108  sterreichische Gesellschaft f. Allergologie u. Immunologie, Massachusetts Medical Society,
109 OM Pharma S. A., Hanson Wade Ltd., iKOMM GmbH, DSI Dansk Borneastma Center,
110 American Thoracic Society, HiPP GmbH & Co KG, Universiteit Utrecht, Faculteit
111 B tawetenschappen; Patents planned, issued or pending: EvM has patent No.
112 PCT/EP2019/085016 (Barn dust extract for the prevention and treatment of diseases) pending
113 (Barn dust extract for the prevention and treatment of diseases) pending, royalties paid to
114 ProtectImmun for patent EP2361632 (Specific environmental bacteria for the protection from
115 and/or the treatment of allergic, chronic inflammatory and/or autoimmune disorders, granted on
116 19 March 2014), and patents EP1411977 (Composition containing bacterial antigens used for
117 the prophylaxis and the treatment of allergic diseases, granted on 18 April 2007), EP1637147
118 (Stable dust extract for allergy protection, granted on 10 December 2008), and EP 1964570
119 (Pharmaceutical compound to protect against allergies and inflammatory diseases, granted on
120 21 November 2012) licensed to ProtectImmun.

121 Patent EP21189353.2. 2021. von Mutius E, Rankl B, Bracher F, Müller C, Walker A, Hauck
122 SM, Merl-Pham J, inventors; PROTEINS IDENTIFIED FROM BARN DUST EXTRACT
123 FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF DISEASES.
124 Patent PCT/US2021/016918. 2021. Martinez FD, Vercelli D, Snyder SA, von Mutius E,
125 Pivniouk V, Marques dos Santos M, inventors; THERAPEUTIC FRACTIONS AND
126 PROTEINS FROM ASTHMA-PROTECTIVE FARM DUST. ; Participation on a Data Safety
127 Monitoring Board or Advisory Board: Member of the EXPANSE (funded by European
128 Commission) Scientific Advisory Board, Member of the BEAMS External Scientific Advisory
129 Board (ESAB), Member of the Editorial Board of “The Journal of Allergy and Clinical
130 Immunology: In Practice”, Member of the Scientific Advisory Board of the Children’s
131 Respiratory and Environmental Workgroup (CREW), Member of the International Scientific &
132 Societal Advisory Board (ISSAB) of Utrecht Life Sciences (ULS), University of Utrecht,
133 Member of External Review Panel of the Faculty of Veterinary Science, University of Utrecht,
134 Member of the Selection Committee for the Gottfried Wilhelm Leibniz Program (DFG),
135 Member of the International Advisory Board of Asthma UK Centre for Applied Research
136 (AUKCAR), Member of the International Advisory Board of “The Lancet Respiratory
137 Medicine”, Member of the Scientific Advisory Board of the CHILD (Canadian Healthy Infant
138 Longitudinal Development) study, McMaster University, Hamilton, Canada, Asthma UK
139 Centre for Applied Research, Pediatric Scientific Advisory Board Iceland. All other authors
140 have no conflict of interest in relation to this work.

141

142 **Abstract**

143 *Background:* Whereas early microbial environment is known as a protective factor for atopic
144 diseases, few studies explored the role of early environment on cough during childhood. This
145 study aims to assess the association between early environment and childhood trajectories of
146 cough without a cold.

147 *Methods:* Early environment was assessed by farm-specific, home, food and infectious
148 exposures during pregnancy and first year of life in the European prospective birth cohort of
149 Protection against Allergy: STUdy in Rural Environment (PASTURE). Multinomial logistic
150 regression was used to evaluate the association between early environment and trajectories of
151 cough without a cold from 1 to 10 years.

152 *Results:* Among the 961 children included, apart from the never/infrequent trajectory (59.9%),
153 five trajectories of cough without a cold were identified: acute transient (24.1%), moderate
154 transient (6.8%), late persistent (4.8%), and early persistent (4.4%). Persistent trajectories were
155 associated with atopic respiratory diseases and food allergy. The only farm-specific exposure
156 consistently associated with a reduced risk of early persistent cough (OR=0.17 [0.04-0.72]) and
157 acute transient cough (OR=0.59 [0.39-0.90]) was consumption of boiled farm milk in the first
158 year of life. Otitis in the first 4 months and respiratory tract infections for 8 weeks or more
159 during the first year of life were associated with a higher risk of early persistent cough.

160 *Conclusion:* Whereas early otitis and repeated respiratory tract infections are risk factors for
161 early persistent cough, early microbial exposure, especially through consumption of farm milk,
162 has a protective effect against persistent cough with an early onset.

163 Word count for manuscript: 3509

164 Tables and figures: 4

165

166 **Keywords:** atopy, childhood, cough, environment, farm, prevention

167 **Introduction**

168 Cough is a vital protective reflex preventing aspiration and enhancing airway clearance, that is
169 usually related to a self-limiting viral upper respiratory tract infection, resolving in few weeks¹.
170 However, cough without a cold is frequently seen in paediatric practice and can considerably
171 impact the quality of life of the child and his family². This type of cough is often triggered by
172 innocuous stimuli, suggesting cough hypersensitivity, due to dysregulated afferent neural
173 pathways and/or central processing of the cough³. Atopy and Th2 cell-mediated inflammation
174 have been considered one of the aetiological mechanisms of cough hypersensitivity⁴. In the
175 Protection Against Allergy: STUdy in Rural Environment (PASTURE) cohort study, five
176 different trajectories of cough without a cold have been identified during early childhood (never
177 or infrequent, acute transient, moderate transient, late persistent and early persistent)⁵.
178 Persistent trajectories were associated with atopic respiratory diseases and food allergy,
179 suggesting a close link between atopy and persistent cough. Whereas early exposure to a rich
180 and diverse microbial environment is now well established as a protective factor for atopic
181 diseases and called the “biodiversity hypothesis”⁶⁻⁸, few studies explored the role of early
182 environment in the development of cough during childhood^{9,10}. Most studies focusing on cough
183 explored the association with concomitant environment such as environmental tobacco smoke
184 (ETS) and other indoor or outdoor pollutants¹¹⁻¹³. The strong association between atopy and
185 persistent cough suggest that the role of early exposures on cough deserves to be studied in
186 order to seek for early determinants that could prevent cough hypersensitivity.
187 This study aims to assess the association between early environment (during pregnancy and the
188 first year of life) and childhood trajectories of cough without a cold from 1 to 10 years in the
189 European birth cohort PASTURE.

190

191 **Methods**

192 *Study design and population*

193 The PASTURE/EFRAIM study focuses on a prospective birth cohort involving children born
194 in 2002 and 2003 in rural areas in five European countries (Austria, Finland, France, Germany
195 and Switzerland) to evaluate risk factors and protective factors for allergic diseases. The design
196 of the PASTURE study has been previously described in detail¹⁴. Briefly, pregnant women
197 were recruited during the third trimester of pregnancy and divided into two groups. Women
198 who lived on family-run farms where livestock was kept were assigned to the farm group.
199 Women from the same rural areas who did not live on a farm were assigned to the non-farmer
200 group. In total, 1,133 children were included in this birth cohort. The study was approved by
201 the local research ethics committee in each country, and written informed consent was obtained
202 from the parents. The inclusion and exclusion criteria of this study were those of the overall
203 PASTURE study¹⁵.

204 *Cough*

205 Questionnaires were administered when the children were 2, 12, 18, 24, 36, 48, 60, and 72
206 months old, and then at 10 years of age. The questionnaires were based on items from ISAAC¹⁶,
207 AMICS¹⁷, and the American Thoracic Society¹⁸. From one to ten years old, parents were asked
208 “How often has your child had a cough without a cold during the last 12 months?” (or during
209 the last six months at the 18- and 24-month follow-ups). The possible answer categories were:
210 never, less than once a month, once a month, and at least twice a month. The same question
211 was asked for “cough at night without a cold”. From the child’s age of two, parents were also
212 asked “Has your child ever had an attack of cough without a cold caused by one of the following
213 factors: physical exercise, excitation, change of temperature?”.

214

215 *Latent class trajectories of cough without a cold*

216 We previously evaluated the trajectories of cough without a cold over time from one to 10 years
217 old using a latent class analysis⁵. Of the 1,133 children enrolled in the PASTURE birth cohort,
218 961 (84.8%) had participated to at least 6 visits from 1 to 10 years of age and were used to build
219 trajectories of cough without a cold. Among the 961 children included in the study, apart from
220 the never/infrequent trajectory (59.9%), four other trajectories were identified: acute transient
221 (24.1%), moderate transient (6.8%), late persistent (4.8%), and early persistent (4.4%). The five
222 different trajectories identified were considered in this study. Compared with the
223 never/infrequent trajectory, the other trajectories were significantly associated with wheezing,
224 asthma and allergic. For asthma, the strongest association was with the early persistent
225 trajectory which had a high prevalence of cough triggers and unremitting wheeze. Late and
226 early persistent trajectories were also associated with food allergy. Atopic sensitisation was
227 only associated with the late persistent trajectory. Parental atopy was positively associated with
228 acute transient, late persistent and early persistent trajectories. Farming status was inversely
229 associated with acute transient and early persistent cough.

230

231 *Assessment of exposures*

232 Questionnaire from the third trimester of pregnancy was used to assess prenatal exposures;
233 weekly diaries, filled in by the parents during the first year of life, together with the 2-month
234 questionnaire were used to assess post-natal exposures.

235 *Farm specific exposures*

236 Stay in stable/barn during pregnancy was defined by exposure to stable/barn at least 15 min per
237 week in at least one pregnancy trimester. Prenatal contact with farm animals (cows, pigs,

238 poultries and sheep) was assumed if the mother reported contact at least several times per month
239 in one of the pregnancy trimesters. Prenatal consumption of farm milk was defined as a
240 consumption of at least a mean of 10 mL per day. Prenatal consumption of raw farm milk was
241 defined as any consumption of raw farm milk during pregnancy.

242 Postnatal exposures to stable and barn were defined as staying in the stable (cow, pig, horse)
243 and the barn at least once in the first year of life. Consumption of boiled or raw farm milk was
244 defined at least one reported consumption during the first year of life.

245 *Home exposures*

246 Prenatal maternal smoking was defined by reported smoking during pregnancy in the pregnancy
247 questionnaire, whatever the trimester. Parental smoking was assessed by the pregnancy and the
248 father questionnaires and was defined by at least one parent smoking. Prenatal contact with pets
249 (dog or cat) was assumed if the mother reported to own a cat or a dog in the pregnancy
250 questionnaire.

251 Maternal smoking was defined by a reported current smoking by the mother when the child was
252 aged of 2 months, whatever the number of cigarettes and whether indoor or outdoor. ETS at the
253 age of 2 months was defined by at least one cigarette smoked daily at home, not counting
254 cigarettes smoked in the balcony. Postnatal contact with pets was assumed when the parents
255 reported to own a cat or a dog in the 2-month questionnaire. Exposure to dampness was assumed
256 if the parents reported damp spots (with or without visible moulds) in the house in the 2-month
257 questionnaire. Wood or charcoal heating was assumed if the parents reported to use this type of
258 heating sometimes or regularly in the 2-month questionnaire.

259 *Contact with other children and infectious exposures*

260 Day-care attendance was reported in the monthly diaries between 1 and 12 months. Day-care
261 attendance was defined as at least one week of day care in the first year of life.

262 Otitis and respiratory tract infection (RTI) were reported in the monthly diaries between birth
263 and the 12th month. RTI was defined by rhinitis or cough without wheeze. Age at the first
264 episode and cumulative weeks with otitis or RTI during the first year of life were derived from
265 these diaries.

266 *Food exposures*

267 Duration of breastfeeding was defined by the duration of any breastfeeding, according to the
268 weekly diaries.

269 Parents indicated which food items had been given to the child in the weekly diaries between
270 the 3rd and 12th months. To describe the introduction to complementary foods, we used the
271 previously defined food diversity score¹⁹. This score reports the introduction of the major food
272 groups, i.e. those introduced in the first year to at least 80% of the children (vegetables or fruits,
273 cereals, bread, meat, cake and yogurt). To describe cheese diversity, cheese were categorized
274 into 6 types according to cheese families described by Montel et al.²⁰: hard pressed, semi-
275 pressed, soft, blue, fresh cheeses and cheese from the farm and cheese diversity was defined by
276 the number of cheese types consumed at 12 months²¹. In the present study, children were
277 considered as consuming a diversity of cheese if they consumed at least two different types of
278 cheese.

279

280 *Statistical analysis*

281 Multinomial logistic regression was used to analyse the association between LC trajectories of
282 cough and specific exposures. Multivariable models were adjusted for centre, parental history
283 of atopy, gender, and farming status (excepted for farm-specific exposures). A sensitivity

284 analysis with adjustment for asthma diagnosis in the first 10 years of life was performed. Data

285 analysis was performed using SAS software version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

286

287 **Results**

288 *Farm specific exposures*

289 Prenatal farm exposures to stable and barn, to a high number of animal species and prenatal
290 consumption of farm milk were not significantly associated with trajectories of cough (Table
291 1).

292 Regarding postnatal farm exposures, respectively 69.0% and 45.0% of the children stayed in
293 the stable and in the barn in the first year of life. Whereas staying in the stable in the first year
294 of life was not associated with the trajectories of cough, staying in the barn seems to be
295 associated with early persistent cough (Table 1) but the overall relationship did not reach
296 significance ($p=0.0649$). Adjustment for asthma did not change the results (Table S1).

297 Boiled and raw farm milk was consumed during the first year of life by respectively 22.5% and
298 12.9% of the children. Consumption of farm milk, whether boiled or raw, was inversely
299 associated with acute transient and early persistent cough. After adjustment for asthma, only
300 boiled farm milk consumption was still significantly associated with trajectories of cough
301 ($p=0.0088$). The association with raw farm milk seemed to persist only for early persistent
302 cough with a non-significant overall relationship ($p=0.0618$).

303 *Home exposures*

304 Maternal and parental smoking during pregnancy was not associated with the trajectories of
305 cough whereas postnatal maternal smoking was positively associated with acute and moderate
306 transient cough (Table 2). This association persisted after adjustment for asthma (Table S2).
307 There was a similar tendency for ETS but the overall relationship did not reach significance
308 ($p=0.1252$).

309 Contact with cats during pregnancy was inversely associated with moderate transient cough and
310 early persistent cough. After adjustment for asthma, the overall relationship was not significant
311 anymore ($p=0.1914$) although the association with moderate transient cough seemed to persist.
312 Contact with dogs during pregnancy and postnatal contact with pets at 2 months were not
313 significantly associated with the trajectories of cough.

314 Dampness (with or without moulds) at home at 2 months of age seemed to be associated with
315 early persistent cough although the overall model did not reached significance ($p=0.0872$).
316 Adjustment for asthma did not change these results. Early persistent cough seemed to be
317 associated with a lower prevalence of exposure to moulds at 2 months of age but it did not meet
318 statistical significance.

319 Wood or charcoal heating, used by 64% of the studied population, was not associated with the
320 trajectories of cough

321 *Contact with other children and infectious exposures*

322 Day-care was attended by 77.2% of the children during the first year of life and was positively
323 associated with acute transient cough (Table 3), even after adjustment for asthma (Table S3).
324 At the opposite, having siblings was negatively associated with acute transient cough and this
325 association persisted after adjustment for asthma.

326 Otitis in the first 4 months was positively associated with early persistent cough (Table 4) but
327 after adjustment for asthma, the overall association was not significant anymore ($p=0.2678$,
328 Table S3).

329 The vast majority of children presented at least one RTI in the first year (93.7%). Early RTI in
330 the first 4 months was positively associated with moderate transient cough but the overall
331 association did not persist after adjustment for asthma ($p=0.0612$). RTI for at least 8 weeks

332 during the first year of life was positively associated with early persistent cough, even after
333 adjustment for asthma ($p=0.0006$).

334 *Food exposures*

335 Breastfeeding duration, food diversity, yoghurt introduction and cheese diversity were not
336 associated with the trajectories of cough without a cold (Table 4). Adjustment for asthma did
337 not change the results (Table S4).

338 **Discussion**

339 The only farm-specific exposure consistently associated with a reduced risk of acute transient
340 and early persistent cough was consumption of boiled farm milk in the first year of life.
341 Exposure to barn in the first year of life seemed to be inversely associated with early persistent
342 cough but the overall association did not reach significance. Prenatal farm-specific exposures
343 and food exposures during the first year of life were not associated with the trajectories of cough
344 without a cold. On the other end, early otitis and repeated or prolonged respiratory tract
345 infection during the first year of life were associated with a higher risk of early persistent cough.
346 Maternal smoking at 2 months of age was associated with an increased risk of acute and
347 moderate transient cough and there was a similar tendency for persistent trajectories of cough.

348

349 To the best of our knowledge, this is the first study to explore the relationship between early
350 environmental determinants from several sources and childhood trajectories of cough without
351 a cold. Most studies that explored early determinants of cough focused on ETS¹¹ and a few on
352 contact with pets²². Two French birth cohorts explored the impact of early indoor environment
353 in allergic and respiratory phenotypes during childhood: the PELAGIE cohort¹⁰ and the PARIS
354 cohort⁹. Both cohorts explored home exposures such as ETS, contact with pets, type of
355 individual heating, exposure to house dust mite and moulds as well as exposure to chemical
356 pollutants. In the PARIS birth cohort, four respiratory/allergic phenotypes were identified over
357 the first 4 years of life: transient rhinitis, transient wheeze, cough/rhinitis and dermatitis
358 phenotypes. In the PELAGIE cohort, four phenotypes of respiratory and allergic symptoms
359 over the first 6 years of life were identified: transient cough, eczema/cough, wheeze/cough and
360 mixed phenotypes.

361 Whereas the PELAGIE and the PARIS cohort did not find any association between ETS and
362 cough related phenotypes, postnatal maternal smoking in our study was significantly associated

363 with acute and moderate transient trajectories of cough but not significantly with the persistent
364 trajectories. One hypothesis could be that ETS is initially an irritant, increasing cough
365 sensitivity but after a habituation period, it could decrease cough sensitivity, as described in
366 smokers²³. Another one is the lower statistical power in the trajectories with a smaller number
367 of children. An interesting finding in our study is that maternal smoking seems to have a
368 stronger association with trajectories of cough than ETS. A systematic quantitative review
369 already reported an increased risk of cough when mother only smoking than when father only
370 smoking as well as evidence of a dose response¹¹. The low prevalence of ETS in our study did
371 not allow us to explore ETS level.

372 As in the PELAGIE cohort, wood or charcoal heating was not associated with cough trajectories
373 in our study. Household air pollution due to combustion sources and its potential irritant effect
374 are influenced by the type of fireplace and ventilation in the house and charcoal heating seems
375 to be more associated to cough than wood heating^{13,24}. Question regarding heating modes in
376 our study did not allow to differentiate wood from charcoal heating neither the type of systems.
377 Whereas ETS and charcoal heating are considered as irritants, the impact of contact with pets
378 and exposure to dampness and moulds on respiratory symptoms are subjects to debate. A pooled
379 analysis of 11 birth cohorts conclude to the absence of association between exposure to pets
380 and asthma or rhinitis²², but a study published in 2018 reported that exposure to pets was
381 associated with an increased risk of cough and wheeze in urban children and a decreased risk
382 of asthma in rural children²⁵. In our rural setting study, prenatal contact with cat was associated
383 to a decreased risk for moderate transient and early persistent trajectories of cough. Exposure
384 to cats has previously been described as a protective factor for atopic asthma in school-age
385 children²⁶ and could reflect exposure to endotoxin. Even in the urban setting of the PARIS
386 cohort, cat allowed in the child's bedroom at birth was associated with a decreased risk of
387 cough/rhinitis phenotype⁹.

388 Exposure to household dampness and visible moulds are mostly reported as associated with an
389 increased risk of cough and asthma^{9,12,27-29} but most of these studies explored current exposure
390 and not early exposure. Our study suggests that early exposure to dampness, with or without
391 visible moulds, might be protective against early persistent cough. Early exposure to dampness
392 could reflect a higher microbial exposure³⁰, especially fungi exposure that has previously been
393 described as inversely associated with asthma³¹.

394 The protective effect of a higher microbial exposure on atopic diseases⁷ led to explore the farm
395 environment, as a model of a rich and diverse microbial environment⁸. Whereas prenatal contact
396 with a diversity of animal species³² and postnatal exposure to animal shed for more than 2 hours
397 a week³³ were previously identified as a protective factor against atopic dermatitis and wheeze,
398 only exposure to the barn might be associated with a lower prevalence of early persistent cough.
399 One explanation could be the high endotoxin level in barn dust³⁴. The only farm-specific
400 exposure consistently associated with cough trajectories was the consumption of farm milk
401 compatible with a risk reduction of early persistent cough of more than 80%. Previous studies
402 showed that consumption of farm milk during pregnancy and childhood was associated with a
403 reduced risk of asthma and atopic diseases and with an increased number of regulatory T-
404 cells^{36,37}. Consumption of farm products (milk and egg) was also associated to an early
405 maturation of gut microbiome³⁸. As previously developed, neuro-immune interactions are
406 involved in cough hypersensitivity. Thus, immunomodulation, through consumption of farm
407 milk, could lead to a decrease risk of persistent cough³⁵. Furthermore, we found a protective
408 effect of farm milk consumption against acute-transient cough, that we have hypothesized as
409 post-viral cough, suggesting a protective effect of farm milk against infections³⁹.

410 While several studies suggest an immunomodulation through an early diverse diet^{19 40 21}, food
411 exposures were not associated with the trajectories of cough.

412 Regarding breastfeeding, few studies reported an inverse association with cough : in the Tucson
413 cohort, a longer duration of breastfeeding was associated with a reduced risk of recurrent cough
414 in adult life⁴¹ and in the PARIS cohort, breastfeeding during the first 6 months was protective
415 against the cough/rhinitis phenotype⁹. In our study, the absence of association with persistent
416 trajectories does not confirm the hypothesis of an immune modulation through breastfeeding⁴³.
417 Our results needs to be mitigate by two principal factors: duration of exclusive or predominant
418 breastfeeding was not taken into account⁴⁴ and recent studies have shown that the composition
419 of human milk, and therefore its immune impact, is dependant from several factors⁴⁵.
420 As in the PARIS cohort⁹, day-care attendance was associated to an increased risk of acute
421 transient symptoms, probably reflecting the higher frequency of infection in children attending
422 day-care, but we found no association with the other trajectories. On the contrary, having
423 siblings, the first stone of the Hygiene hypothesis⁴⁶, was associated with a reduced risk of acute
424 transient cough but not with the persistent ones. Early infection as otitis and repeated or
425 prolonged RTI were associated with an increased risk of early persistent cough. In an Australian
426 cohort study, childcare attendance and history of wheeze were predictors of chronic cough in
427 young children⁴⁷. Early respiratory infections, especially if repeated or prolonged, could
428 enhance the neural pathway of persistent cough^{2,48}.

429

430 The rural setting of the PASTURE birth cohort gave us the opportunity to explore protective
431 determinants from the farming environments that could applied to general
432 population. Furthermore, the prospective collection of exposures during pregnancy and week
433 by week after the birth of the child is one of the strengths of this study.

434 In this birth cohort, non selected for the risk of atopy, the small number of children having an
435 early persistent trajectory of cough did not allow us to perform stratified analyses according to
436 asthma. The high prevalence of asthma and allergic rhinitis in the early persistent trajectory of

437 cough without a cold questions whether the association found with several environmental
438 factors is related to asthma. However, the adjustment on asthma did not change substantially
439 the association of early exposures with trajectories of cough.

440

441 **Conclusion**

442 Whereas early otitis and early repeated respiratory tract infection are positively associated with
443 early persistent cough, microbial early exposure, especially through the consumption of farm
444 milk in the first year of life, seems to have a protective effect against early persistent and acute
445 transient trajectories of cough. These results suggest that the maturation process of respiratory
446 tract and nervous system, involved in cough sensitivity, seems to be influenced by several
447 environmental factors during early childhood and linked to immune modulation. The protective
448 effect of farm milk consumption (whether boiled or not) on the early persistent trajectory of
449 cough without a cold suggests a potential protective effect not only on atopic diseases but also
450 on persistent cough.

References

1. Morice AH, Millqvist E, Bieksiene K, et al. ERS guidelines on the diagnosis and treatment of chronic cough in adults and children. *Eur Respir J*. 2020;55(1). doi:10.1183/13993003.01136-2019
2. Chang AB. Pediatric cough: children are not miniature adults. *Lung*. 2010;188 Suppl 1:S33-40. doi:10.1007/s00408-009-9166-2
3. Morice AH. The cough hypersensitivity syndrome: a novel paradigm for understanding cough. *Lung*. 2010;188 Suppl 1:S87-90. doi:10.1007/s00408-009-9185-z
4. Ioan I, Poussel M, Coutier L, et al. What is chronic cough in children? *Front Physiol*. 2014;5:322. doi:10.3389/fphys.2014.00322
5. Divaret-Chauveau A, Mauny F, Hose A, et al. Trajectories of cough without a cold in early childhood and associations with atopic diseases. *Clin Exp Allergy*. 2022;00:1-14. doi:10.1111/cea.14257
6. Johnson CC, Ownby DR. The infant gut bacterial microbiota and risk of pediatric asthma and allergic diseases. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2017;179:60-70. doi:10.1016/j.trsl.2016.06.010
7. Haahtela T. A biodiversity hypothesis. *Allergy*. 2019;74(8):1445-1456. doi:10.1111/all.13763
8. von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis – The epidemiological evidence. *Immunobiology*. 2007;212(6):433-439. doi:10.1016/j.imbio.2007.03.002
9. Rancière F, Nikasinovic L, Bousquet J, Momas I. Onset and persistence of respiratory/allergic symptoms in preschoolers: new insights from the PARIS birth cohort. *Allergy*. 2013;68(9):1158-1167. doi:10.1111/all.12208
10. Apel K, Costet N, Chapron A, et al. Home environment: respiratory and allergic phenotypes from birth to age six in the PELAGIE cohort. *NPJ Prim Care Respir Med*. 2019;29(1):29. doi:10.1038/s41533-019-0141-y
11. Cook DG, Strachan DP. Health effects of passive smoking. 3. Parental smoking and prevalence of respiratory symptoms and asthma in school age children. *Thorax*. 1997;52(12):1081-1094. doi:10.1136/thx.52.12.1081
12. Cable N, Kelly Y, Bartley M, Sato Y, Sacker A. Critical role of smoking and household dampness during childhood for adult phlegm and cough: a research example from a prospective cohort study in Great Britain. *BMJ Open*. 2014;4(4):e004807. doi:10.1136/bmjopen-2014-004807
13. Coker E, Katamba A, Kizito S, Eskenazi B, Davis JL. Household air pollution profiles associated with persistent childhood cough in urban Uganda. *Environ Int*. 2020;136:105471. doi:10.1016/j.envint.2020.105471

14. Mutius E, Schmid S. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy*. 2006;61(4):407-413. doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01009.x
15. Pfefferle PI, Büchele G, Blümer N, et al. Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: The PASTURE Study. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:108-115.e3. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.019
16. Asher MI, Stewart AW, Mallol J, et al. Which population level environmental factors are associated with asthma, rhinoconjunctivitis and eczema? Review of the ecological analyses of ISAAC Phase One. *Respir Res*. 2010;11:8. doi:10.1186/1465-9921-11-8
17. Basagaña X, Torrent M, Atkinson W, et al. Domestic aeroallergen levels in Barcelona and Menorca (Spain). *Pediatr Allergy Immunol*. 2002;13(6):412-417.
18. Ferris BG. Epidemiology Standardization Project (American Thoracic Society). *Am Rev Respir Dis*. 1978;118(6 Pt 2):1-120.
19. Roduit C, Frei R, Depner M, et al. Increased food diversity in the first year of life is inversely associated with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(4):1056-1064. doi:10.1016/j.jaci.2013.12.1044
20. Montel MC, Buchin S, Mallet A, et al. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int J Food Microbiol*. 2014;177:136-154. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019
21. Nicklaus S, Divaret-Chauveau A, Chardon ML, et al. The protective effect of cheese consumption at 18 months on allergic diseases in the first 6 years. *Allergy*. 2019;74(4):788-798. doi:10.1111/all.13650
22. Lødrup Carlsen KC, Roll S, Carlsen KH, et al. Does Pet Ownership in Infancy Lead to Asthma or Allergy at School Age? Pooled Analysis of Individual Participant Data from 11 European Birth Cohorts. *PLoS ONE*. 2012;7(8). doi:10.1371/journal.pone.0043214
23. Dicpinigaitis PV. Cough reflex sensitivity in cigarette smokers. *Chest*. 2003;123(3):685-688. doi:10.1378/chest.123.3.685
24. Potts JF, Rona RJ, Oyarzun MJ, Amigo H, Bustos P. Indoor risk factors for cough and their relation to wheeze and sensitization in Chilean young adults. *Am J Public Health*. 2008;98(4):680-686. doi:10.2105/AJPH.2006.093302
25. Krzych-Fałta E, Furmańczyk K, Piekarska B, et al. Extent of protective or allergy-inducing effects in cats and dogs. *Ann Agric Environ Med AAEM*. 2018;25(2):268-273. doi:10.26444/aaem/80596
26. Oberle D, von Mutius E, von Kries R. Childhood asthma and continuous exposure to cats since the first year of life with cats allowed in the child's bedroom. *Allergy*. 2003;58(10):1033-1036. doi:10.1034/j.1398-9995.2003.00285.x
27. Heinrich J. Influence of indoor factors in dwellings on the development of childhood asthma. *Int J Hyg Environ Health*. 2011;214(1):1-25. doi:10.1016/j.ijheh.2010.08.009

28. Austin JB, Russell G. Wheeze, cough, atopy, and indoor environment in the Scottish Highlands. *Arch Dis Child*. 1997;76(1):22-26. doi:10.1136/adc.76.1.22
29. Juel Holst G, Pørneki A, Lindgreen J, et al. Household dampness and microbial exposure related to allergy and respiratory health in Danish adults. *Eur Clin Respir J*. 2020;7(1):1706235. doi:10.1080/20018525.2019.1706235
30. Peitzsch M, Sulyok M, Täubel M, et al. Microbial secondary metabolites in school buildings inspected for moisture damage in Finland, The Netherlands and Spain. *J Environ Monit JEM*. 2012;14(8):2044-2053. doi:10.1039/c2em30195d
31. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*. 2011;364(8):701-709. doi:10.1056/NEJMoa1007302
32. Roduit C, Wohlgensinger J, Frei R, et al. Prenatal animal contact and gene expression of innate immunity receptors at birth are associated with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(1):179-185, 185.e1. doi:10.1016/j.jaci.2010.10.010
33. Loss GJ, Depner M, Hose AJ, et al. The Early Development of Wheeze. Environmental Determinants and Genetic Susceptibility at 17q21. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(8):889-897. doi:10.1164/rccm.201507-1493OC
34. Schuijs MJ, Willart MA, Vergote K, et al. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science*. 2015;349(6252):1106-1110. doi:10.1126/science.aac6623
35. Song WJ, Chang YS. Cough hypersensitivity as a neuro-immune interaction. *Clin Transl Allergy*. 2015;5:24. doi:10.1186/s13601-015-0069-4
36. Loss G, Apprich S, Waser M, et al. The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: The GABRIELA study. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(4):766-773.e4. doi:10.1016/j.jaci.2011.07.048
37. Lluís A, Depner M, Gaugler B, et al. Increased regulatory T-cell numbers are associated with farm milk exposure and lower atopic sensitization and asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):551-559. doi:10.1016/j.jaci.2013.06.034
38. Depner M, Taft DH, Kirjavainen PV, et al. Maturation of the gut microbiome during the first year of life contributes to the protective farm effect on childhood asthma. *Nat Med*. 2020;26(11):1766-1775. doi:10.1038/s41591-020-1095-x
39. Bergroth E, Roponen M, Karvonen AM, et al. Enhanced T helper 1 and 2 cytokine responses at birth associate with lower risk of middle ear infections in infancy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2017;28(1):53-59. doi:10.1111/pai.12658
40. Roduit C, Frei R, Loss G, et al. Development of atopic dermatitis according to age of onset and association with early-life exposures. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(1):130-6.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.043.
41. Gerhart KD, Stern DA, Guerra S, Morgan WJ, Martinez FD, Wright AL. Protective effect of breastfeeding on recurrent cough in adulthood. *Thorax*. 2018;73(9):833-839. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210841

42. Davaisse-Paturet C, Adel-Patient K, Forhan A, et al. Breastfeeding initiation or duration and longitudinal patterns of infections up to 2 years and skin rash and respiratory symptoms up to 8 years in the EDEN mother-child cohort. *Matern Child Nutr.* 2020;16(3):e12935. doi:10.1111/mcn.12935
43. Davis EC, Castagna VP, Sela DA, et al. Gut microbiome and breast-feeding: Implications for early immune development. *J Allergy Clin Immunol.* 2022;150(3):523-534. doi:10.1016/j.jaci.2022.07.014
44. Davaisse-Paturet C, Adel-Patient K, Divaret-Chauveau A, et al. Breastfeeding Status and Duration and Infections, Hospitalizations for Infections, and Antibiotic Use in the First Two Years of Life in the ELFE Cohort. *Nutrients.* 2019;11(7). doi:10.3390/nu11071607
45. Berdi M, Lauzon-Guillain B de, Forhan A, et al. Immune components of early breastmilk: Association with maternal factors and with reported food allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol.* 2019;30(1):107-116. doi:10.1111/pai.12998
46. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis.” *Thorax.* 2000;55(Suppl 1):S2-S10.
47. Au-Yeung YT, Chang AB, Grimwood K, et al. Risk Factors for Chronic Cough in Young Children: A Cohort Study. *Front Pediatr.* 2020;8:444. doi:10.3389/fped.2020.00444
48. Chang AB, Oppenheimer JJ, Weinberger M, et al. Etiologies of Chronic Cough in Pediatric Cohorts: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest.* 2017;152(3):607-617. doi:10.1016/j.chest.2017.06.006

TABLES

Table 1: Association between LCA trajectories of cough without a cold and farm specific exposures during pregnancy and first year of life

		LCA trajectories of cough without a cold						p-value [†]
		All (n=961)	Never/infrequent (n=576)	Acute transient (n=232)	Moderate transient (n=65)	Late persistent (n=46)	Early persistent (n=42)	
Prenatal farm exposures								
Work/stay in stable	No./Total no. (%)	489/913 (53.6)	300/549 (54.6)	108/222 (48.6)	33/60 (55.0)	26/44 (59.1)	22/38 (57.9)	0.4780
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.76 (0.55–1.04)	0.96 (0.55–1.66)	1.19 (0.63–2.28)	0.97 (0.49–1.93)	
Work/stay in barn	No./Total no. (%)	366/913 (40.1)	225/549 (41.0)	80/222 (36.0)	25/60 (41.7)	19/44 (43.2)	17/38 (44.7)	0.6309
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.76 (0.55–1.07)	0.95 (0.54–1.67)	1.05 (0.55–2.00)	0.90 (0.45–1.81)	
Number of animal species (reference=0)								0.9279
3-4	No./Total no. (%)	125/959 (13.0)	80/574 (13.9)	25/232 (10.8)	8/65 (12.3)	8/46 (17.4)	4/42 (9.5)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.77 (0.45-1.30)	0.75 (0.31-1.82)	1.31 (0.53-3.26)	0.55 (0.17-1.74)	
1-2	No./Total no. (%)	452/959 (47.1)	267/574 (46.5)	114/232 (24.2)	29/65 (44.6)	21/46 (45.6)	21/42 (50.0)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.99 (0.71-1.38)	0.83 (0.48-1.45)	1.02 (0.51-2.02)	0.89 (0.45-1.75)	
Farm milk	No./Total no. (%)	415/958 (43.3)	253/574 (44.1)	93/231 (40.3)	27/65 (41.5)	21/46 (45.6)	21/42 (50.0)	0.7773
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.82 (0.59–1.13)	0.84 (0.49–1.45)	0.98 (0.52–1.83)	1.03 (0.54–1.99)	
Unboiled farm milk	No./Total no. (%)	354/958 (36.9)	214/574 (37.3)	80/232 (34.5)	25/64 (39.1)	17/46 (37.0)	18/42 (42.9)	0.8839
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.85 (0.61-1.18)	1.01 (0.59-1.75)	0.93 (0.49-1.76)	1.08 (0.56-2.08)	
Postnatal farm exposures								
Stay in stable	No./Total no. (%)	640/928 (69.0)	402/554 (72.6)	143/227 (63.0)	40/64 (62.5)	34/44 (77.3)	21/39 (53.8)	0.1156
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.74 (0.53-1.04)	0.79 (0.45-1.40)	1.66 (0.78-3.53)	0.60 (0.30-1.19)	
Stay in barn	No./Total no. (%)	418/928 (45.0)	271/554 (48.9)	95/227 (41.8)	27/64 (42.2)	18/44 (40.9)	7/39 (17.9)	0.0649
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.87 (0.63-1.21)	1.01 (0.58-1.75)	0.89 (0.46-1.74)	0.27 (0.11-0.65)	
Boiled farm milk	No./Total no. (%)	209/928 (22.5)	151/554 (27.3)	38/227 (16.7)	13/64 (20.3)	5/44 (11.4)	2/39 (5.1)	0.0080
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.59 (0.39-0.90)	0.78 (0.40-1.51)	0.36 (0.12-1.05)	0.17 (0.04-0.72)	
Unboiled farm milk	No./Total no. (%)	120/928 (12.9)	84/554 (15.2)	22/227 (9.7)	10/64 (15.6)	3/44 (6.8)	1/39 (2.6)	0.0391
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.58 (0.35-0.97)	0.95 (0.45-1.98)	0.40 (0.12-1.36)	0.11 (0.01-0.81)	

OR^a: odds ratio adjusted for centre, sex, and parental atopy; values in bold when CI does not include 1. [†]Values in bold: p<0.05.

Table 2: Association between LCA trajectories of cough without a cold and home exposures during pregnancy and at 2 months of age

		LCA trajectories of cough without a cold						p-value†
		All (n=961)	Never/infrequent (n=576)	Acute transient (n=232)	Moderate transient (n=65)	Late persistent (n=46)	Early persistent (n=42)	
Prenatal home exposures								
Maternal smoking	No./Total no. (%)	121/961 (12.6)	82/576 (14.2)	25/232 (10.8)	8/65 (12.3)	4/46 (8.7)	2/42 (4.8)	0.2032
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.63 (0.38-1.03)	0.83 (0.37-1.84)	0.60 (0.20-1.78)	0.29 (0.07-1.28)	
Parental smoking	No./Total no. (%)	579/961 (60.2)	352/576 (61.1)	143/232 (61.6)	37/65 (56.9)	21/46 (45.6)	26/42 (61.9)	0.4460
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.00 (0.72-1.38)	0.88 (0.51-1.51)	0.57 (0.30-1.07)	1.19 (0.61-2.33)	
Contact with pets	No./Total no. (%)	612/961 (63.7)	379/576 (65.8)	135/232 (58.2)	43/65 (66.1)	27/46 (58.7)	28/42 (66.7)	0.3038
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.72 (0.51-1.03)	0.96 (0.53-1.75)	0.59 (0.29-1.20)	0.78 (0.37-1.67)	
Contact with dogs	No./Total no. (%)	292/959 (30.4)	182/575 (31.6)	65/231 (28.1)	22/65 (33.8)	10/46 (21.7)	13/42 (30.9)	0.2874
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.79 (0.54-1.15)	0.91 (0.49-1.67)	0.49 (0.22-1.10)	0.61 (0.28-1.29)	
Contact with cats	No./Total no. (%)	466/961 (48.5)	293/576 (50.9)	106/232 (45.7)	25/65 (38.5)	25/46 (54.3)	17/42 (40.5)	0.0460
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.85 (0.59-1.22)	0.47 (0.25-0.87)	0.97 (0.48-1.98)	0.43 (0.20-0.91)	
Postnatal home exposures (at 2 months)								
Maternal smoking	No./Total no. (%)	65/959 (6.8)	26/575 (4.5)	22/232 (9.5)	10/64 (15.6)	4/46 (8.7)	3/42 (7.1)	0.0030
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	2.42 (1.32-4.44)	4.46 (1.99-9.99)	1.96 (0.56-6.89)	1.99 (0.56-7.11)	
ETS	No./Total no. (%)	42/961 (4.4)	20/576 (3.5)	14/232 (6.03)	5/65 (7.7)	1/46 (2.2)	2/42 (4.8)	0.1252
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	2.19 (1.06-4.52)	3.01 (1.05-8.63)	0.97 (0.12-7.60)	2.29 (0.49-10.75)	
Contact with dogs	No./Total no. (%)	289/959 (30.1)	176/575 (30.6)	71/232 (30.6)	14/64 (21.9)	17/46 (37.0)	11/42 (26.2)	0.2931
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.17 (0.81-1.70)	0.59 (0.30-1.16)	1.42 (0.70-2.88)	0.79 (0.36-1.73)	
Contact with cats	No./Total no. (%)	419/959 (43.7)	272/575 (47.3)	95/232 (40.9)	20/64 (31.2)	20/46 (43.5)	12/42 (28.6)	0.2742
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.08 (0.76-1.56)	0.55 (0.29-1.04)	0.88 (0.43-1.82)	0.64 (0.29-1.42)	
Dampness at home	No./Total no. (%)	227/958 (23.7)	136/574 (23.7)	65/232 (28.0)	15/64 (23.4)	9/46 (19.6)	2/42 (4.8)	0.0872
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.29 (0.90-1.84)	1.04 (0.56-1.93)	0.87 (0.40-1.88)	0.18 (0.04-0.78)	
Mould at home	No./Total no. (%)	146/958 (15.2)	87/574 (15.2)	43/232 (18.5)	9/64 (14.1)	6/46 (13.0)	1/41 (2.4)	0.2530
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.31 (0.86-1.98)	0.96 (0.45-2.03)	0.95 (0.38-2.35)	0.16 (0.02-1.18)	
Wood/charcoal heating	No./Total no. (%)	607/950 (64.0)	376/571 (65.8)	139/232 (59.9)	38/62 (61.3)	31/45 (68.9)	24/40 (60.0)	0.3771
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.77 (0.55-1.10)	0.68 (0.37-1.25)	1.01 (0.48-2.12)	0.60 (0.28-1.29)	

OR^a: odds ratio adjusted for centre, sex, parental atopy and farming status; values in bold when CI does not include 1. †Values in bold: p<0.05. ETS: Environmental tobacco smoke.

Table 3: Association between LCA trajectories of cough without a cold, contact with other children and infectious exposures in the first year of life

		LCA trajectories of cough without a cold						p-value†
		All (n=961)	Never/infrequent (n=576)	Acute transient (n=232)	Moderate transient (n=65)	Late persistent (n=46)	Early persistent (n=42)	
Contact with other children								
Daycare attendance	No./Total no. (%)	716/928 (77.2)	404/554 (72.9)	194/227 (85.5)	55/64 (85.9)	32/44 (72.7)	31/39 (79.5)	0.0364
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.86 (1.21-2.87)	1.75 (0.82-3.75)	0.94 (0.44-2.01)	0.79 (0.33-1.91)	
Siblings (reference=none)								0.0240
≥ 3	No./Total no. (%)	103/961 (10.7)	77/576 (13.4)	13/232 (5.6)	4/65 (6.1)	4/46 (8.7)	5/42 (11.9)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.34 (0.18-0.67)	0.43 (0.14-1.34)	0.53 (0.17-1.67)	1.60 (0.48-5.41)	
1-2	No./Total no. (%)	509/961 (53.0)	308/576 (53.5)	114/232 (49.1)	36/65 (55.4)	22/46 (47.8)	29/42 (69.0)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.67 (0.47-0.94)	0.88 (0.50-1.58)	0.70 (0.36-1.38)	1.97 (0.85-4.55)	
Infectious exposures								
Otitis	No./Total no. (%)	198/928 (21.3)	103/554 (18.6)	52/227 (22.9)	16/64 (25.0)	10/44 (22.7)	17/39 (43.6)	0.2126
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.09 (0.72-1.62)	1.20 (0.63-2.29)	1.02 (0.45-2.29)	2.46 (1.17-5.16)	
Otitis in the first 4 months	No./Total no. (%)	21/928 (4.4)	9/554 (1.6)	4/227 (1.8)	2/64 (3.1)	1/44 (2.3)	5/39 (12.8)	0.0333
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.00 (0.29-3.35)	1.53 (0.31-7.62)	1.11 (0.13-9.42)	6.64 (1.96-22.50)	
RTI in the first 4 months (without wheeze)	No./Total no. (%)	352/928 (37.9)	210/554 (37.9)	74/227 (32.6)	33/64 (51.6)	15/44 (34.1)	20/39 (51.3)	0.0249
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.78 (0.56-1.10)	1.77 (1.04-3.01)	0.83 (0.43-1.61)	1.75 (0.89-3.43)	
RTI 8 weeks or more (without wheeze)	No./Total no. (%)	223/928 (24.0)	121/554 (21.8)	51/227 (22.5)	21/64 (32.8)	6/44 (13.6)	24/39 (61.5)	0.0001
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.93 (0.63-1.36)	1.56 (0.88-2.78)	0.48 (0.19-1.17)	4.26 (2.12-8.57)	

OR^a: odds ratio adjusted for centre, sex, parental atopy and farming status; values in bold when CI does not include 1. †Values in bold: p<0.05.

Table 4: Association between LCA trajectories of cough without a cold and food exposures in the first year of life

		All (n=961)	LCA trajectories of cough without a cold					p-value†
			Never/infrequent (n=576)	Acute transient (n=232)	Moderate transient (n=65)	Late persistent (n=46)	Early persistent (n=42)	
Food exposures								
Breastfeeding (reference ≥ 7 months)								
3 to 6 months	No./Total no. (%)	263/951 (27.7)	157/571 (27.5)	67/228 (29.4)	19/64 (29.7)	8/46 (17.4)	12/42 (28.6)	0.2388
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.23 (0.84-1.80)	1.24 (0.65-2.36)	0.62 (0.27-1.43)	1.06 (0.50-2.29)	
Less than 3 months	No./Total no. (%)	155/951 (16.3)	99/571 (17.3)	30/228 (13.2)	13/64 (20.3)	6/46 (13.0)	7/42 (16.7)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.80 (0.49-1.33)	1.52 (0.72-3.20)	0.82 (0.31-2.14)	1.03 (0.40-2.68)	
None	No./Total no. (%)	91/951 (9.6)	47/571 (8.2)	30/228 (13.2)	5/64 (7.8)	7/46 (15.2)	2/42 (4.8)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.99 (1.14-3.48)	1.33 (0.46-3.85)	2.24 (0.80-6.26)	0.84 (0.17-4.03)	
Food diversity at 1 yr								
≥ 6 major food items	No./Total no. (%)	579/961 (60.2)	356/576 (61.8)	127/232 (54.7)	43/65 (66.1)	29/46 (63.0)	24/42 (57.1)	0.2571
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.73 (0.53-1.00)	1.20 (0.70-2.09)	1.11 (0.59-2.11)	0.80 (0.42-1.54)	
Yoghurt introduction at 1 yr								
	No./Total no. (%)	755/947 (79.7)	462/569 (81.2)	183/229 (79.9)	52/64 (81.2)	31/45 (68.9)	27/40 (67.5)	0.2184
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.94 (0.62-1.41)	0.98 (0.48-1.98)	1.87 (0.91-3.85)	1.86 (0.87-3.98)	
Cheese diversity at 1yr								
≥ 2 different types of cheese	No./Total no. (%)	184/923 (19.9)	125/556 (16.9)	37/219 (23.7)	8/63 (12.7)	6/45 (13.3)	8/40 (20.0)	0.2751
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.71 (0.47-1.09)	0.50 (0.23-1.12)	0.66 (0.27-1.64)	0.98 (0.42-2.27)	

OR^a: odds ratio adjusted for centre, sex, parental atopy and farming status; values in bold when CI does not include 1. †Values in bold: p<0.05.

Supplementary tables

Table S1: Association between LCA trajectories of cough without a cold and farm specific exposures, adjusted for asthma

		LCA trajectories of cough without a cold						p-value†
		All (n=961)	Never/infrequent (n=576)	Acute transient (n=232)	Moderate transient (n=65)	Late persistent (n=46)	Early persistent (n=42)	
Prenatal farm exposures								
Work/stay in stable	No./Total no. (%)	489/913 (53.6)	300/549 (54.6)	108/222 (48.6)	33/60 (55.0)	26/44 (59.1)	22/38 (57.9)	0.5721
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.80 (0.58–1.11)	0.97 (0.55–1.69)	1.22 (0.62–2.39)	1.24 (0.59–2.60)	
Work/stay in barn	No./Total no. (%)	366/913 (40.1)	225/549 (41.0)	80/222 (36.0)	25/60 (41.7)	19/44 (43.2)	17/38 (44.7)	0.7464
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.81 (0.57–1.14)	1.02 (0.57–1.81)	1.12 (0.57–2.21)	1.06 (0.50–2.24)	
Number of animal species (reference=0)								0.9031
3-4	No./Total no. (%)	125/959 (13.0)	80/574 (13.9)	25/232 (10.8)	8/65 (12.3)	8/46 (17.4)	4/42 (9.5)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.78 (0.46–1.33)	0.74 (0.30–1.81)	1.35 (0.53–3.43)	0.66 (0.20–2.23)	
1-2	No./Total no. (%)	452/959 (47.1)	267/574 (46.5)	114/232 (24.2)	29/65 (44.6)	21/46 (45.6)	21/42 (50.0)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.03 (0.73–1.44)	0.81 (0.46–1.43)	0.88 (0.42–1.81)	0.92 (0.44–1.93)	
Farm milk	No./Total no. (%)	415/958 (43.3)	253/574 (44.1)	93/231 (40.3)	27/65 (41.5)	21/46 (45.6)	21/42 (50.0)	0.8210
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.85 (0.61–1.18)	0.81 (0.47–1.41)	1.04 (0.53–2.00)	1.06 (0.52–2.15)	
Unboiled farm milk	No./Total no. (%)	354/958 (36.9)	214/574 (37.3)	80/232 (34.5)	25/64 (39.1)	17/46 (37.0)	18/42 (42.9)	0.9352
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.87 (0.63–1.22)	0.97 (0.55–1.69)	0.95 (0.48–1.86)	1.11 (0.54–2.24)	
Postnatal farm exposures								
Stay in stable	No./Total no. (%)	640/928 (69.0)	402/554 (72.6)	143/227 (63.0)	40/64 (62.5)	34/44 (77.3)	21/39 (53.8)	0.2161
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.77 (0.55–1.10)	0.81 (0.45–1.43)	1.77 (0.79–3.97)	0.70 (0.33–1.46)	
Stay in barn	No./Total no. (%)	418/928 (45.0)	271/554 (48.9)	95/227 (41.8)	27/64 (42.2)	18/44 (40.9)	7/39 (17.9)	0.0999
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.89 (0.64–1.24)	0.97 (0.55–1.71)	0.84 (0.42–1.71)	0.27 (0.11–0.68)	
Boiled farm milk	No./Total no. (%)	209/928 (22.5)	151/554 (27.3)	38/227 (16.7)	13/64 (20.3)	5/44 (11.4)	2/39 (5.1)	0.0088
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.59 (0.39–0.90)	0.81 (0.41–1.58)	0.36 (0.12–1.07)	0.14 (0.03–0.64)	
Unboiled farm milk	No./Total no. (%)	120/928 (12.9)	84/554 (15.2)	22/227 (9.7)	10/64 (15.6)	3/44 (6.8)	1/39 (2.6)	0.0618
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.61 (0.36–1.02)	1.02 (0.49–2.16)	0.31 (0.07–1.35)	0.13 (0.02–0.99)	

OR^a: odds ratio adjusted for centre, sex, parental atopy and asthma; values in bold when CI does not include 1. †Values in bold: p<0.05.

Table S2: Association between LCA trajectories of cough without a cold and home exposures during pregnancy and at 2 months of age

		LCA trajectories of cough without a cold						p-value†
		All (n=961)	Never/infrequent (n=576)	Acute transient (n=232)	Moderate transient (n=65)	Late persistent (n=46)	Early persistent (n=42)	
Prenatal home exposures								
Maternal smoking	No./Total no. (%)	121/961 (12.6)	82/576 (14.2)	25/232 (10.8)	8/65 (12.3)	4/46 (8.7)	2/42 (4.8)	0.1778
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.62 (0.37-1.04)	0.80 (0.35-1.80)	0.55 (0.18-1.71)	0.23 (0.05-1.11)	
Parental smoking	No./Total no. (%)	579/961 (60.2)	352/576 (61.1)	143/232 (61.6)	37/65 (56.9)	21/46 (45.6)	26/42 (61.9)	0.4433
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.04 (0.74-1.45)	0.90 (0.52-1.56)	0.62 (0.32-1.22)	1.49 (0.71-3.13)	
Contact with pets	No./Total no. (%)	612/961 (63.7)	379/576 (65.8)	135/232 (58.2)	43/65 (66.1)	27/46 (58.7)	28/42 (66.7)	0.3891
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.75 (0.52-1.07)	0.98 (0.54-1.80)	0.57 (0.28-1.18)	0.90 (0.41-1.97)	
Contact with dogs	No./Total no. (%)	292/959 (30.4)	182/575 (31.6)	65/231 (28.1)	22/65 (33.8)	10/46 (21.7)	13/42 (30.9)	0.7087
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.83 (0.56-1.21)	1.02 (0.55-1.91)	0.65 (0.28-1.50)	0.71 (0.31-1.62)	
Contact with cats	No./Total no. (%)	466/961 (48.5)	293/576 (50.9)	106/232 (45.7)	25/65 (38.5)	25/46 (54.3)	17/42 (40.5)	0.1914
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.93 (0.65-1.35)	0.50 (0.27-0.94)	1.04 (0.49-2.20)	0.57 (0.26-1.28)	
Postnatal home exposures (at 2 months)								
Maternal smoking	No./Total no. (%)	65/959 (6.8)	26/575 (4.5)	22/232 (9.5)	10/64 (15.6)	4/46 (8.7)	3/42 (7.1)	0.0166
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	2.20 (1.19-4.08)	3.81 (1.65-8.81)	1.94 (0.54-6.99)	2.08 (0.54-7.94)	
ETS	No./Total no. (%)	42/961 (4.4)	20/576 (3.5)	14/232 (6.03)	5/65 (7.7)	1/46 (2.2)	2/42 (4.8)	0.2968
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	2.10 (1.00-4.39)	2.23 (0.70-7.10)	0.82 (0.10-6.74)	1.80 (0.34-9.64)	
Contact with dogs	No./Total no. (%)	289/959 (30.1)	176/575 (30.6)	71/232 (30.6)	14/64 (21.9)	17/46 (37.0)	11/42 (26.2)	0.4079
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.15 (0.79-1.68)	0.61 (0.31-1.19)	1.36 (0.65-2.88)	0.88 (0.38-2.01)	
Contact with cats	No./Total no. (%)	419/959 (43.7)	272/575 (47.3)	95/232 (40.9)	20/64 (31.2)	20/46 (43.5)	12/42 (28.6)	0.2816
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.10 (0.76-1.59)	0.55 (0.29-1.05)	0.95 (0.44-2.03)	0.62 (0.26-1.48)	
Dampness at home	No./Total no. (%)	227/958 (23.7)	136/574 (23.7)	65/232 (28.0)	15/64 (23.4)	9/46 (19.6)	2/42 (4.8)	0.0654
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.29 (0.90-1.86)	1.05 (0.56-1.96)	0.78 (0.34-1.78)	0.17 (0.04-0.74)	
Mould at home	No./Total no. (%)	146/958 (15.2)	87/574 (15.2)	43/232 (18.5)	9/64 (14.1)	6/46 (13.0)	1/41 (2.4)	0.2760
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.34 (0.88-2.04)	1.00 (0.47-2.14)	0.87 (0.32-2.36)	0.19 (0.02-1.44)	
Wood/charcoal heating	No./Total no. (%)	607/950 (64.0)	376/571 (65.8)	139/232 (59.9)	38/62 (61.3)	31/45 (68.9)	24/40 (60.0)	0.4722
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.78 (0.54-1.11)	0.72 (0.39-1.34)	1.18 (0.54-2.58)	0.68 (0.30-1.52)	

OR^a: odds ratio adjusted for centre, sex, parental atopy and farming status; values in bold when CI does not include 1. †Values in bold: p<0.05. ETS: Environmental tobacco smoke.

Table S3: Association between LCA trajectories of cough without a cold, contact with other children and infectious exposures in the first year of life

		LCA trajectories of cough without a cold						p-value†
		All (n=961)	Never/infrequent (n=576)	Acute transient (n=232)	Moderate transient (n=65)	Late persistent (n=46)	Early persistent (n=42)	
Contact with other children								
Daycare attendance	No./Total no. (%)	716/928 (77.2)	404/554 (72.9)	194/227 (85.5)	55/64 (85.9)	32/44 (72.7)	31/39 (79.5)	0.0364
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.78 (1.15-2.76)	1.64 (0.76-3.54)	0.86 (0.38-1.94)	0.59 (0.23-1.52)	
Siblings (reference=none)								0.0248
≥ 3	No./Total no. (%)	103/961 (10.7)	77/576 (13.4)	13/232 (5.6)	4/65 (6.1)	4/46 (8.7)	5/42 (11.9)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.34 (0.17-0.66)	0.42 (0.14-1.30)	0.37 (0.01-1.41)	1.09 (0.28-4.25)	
1-2	No./Total no. (%)	509/961 (53.0)	308/576 (53.5)	114/232 (49.1)	36/65 (55.4)	22/46 (47.8)	29/42 (69.0)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.64 (0.45-0.91)	0.82 (0.46-1.47)	0.67 (0.33-1.37)	1.70 (0.69-4.17)	
Infectious exposures								
Otitis	No./Total no. (%)	198/928 (21.3)	103/554 (18.6)	52/227 (22.9)	16/64 (25.0)	10/44 (22.7)	17/39 (43.6)	0.5864
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.05 (0.70-1.58)	1.07 (0.55-2.09)	1.07 (0.46-2.48)	2.01 (0.88-4.54)	
Otitis in the first 4 months	No./Total no. (%)	21/928 (4.4)	9/554 (1.6)	4/227 (1.8)	2/64 (3.1)	1/44 (2.3)	5/39 (12.8)	0.2678
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.95 (0.28-3.25)	1.39 (0.27-7.01)	1.06 (0.12-9.42)	4.34 (1.09-18.07)	
RTI in the first 4 months (without wheeze)	No./Total no. (%)	352/928 (37.9)	210/554 (37.9)	74/227 (32.6)	33/64 (51.6)	15/44 (34.1)	20/39 (51.3)	0.0612
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.79 (0.56-1.11)	1.67 (0.97-2.86)	0.82 (0.41-1.64)	1.61 (0.78-3.30)	
RTI 8 weeks or more (without wheeze)	No./Total no. (%)	223/928 (24.0)	121/554 (21.8)	51/227 (22.5)	21/64 (32.8)	6/44 (13.6)	24/39 (61.5)	0.0006
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.90 (0.61-1.33)	1.55 (0.86-2.77)	0.51 (0.20-1.29)	3.99 (1.88-8.49)	

OR^a: odds ratio adjusted for centre, sex, parental atopy, farming status and asthma; values in bold when CI does not include 1. †Values in bold: p<0.05.

Table S4: Association between LCA trajectories of cough without a cold and food exposures in the first year of life

		All (n=961)	LCA trajectories of cough without a cold					p-value†
			Never/infrequent (n=576)	Acute transient (n=232)	Moderate transient (n=65)	Late persistent (n=46)	Early persistent (n=42)	
Food exposures								
Breastfeeding (reference ≥ 7 months)								0.2452
3 to 6 months	No./Total no. (%)	263/951 (27.7)	157/571 (27.5)	67/228 (29.4)	19/64 (29.7)	8/46 (17.4)	12/42 (28.6)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.23 (0.83-1.80)	1.25 (0.65-2.39)	0.57 (0.23-1.39)	1.06 (0.47-2.40)	
Less than 3 months	No./Total no. (%)	155/951 (16.3)	99/571 (17.3)	30/228 (13.2)	13/64 (20.3)	6/46 (13.0)	7/42 (16.7)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.83 (0.50-1.38)	1.62 (0.76-3.45)	0.94 (0.35-2.51)	1.13 (0.40-3.14)	
None	No./Total no. (%)	91/951 (9.6)	47/571 (8.2)	30/228 (13.2)	5/64 (7.8)	7/46 (15.2)	2/42 (4.8)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	1.88 (1.07-3.32)	1.05 (0.33-3.33)	2.21 (0.76-6.37)	0.68 (0.13-3.56)	
Food diversity at 1 yr								0.2904
≥ 6 major food items	No./Total no. (%)	579/961 (60.2)	356/576 (61.8)	127/232 (54.7)	43/65 (66.1)	29/46 (63.0)	24/42 (57.1)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.73 (0.53-1.00)	1.16 (0.67-2.02)	1.02 (0.53-2.00)	0.78 (0.38-1.57)	
Yoghurt introduction at 1 yr								0.5258
	No./Total no. (%)	755/947 (79.7)	462/569 (81.2)	183/229 (79.9)	52/64 (81.2)	31/45 (68.9)	27/40 (67.5)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.96 (0.63-1.45)	0.97 (0.47-1.97)	1.68 (0.78-3.61)	1.63 (0.72-3.71)	
Cheese diversity at 1yr								0.2970
≥ 2 different types of cheese	No./Total no. (%)	184/923 (19.9)	125/556 (16.9)	37/219 (23.7)	8/63 (12.7)	6/45 (13.3)	8/40 (20.0)	
	OR ^a (95% CI)	NA	1 (reference)	0.71 (0.46-1.10)	0.57 (0.25-1.26)	0.63 (0.23-1.70)	1.24 (0.49-3.10)	

OR^a: odds ratio adjusted for centre, sex, parental atopy and farming status; values in bold when CI does not include 1. †Values in bold: p<0.05.

Discussion

1. Synthèse

Les différentes trajectoires de toux en dehors d'une infection, identifiées au sein de la cohorte PASTURE entre l'âge de 1 à 10 ans, se distinguent par l'âge de début des symptômes, la présence de facteurs déclenchants et le caractère persistant des symptômes. Les trajectoires de toux persistante, qui sont représentées par des enfants ayant une toux en dehors d'une infection récurrente avec une forte prévalence de toux nocturne et de facteurs déclenchants, sont significativement associées aux pathologies respiratoires allergiques et aux allergies alimentaires. Une toux récurrente avec une toux nocturne et la présence de facteurs déclenchants devrait donc conduire à une évaluation allergologique globale, en plus de l'évaluation de l'asthme. Avoir des parents qui travaillent dans une ferme d'élevage de production laitière bovine était associé à une réduction du risque de toux persistante à début précoce ainsi qu'à une réduction du risque de toux aiguë transitoire. Ces résultats suggèrent que l'effet immunomodulateur de l'exposition à la ferme, connu pour diminuer le risque atopique, s'appliquerait également à ces deux trajectoires de toux. Une fois cet effet protecteur de l'environnement fermier mis en évidence, nous avons cherché à évaluer quels éléments spécifiques de l'environnement fermier étaient impliqués.

Les résultats de nos expérimentations animales nous amènent à conclure, qu'en comparaison à une exposition précoce à un environnement exempt d'agent pathogène, nous n'avons pas mis en évidence d'effet bénéfique de l'exposition précoce à la poussière d'une étable de veaux sur la réponse ultérieure à une sensibilisation intrapéritonéale à l'ovalbumine ni sur la sensibilité tussigène ou la réactivité bronchique non spécifique. Ces résultats semblent indiquer que d'autres facteurs de l'environnement fermier sont impliqués dans l'effet protecteur mis en évidence dans la cohorte PASTURE.

Les données de la cohorte PASTURE nous ont permis d'évaluer le rôle de l'environnement précoce, spécifique de la ferme mais aussi celui de l'environnement intérieur, alimentaire et infectieux sur les différentes trajectoires de toux. Le seul élément spécifique à l'environnement fermier retrouvé comme

ayant un effet protecteur significatif sur la toux persistante à début précoce et la toux aigue transitoire est la consommation de lait de ferme bouilli dans la première année de vie. La diminution du risque était de plus de 80 % pour la toux persistante à début précoce et de plus de 40 % pour la toux aigue transitoire. Les infections, telle que l'otite survenant dans les quatre premiers mois de vie et les infections respiratoires hautes non sifflantes répétées ou prolongées durant la première année de vie semblent, quant à elles, être des facteurs de risque de développer une trajectoire de toux persistante à début précoce. Le tabagisme maternel à l'âge de 2 mois n'était pas associé aux trajectoires de toux persistante mais uniquement aux trajectoires de toux transitoires.

2. Discussion

2.1 L'identification des trajectoires de toux : approche méthodologique non supervisée

Nous avons initialement envisagé une approche méthodologique classique avec différents phénotypes cliniques de toux, définis a priori : toux épisodique, toux en dehors d'une infection, toux récurrente, toux fréquente, toux déclenchée par de multiples facteurs. La principale difficulté qui résidait dans ces définitions a priori était que les différents phénotypes n'étaient pas mutuellement exclusifs. Par ailleurs, il ne permettait pas de mettre en évidence l'évolution dans le temps alors que nous disposions de données répétées à 8 visites sur les dix premières années de vie.

Devant ces difficultés, nous nous sommes orientés vers une approche méthodologique non supervisée, qui permet d'identifier des groupes mutuellement exclusifs d'individus en fonction de leurs réponses à un jeu de variables observées. De nombreuses méthodes de clustering ou regroupement non supervisées existent (119,120). Parmi les méthodes utilisées pour mettre en évidence des trajectoires ou phénotypes, on distingue habituellement l'analyse en classes latentes de l'analyse en clusters par estimation des densités ou des moyennes ou par analyse hiérarchique. Bien que ces deux méthodes

aient l'objectif commun de regrouper des individus en classes ou clusters en fonction de leurs caractéristiques cliniques et/ou biologiques, elles ont une approche légèrement différente.

Alors que l'analyse en classes latentes est un modèle de mélange fini, l'analyse en clusters est basée sur un calcul de distance entre des variables. Les modèles de mélange fini sont des modèles statistiques qui assument la présence de groupes non observés, appelés classes latentes, dans une population donnée (98). L'analyse en classes latentes fournit des critères d'adéquation statistiques du modèle plus solides que l'analyse en clusters (121). Des applications spécifiques de modèles de mélange fini, telles que les modèles de trajectoires basées sur les groupes (122) ou les analyses en transition latente (123) permettent d'évaluer les probabilités individuelles de passer d'une classe latente donnée à une autre en fonction de l'évolution de l'indicateur considéré. Ces méthodes sont à privilégier pour l'analyse de l'évolution dans le temps de phénotypes identifiés à T0 (124).

L'analyse en clusters par analyse des densités ou moyennes, quant à elle, partitionne et agrège les données sur une grille, permettant ainsi de visuellement relier certaines variables les unes avec les autres. Cette méthode est donc particulièrement intéressante lorsqu'on souhaite étudier plusieurs pathologies ou symptômes et dégager des phénotypes qui les relient. L'avantage majeur de l'analyse en clusters est qu'elle permet l'évaluation d'un grand nombre de symptômes avec des tailles d'échantillons limitées mais le choix de la solution finale apparaît plus subjectif (121).

Bien que des méthodes de clusters de trajectoires jointes ait été développées pour prendre en compte l'évolution conjointe des trajectoires de différentes variables (32,125), l'analyse en clusters est à privilégier pour dégager des phénotypes à partir de différents types de symptômes (126,127) et l'analyse en classes latentes est à privilégier pour identifier des trajectoires de symptômes au cours du temps (128–130). Cependant, certaines études rapportent l'utilisation de plusieurs méthodes afin de comparer les résultats obtenus (131).

L'analyse en classes latentes est donc apparue plus adaptée à notre objectif d'analyser les différentes évolutions dans le temps de trois symptômes de toux entre l'âge de 1 et 10 ans dans une population de près de 1000 enfants.

Ces analyses non supervisées ne demandent pas d'a priori sur les trajectoires ou phénotypes existants mais certains choix doivent néanmoins être réalisés par l'investigateur : choix des variables à implémenter dans le modèle, choix du nombre de modalités à conserver pour chaque variable puis choix du modèle apparaissant le plus adéquat. Quand un grand nombre de facteurs sont étudiés, une analyse en composante principale ou une analyse factorielle est souvent nécessaire pour évaluer l'association entre les variables et celles qui semblent être les plus pertinentes à intégrer dans le modèle (121).

Dans notre cas, nous avons fait le choix de nous concentrer sur les symptômes de toux, ce qui fait toute l'originalité de notre travail. En effet, la plupart des études qui se sont intéressées aux trajectoires de symptômes respiratoires et allergiques, ont analysé les symptômes dans leur ensemble prenant en compte sensibilisation atopique, asthme, rhinite allergique, dermatite atopique et toux dans l'idée d'identifier des phénotypes de tableaux cliniques allergiques (90,132,133). Dans notre étude, les indicateurs choisis étaient la toux en dehors d'une infection, la toux la nuit en dehors d'une infection et la toux déclenchée par des stimuli habituellement non tussigènes. La durée habituelle des épisodes de toux en dehors d'une infection n'a pas été intégrée dans le modèle parce que les modalités des réponses ne permettaient pas de distinguer une toux chronique d'une toux dite aiguë (10). Par ailleurs, nous n'avons pas intégré le type de toux (grasse ou sèche) dans le modèle pour plusieurs raisons : 1/le type de toux peut varier dans le temps sur un même épisode, 2/ la distinction entre toux grasses et sèche peut être subjective (les réponses possibles étaient « sèche », « grasse », « sèche et grasse ») et 3/ nous avons fait le choix de nous concentrer sur les symptômes de toux les plus objectifs, qui sont ceux habituellement recherchés pour évoquer le diagnostic d'asthme (19).

Enfin, les trois indicateurs utilisés pour le modèle ont été recodés en variables binaires. Ainsi, la fréquence de survenue des épisodes de toux en dehors d'une infection et de toux en dehors d'une infection la nuit sur les derniers mois et le nombre de facteurs déclenchant la toux n'ont pas été considérés. Nous avons fait ce choix pour deux raisons principales : la faible prévalence des modalités extrêmes (au moins 2 épisodes de toux en dehors d'une infection par mois ; 2 ou 3 facteurs déclenchants) et le caractère déclaratif des données sur les 6 à 12 derniers mois. En effet, bien qu'il s'agisse d'une étude prospective, les symptômes de toux étaient recueillis à l'âge de 1 an sur les 10 derniers mois, à l'âge de 18 mois et 24 mois sur les 6 derniers mois puis à partir de l'âge de 3 ans sur les 12 derniers mois. Le mode de recueil aurait donc pu introduire une imprécision dans la mesure de la fréquence des épisodes de toux.

Des analyses de sensibilité pourraient être réalisées pour évaluer l'influence du codage des variables catégorielles à quatre modalités en variables binaires sur l'identification des différentes trajectoires de toux. La réplication de nos analyses en classes latentes dans une autre cohorte de naissance permettrait d'évaluer la reproductibilité de nos résultats.

2.2 Le rôle de l'environnement fermier

La forte prévalence de facteurs déclenchants de la toux et la forte prévalence de pathologie atopique dans la trajectoire de toux persistante à début précoce permet de faire l'hypothèse que les enfants de la cohorte PASTURE ayant une trajectoire de toux persistante à début précoce ont un excès de sensibilité à la toux associé aux pathologies allergiques. A partir de cette hypothèse, nous pouvons faire le lien entre les résultats obtenus avec le modèle animal et les résultats des données d'environnement au sein de la cohorte PASTURE. Dans le modèle animal comme dans la cohorte PASTURE, nous n'avons pas retrouvé d'association significative entre exposition à l'étable et l'excès de sensibilité à la toux. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats : certaines en lien avec la conception des expérimentations animales, d'autres en lien avec le type d'environnement fermier.

a. Le modèle animal : de la conception du projet expérimental à la réalité de terrain

Comme discuté dans l'article sur les expérimentations animales, les modalités de la sensibilisation à l'ovalbumine ont pu jouer un rôle. La voie intrapéritonéale est effectivement très éloignée des voies de sensibilisation de la vie courante car les voies de sensibilisation principales chez l'enfant semblent se faire par voie cutanée ou respiratoire. Nous avons fait le choix de cette voie de sensibilisation car il s'agissait du modèle connu et largement utilisé par l'équipe de recherche de l'université de Lorraine et par les chercheurs utilisant le modèle de lapins d'hyperréactivité bronchique d'origine allergique. Même si, depuis quelques années, la sensibilisation aux acariens par voie intranasale est le mode de sensibilisation le plus souvent utilisé dans les modèles d'hyperréactivité bronchique utilisant les rongeurs, elle n'est pas utilisée chez le lapin pour des raisons économiques. Le coût des extraits allergéniques d'acariens étant très élevé, cela complique grandement son utilisation chez des animaux de plus grande taille. En effet, alors que chez la souris et le cochon d'Inde, plusieurs instillations nasales de respectivement 25 et 100µL d'extraits allergéniques d'acariens sont nécessaires pour induire une réactivité bronchique, une quantité d'au moins 300µL serait nécessaire chez le lapin au vu de sa taille. Par ailleurs, lors de la conception des expérimentations, nous avons choisi de réaliser la sensibilisation à l'ovalbumine à l'animalerie, à distance des expositions spécifiques. Le but était d'évaluer l'impact de l'exposition à l'environnement fermier sur la réponse à une sensibilisation ultérieure, permettant ainsi de répondre à la question du rôle de l'environnement périnatal sur le développement ultérieur de l'atopie. L'absence de différence de réponse à la sensibilisation entre le groupe « fermier » et le groupe contrôle soulève la question du maintien de l'exposition à l'environnement fermier tout au long de la vie pour permettre une protection contre l'atopie. La nécessité d'un continuum d'exposition est suggérée par certaines études (134).

Bien que le modèle animal ait le grand avantage de permettre d'évaluer le rôle d'une seule exposition en contrôlant toutes les autres expositions, il comporte aussi de nombreuses contraintes et aléas. L'expérimentation finale pour un lapin prenait une demi-journée. Les expérimentations finales pour un même groupe de lapins se sont donc étalées sur trois semaines, ce qui a entraîné des différences

d'âges, considérables pour un animal comme le lapin, au sein de chaque groupe. Pour la comparaison entre les groupes, les soins et l'alimentation apportés aux lapins étaient similaires dans les trois groupes. Cependant, pour le groupe « ferme traditionnelle », nous avons été contraints de réaliser les expérimentations finales à un âge plus précoce afin de finir les expérimentations avant la fermeture estivale de l'animalerie de l'université de Lorraine. Pour le groupe « ferme moderne », nous avons fait face à une mortalité néonatale très importante, inattendue. Seuls trois lapereaux avaient survécu au troisième jour de vie et un des trois lapereaux est décédé quelques semaines plus tard, nous n'avons donc pas pu obtenir de donnée issue de ce groupe. Cette mortalité élevée pourrait s'expliquer par : 1/ une température trop froide pour les lapereaux du fait du bâtiment aéré à la fin du mois de février 2021 (nous avons pris soin d'installer des tapis chauffant formant une voûte au-dessus du nid), 2/ la présence d'oiseaux et de rongeurs dans la stabulation, potentiellement perçus comme des prédateurs par les lapines mères qui ont pu avoir un comportement défensif et ne pas nourrir les lapereaux, 3/ une infection. Cette hypothèse infectieuse semble la plus probable étant donné la mortalité constatée dans toutes les portées de lapereaux. Elle reflète aussi la difficulté d'équilibrer la balance entre exposition microbiologique immunomodulatrice permettant une stimulation immunitaire et exposition microbiologique à risque infectieux sévère ou à risque de provoquer une inflammation. Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études se sont intéressées à différencier les effets bénéfiques d'un environnement microbien naturel de ceux potentiellement délétères des infections sévères, permettant de préciser que l'hygiène doit être ciblée (135–137). La dénomination « hypothèse de l'hygiène » peut effectivement porter à confusion, semblant faire penser qu'il faudrait rompre avec l'hygiène, à laquelle nous devons une diminution drastique des infections sévères et de la mortalité infantile. C'est une des raisons qui a amené à la renommer « hypothèse du microbiote », mettant ainsi en avant l'importance du développement précoce du microbiote de l'hôte, qui est loin d'être lié aux infections dans l'enfance mais plutôt à l'exposition à une grande diversité microbienne, via la mère, l'alimentation, l'environnement naturel (70).

Dans une étude récente, l'exposition quotidienne de souris à des extraits de poussières de maison rurale pendant les 7 jours précédant une sensibilisation intranasale à l'ovalbumine diminuait significativement l'inflammation bronchique (taux d'éosinophiles) induite par l'ovalbumine et les taux d'IgE spécifiques à l'ovalbumine (138). Le transfert du microbiote digestif des souris exposées aux extraits de poussières de maison rurale aux souris non préalablement exposées permettait également une réduction de l'inflammation bronchique. Nous aurions souhaité évaluer l'impact de l'environnement fermier sur le microbiote intestinal, le microbiote pulmonaire ainsi que sur le profil immunologique des deux groupes de lapin ; la destruction accidentelle de tous les échantillons biologiques prélevés durant les expérimentations finales ne nous le permettra pas.

b. Le type d'environnement fermier

A chaque ferme, chaque bâtiment et chaque saison, son environnement microbiologique ?

Comme présenté dans l'introduction, l'étude des populations amish et huttérites a permis de mettre en évidence que le mode d'agriculture joue un rôle majeur dans la richesse microbienne de l'environnement fermier et donc de son rôle protecteur envers les allergies. Les taux d'endotoxines dans la poussière des maisons de population amish, qui ont un mode d'agriculture traditionnel, était significativement plus élevés que ceux de la poussière des maisons de population huttérites (79). Bien que nous ayons modélisé l'environnement fermier moderne par la stabulation et l'environnement fermier traditionnel par l'étable des veaux, ces deux environnements fermiers font partie d'une seule et même ferme : la ferme d'expérimentation de La Bouzule. Au sein de cette exploitation visant un mode d'agriculture durable fondée sur le respect de la biodiversité, les taux d'endotoxines retrouvés dans l'étable des veaux étaient très variables sur les trois prélèvements réalisés et plutôt comparables à ceux des fermes modernes (139,140) qu'à ceux de fermes plus anciennes (141). Par ailleurs, l'épidémie Covid-19 nous ayant amené à repousser le début des expérimentations, les deux groupes exposés à l'environnement fermier n'ont pas pu y être exposés à la même saison. Initialement, le protocole avait été conçu pour que les lapins soient exposés à la ferme sur la période hivernale,

période pendant laquelle les bovins sont constamment à l'intérieur des étables. Plusieurs éléments en lien avec la présence permanente du bétail à l'intérieur des étables (et non uniquement durant les périodes de traite) pourraient avoir un impact sur la composition de la poussière de ferme et sa richesse en endotoxines et en bêta-lactoglobuline (142,143). En effet, en période hivernale, la nourriture du bétail est déposée dans l'étable matin et soir puisque les bovins ne vont pas en pâture, une litière est déposée dans l'étable et changée régulièrement et les urines et selles des bovins sont toutes émises dans l'étable. L'analyse microbiologique à venir des deux environnements fermiers devrait nous permettre de mieux définir l'environnement microbien auquel les lapines gestantes et les lapereaux ont été réellement exposés.

Cependant, même dans l'étude PASTURE, l'exposition à la grange ou à l'étable durant la première année de vie n'était pas significativement associée aux différentes trajectoires de toux. Ici, nous n'avons pas pris en compte la fréquence d'exposition, ni l'âge de l'enfant à la première exposition, ni le nombre d'espèces animales auxquels l'enfant était exposé, ni le type d'exposition (pendant l'alimentation du bétail ou la mise en litière). Le nombre de semaines pendant lesquelles l'enfant avait été exposé à l'étable ou à la grange était très variable ainsi que l'âge de la première exposition et certaines études ont montré un effet protecteur de l'environnement fermier sur le risque ultérieur de sibilants modulé par la durée d'exposition hebdomadaire (93). Du fait du nombre de trajectoires de toux et du faible effectif de certaines trajectoires, il n'a pas été possible d'évaluer l'association de ces trajectoires avec plusieurs classes d'exposition à l'étable ou à la grange, fonction de la fréquence d'exposition et de l'âge de début.

Par ailleurs, les trajectoires de toux étant basées sur les symptômes présentés à partir de l'âge de 1 an, il nous est apparu opportun de nous concentrer sur les déterminants précoces (pendant la grossesse et la première année de vie) des différentes trajectoires de toux mais nous ne pouvons pas exclure qu'une exposition continue à la grange et/ou l'étable est nécessaire pour observer une diminution du risque d'évolution vers une récurrence ou une persistance d'une toux ayant débuté précocement.

L'exploration de l'environnement fermier dans la cohorte PASTURE suggère que seule la consommation de lait de ferme serait associée à une diminution du risque de développer une toux persistante à début précoce, même après ajustement sur l'asthme. Dans le cadre de l'étude des facteurs protecteurs des pathologies atopiques, la consommation de lait de ferme non transformé est un des facteurs le plus souvent retrouvé (144–146). Une méta-analyse récente reprenant la plupart de ces études confirme l'effet protecteur de la consommation de lait de ferme sur la rhinite allergique, l'asthme, la sensibilisation atopique et les sibilants en précisant que cet effet semble être indépendant des autres expositions spécifiques à la ferme (147). Les risques infectieux rares mais sévères liés à la consommation de lait cru de ferme ne permettant pas de proposer cette consommation comme intervention de prévention, le développement de méthodes de transformation minimale du lait de ferme est apparu nécessaire. L'étude Milk Against Respiratory Tract Infections and Asthma (MARTHA), mise en place en Allemagne depuis quelques années, a pour but d'évaluer l'effet protecteur de la consommation d'un lait de ferme, microbiologiquement sûr, transformé de façon minimale, chez des enfants âgés de 6 mois à 3 ans sur le risque d'asthme à l'âge de 5 ans (148).

Les résultats des expérimentations animales et les résultats obtenus à partir des données de la cohorte PASTURE suggèrent donc que l'exposition à la poussière de ferme seule ne serait pas associée aux trajectoires de toux. L'effet protecteur de l'environnement fermier pour la toux transitoire aigüe et pour la toux persistante à début précoce semble être médié par la consommation de lait de ferme. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'effet protecteur de l'environnement fermier soit lié à l'exposition à plusieurs facteurs spécifiques de l'environnement fermier.

Par ailleurs, la technique d'analyse en classes latentes avec une covariable permet de savoir si cette variable peut prédire l'appartenance à une classe latente. Nous pourrions envisager de réaliser une analyse en classes latentes avec comme covariable l'environnement fermier ou une variable d'intérêt de l'environnement fermier pour y confronter les résultats obtenus en régression logistique multinomiale (98).

2.3 Le rôle de l'environnement non fermier

Bien que nos travaux se soient focalisés sur le rôle de l'environnement fermier, en tant que modèle d'un environnement microbien riche et diversifié, la cohorte PASTURE nous a permis d'explorer un certain nombre de facteurs non spécifiques à la ferme. Certains facteurs alimentaires connus pour favoriser une diversité d'exposition microbiologique, certains facteurs potentiellement irritants, supposés comme étant associés à un sur risque de toux et d'autres en lien avec les infections précoces ou encore avec les contacts précoces avec d'autres enfants.

Un grand nombre d'études ont mis en avant une association forte entre alimentation et microbiote intestinal (149). Ainsi, une alimentation diversifiée (76,150), la consommation de yaourt (151) et d'aliments de la ferme (lait et œuf de la ferme) (152) seraient associées au développement d'un microbiote riche et diversifié. En dehors de la consommation de lait de ferme, aucun des facteurs alimentaires étudiés n'étaient associés aux trajectoires de toux en dehors d'une infection. Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que l'alimentation joue essentiellement un rôle sur le microbiote intestinal et moins sur le microbiote respiratoire. Cependant, plusieurs études ont rapporté une association entre une faible diversité du microbiote intestinal dans la petite enfance et le risque ultérieur de sibilants et d'asthme (153,154). Quelques études suggèrent d'ailleurs l'existence d'un axe intestin-poumon, en décrivant d'une part, l'existence d'une continuité microbiologique de l'appareil aérodigestif et d'autre part, l'influence indirecte de l'état immunologique pulmonaire par les éléments produits par le microbiote intestinal (155–157). Une communication entre microbiote intestinal et cerveau est aussi suggérée par un certain nombre d'études (158,159). L'absence d'association entre les facteurs alimentaires connus pour influencer le microbiote intestinal et les différentes trajectoires de toux ne permettent donc pas d'étayer l'hypothèse d'un lien entre dysbiose aérodigestive et toux (160). Cependant, il faut souligner que nous n'avons pas étudié la composition du microbiote intestinal dans notre étude mais uniquement les facteurs alimentaires connus pour y être liés. De nombreux facteurs interviennent dans la richesse et la diversité du microbiote intestinal. Notamment, l'entretien de la richesse d'un microbiote intestinal diversifié passerait par une alimentation riche en fibres (161)

et par une épargne antibiotique (162). Enfin, pour des raisons de limites statistiques, les scores de diversité alimentaire et de diversité de fromage ont été groupés, ce qui a pu impacter les résultats.

Concernant les irritants, seul le tabagisme maternel à l'âge de 2 mois, que les cigarettes soient fumées en intérieur ou en extérieur, était significativement associé aux trajectoires transitoires de toux et non aux trajectoires persistantes. Ces résultats persistaient après ajustement sur l'asthme. Chez l'adulte, le tabagisme actif est décrit comme initialement irritant mais laisse ensuite place à une diminution de la réactivité tussigène (10,163). Le tabagisme passif chronique pourrait induire les mêmes effets, expliquant ainsi l'association positive entre tabagisme maternel et trajectoires transitoires de toux. Alors que les cohortes PARIS, PELAGIE et de Tucson ne retrouvaient pas d'association entre tabagisme passif et toux (90,164,165), une revue systématique des effets du tabagisme passif sur la toux chronique de l'enfant datant de 1997 rapportait une augmentation du risque de toux chronique chez l'enfant en cas de tabagisme maternel (86) et les données de l'étude ISAAC ont également confirmé ces résultats (166,167). Par ailleurs, bien que les résultats ne soient significatifs que pour les trajectoires transitoires dans notre étude, on note tout de même une tendance à un sur risque de trajectoires persistantes en cas de tabagisme maternel par rapport à la trajectoire de référence.

Alors que la garde en collectivité et le fait d'avoir une fratrie n'était associée qu'avec la trajectoire de toux aigue transitoire, les infections respiratoires prolongées ou répétées durant la première année de vie semblent être associées à une augmentation du risque de développer une toux persistante à début précoce. Ces résultats, qui persistent après ajustement sur l'asthme, sont en ligne avec la discussion décrite plus haut sur la nécessité de différencier les effets bénéfiques d'un environnement microbien naturel de ceux potentiellement délétères des infections sévères. De plus, ces résultats corroborent l'hypothèse que les infections sévères de la petite enfance ne diminuent pas voire augmentent le risque de développer des pathologies atopiques. De nombreuses études ont mis en évidence un sur risque de développer asthme et sibilants en cas de bronchiolite à VRS précoce (168–170). Les infections respiratoires précoces, qu'elles soient sifflantes ou non, et quel que soit l'agent causal, semblent

également être associées à un risque ultérieur d'asthme (171). Ces infections respiratoires précoces qui surviennent à une période où les systèmes immunitaire et respiratoire sont encore en plein développement (172), pourraient entraîner une inflammation des voies aériennes (173) ainsi qu'une toux par excès de sensibilité plus ou moins prolongée, qui dépend de l'agent causal (174) mais aussi de la susceptibilité à la toux (175). Il reste cependant difficile de déterminer si la relation entre ces infections respiratoires précoces et le risque d'asthme ou de toux persistante est de nature causale ou si il existe une corrélation du fait de prédispositions communes (176). En effet, une étude réalisée à partir des données de la cohorte PASTURE avait mis en évidence un effet protecteur d'une production élevée de cytokines dans le sang de cordon sur la survenue d'otites moyennes aiguës(177). Or la production de cytokines dans le sang de cordon est modulée par l'exposition à l'environnement fermier durant la grossesse (178). Ainsi, l'orientation du système immunitaire vers un profil cytokinique de type Th1, via l'exposition à l'environnement fermier, protégerait à la fois des infections sévères de la petite enfance et de la toux persistante à début précoce.

Enfin, la pollution atmosphérique n'a pas été analysée dans la cohorte PASTURE mais des échantillons de poussières dans les maisons des participants ont été recueillis à plusieurs visites. L'analyse de ces échantillons de poussière pourrait nous renseigner sur l'association potentielle entre exposition microbiologique précoce et trajectoires de toux.

3. Poursuite des travaux et perspectives

Poursuite des investigations sur l'environnement microbiologique

L'analyse microbiologique des deux environnements fermiers auxquels les groupes de lapin ont été exposés a été réalisée fin 2022 et est en cours d'interprétation. La comparaison des échantillons des deux fermes et la comparaison de ces échantillons avec ceux de fermes de la cohorte PASTURE devraient nous permettre de mieux décrire l'environnement microbien auquel les lapines gestantes et

les lapereaux ont été exposés. Nous pourrions ainsi étayer les hypothèses pour lesquelles nous n'avons pas retrouvé d'effet protecteur de l'environnement fermier sur la sensibilité tussigène et l'hyperréactivité bronchique d'origine allergique dans le cadre de nos expérimentations animales.

Par ailleurs, à la présentation des résultats des travaux sur l'association entre environnement précoce et trajectoires de toux, l'équipe finlandaise du consortium PASTURE a suggéré d'analyser les échantillons de poussières prélevés dans les maisons à l'âge de 2 mois. L'analyse de ces échantillons de poussières et de l'association entre leur composition et les différentes trajectoires de toux sera discutée lors de la prochaine réunion annuelle du groupe d'étude PASTURE.

Poursuite des analyses sur l'association entre l'environnement fermier et les trajectoires de toux

Les analyses stratifiées sur l'asthme et les analyses sur des modalités plus précises de l'environnement fermier (fréquence de l'exposition à la grange, quantité de lait de ferme consommée...) n'ont pas pu être réalisées en régression logistique multinomiale du fait du nombre conséquent de trajectoires de toux. Le regroupement des deux trajectoires persistantes (à début précoce et tardif) versus les trois autres trajectoires de toux (peu ou pas de symptômes, transitoire aigue et modérée) pourrait permettre la réalisation de certaines de ces analyses de sensibilité pour poursuivre l'exploration des facteurs protecteurs d'une évolution persistante de la toux.

La toux en dehors d'une infection comme un des multiples éléments de la santé respiratoire

Une visite clinique des enfants de l'étude PASTURE, vers l'âge de 16-17 ans a été réalisée entre 2019 et 2021 en Allemagne, Suisse, Finlande et France. Nous prévoyons d'étendre l'analyse des symptômes de toux en dehors d'une infection jusqu'à l'âge de 16-17 ans. Les symptômes de toux seront cette fois pris en compte avec les autres indicateurs de santé respiratoire (rhinite, asthme, sensibilisation atopique) pour identifier des trajectoires de santé respiratoire au cours de l'enfance avec l'étude

« Trajectoires de Santé Respiratoire au sein de la cohorte PASTURE » (TSaR PASTURE). Cette étude nous permettra d'analyser l'évolution de la santé respiratoire dans sa globalité, de la toute petite enfance à la fin de l'adolescence. L'identification des différentes trajectoires de santé respiratoire devrait nous permettre d'identifier les enfants à risque d'avoir des symptômes respiratoires et allergiques persistants à l'âge adulte, le but étant, à terme, de cibler les mesures de prévention. Comme dans le présent travail, nous reproduirons les analyses du lien entre environnement fermier précoce et les différentes trajectoires de santé respiratoire. Par ailleurs, nous souhaitons évaluer l'effet d'un continuum d'exposition continue durant l'enfance par rapport à une exposition uniquement précoce. L'association entre les trajectoires persistantes de santé respiratoire et la temporalité de l'exposition à l'environnement fermier (seulement précoce, continue, seulement tardive, aucune) (134) pourrait être analysée à l'aide de modèle conjoints (179).

Lors de cette dernière visite clinique de l'étude PASTURE, nous avons recueilli des échantillons microbiologiques des voies aériennes supérieures. Le microbiote des voies aériennes est connu pour être impliqué dans la pathogenèse de l'asthme avec une association significative entre une faible diversité du microbiote nasal et l'asthme. Notre hypothèse est que l'abondance et la diversité du microbiote des voies aériennes (nez, gorge) seraient également associées à l'absence de symptômes respiratoires à l'âge de 16-17 ans.

Enfin, le niveau d'activité physique et la qualité du sommeil ont été évalués par le port d'un actimètre pendant les 14 jours suivants la visite clinique et une évaluation du vécu de la santé respiratoire a été réalisée dans un sous-échantillon de la population française par la réalisation d'entretiens sociologiques semi-dirigés. Toutes ces données nous permettront donc d'évaluer les liens des différentes trajectoires de santé respiratoire avec l'activité physique et le sommeil ainsi que d'analyser les liens avec le vécu de cette santé respiratoire par les adolescents eux-mêmes.

L'approche de la santé respiratoire dans sa globalité de la naissance à l'âge adulte tout en prenant en compte le vécu et le retentissement sur le quotidien fait de ces perspectives un projet innovant qui

devrait permettre d'adapter les actions de prévention en plaçant le patient au cœur de la démarche. Plusieurs bourses ont été obtenues par le Dr Amandine Divaret-Chauveau pour réaliser ce projet (Fondation du Souffle, Don du Souffle et ARAIRLOR).

Perspectives générales

Enfin, les résultats de nos travaux doivent conduire à explorer les symptômes de toux en dehors d'une infection lors des études observationnelles et interventionnelles visant à évaluer les facteurs de risque et de protection des pathologies atopiques. Ainsi, dans des études interventionnelles comme l'étude MARTHA (148), il serait intéressant d'évaluer les symptômes de toux à l'âge de 5 ans, indépendamment du diagnostic d'asthme pour évaluer l'impact de la consommation du lait minimalement transformé sur le risque de toux par excès de sensibilité.

4. Conclusion

L'identification des différentes trajectoires de toux en dehors d'une infection au sein de la cohorte PASTURE entre l'âge de 1 à 10 ans ont permis de mettre en évidence des éléments discriminants tels que l'âge de début des symptômes, la présence de facteurs déclenchants et le caractère persistant des symptômes. La forte association des trajectoires de toux persistantes avec les pathologies atopiques respiratoires et les allergies alimentaires doit nous amener à orienter les enfants présentant une toux persistante ou récurrente vers un médecin allergologue pour qu'une évaluation allergologique complète soit réalisée.

L'effet protecteur de l'environnement fermier sur la trajectoire de toux persistante à début précoce, y compris après ajustement sur l'asthme, vient renforcer l'hypothèse selon laquelle une des étiologies de la toux par excès de sensibilité serait l'inflammation de type Th2. L'exposition périnatale à l'environnement d'une ferme de production laitière bovine chez le lapin n'a pas permis de confirmer cet effet. Les données de la cohorte PASTURE suggèrent que l'effet protecteur de l'environnement fermier serait essentiellement médié par la consommation de lait de ferme durant la première année de vie. L'évaluation des symptômes de toux dans une étude interventionnelle telle que l'étude MARTHA permettrait de confirmer cet effet.

A l'inverse d'une exposition précoce à un environnement microbiologique riche et diversifié tel que l'environnement fermier, les infections respiratoires répétées ou prolongées durant la première année de vie semblent être significativement associées à une augmentation du risque de développer une toux persistante à début précoce.

Tous ces résultats suggèrent un lien étroit entre toux persistante et pathologies atopiques. Les études de prévention des pathologies atopiques devraient également s'intéresser aux symptômes de toux en dehors d'une infection afin d'évaluer la possibilité de stratégies de prévention communes.

Bibliographie

Références bibliographiques

1. Bergmann M, Haasenritter J, Beidatsch D, Schwarm S, Hörner K, Bösner S, et al. Prevalence, aetiologies and prognosis of the symptom cough in primary care: a systematic review and meta-analysis. *BMC Fam Pract*. 2021 Jul;22(1):151.
2. Prenner B, Topp R, Belyukova S, Fox C. Referrals, etiology, prevalence, symptoms, and treatments of chronic cough: A survey of allergy specialists. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2022 Aug;S1081-1206(22)01673-8.
3. Meltzer EO, Zeiger RS, Dicpinigaitis P, Bernstein JA, Oppenheimer JJ, Way NA, et al. Prevalence and Burden of Chronic Cough in the United States. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021 Nov;9(11):4037-4044.e2.
4. Altman KW, Young AJ, Gupta M, Pichardo PFA, Troup MA, Blank J. Incidence and Prevalence of Cough in a Rural Health System: A 20-Year Study. *Laryngoscope*. 2022 Aug; epub.
5. Pedersen ESL, de Jong CCM, Ardura-Garcia C, Barben J, Casaulta C, Frey U, et al. The Swiss Paediatric Airway Cohort (SPAC). *ERJ Open Res*. 2018 Oct;4(4).
6. Kogan MD, Pappas G, Yu SM, Kotelchuck M. Over-the-counter medication use among US preschool-age children. *JAMA*. 1994 Oct 5;272(13):1025–30.
7. Jurca M, Ramette A, Dogaru CM, Goutaki M, Spycher BD, Latzin P, et al. Prevalence of cough throughout childhood: A cohort study. *PLoS ONE*. 2017 May;12(5):e0177485.
8. Morice AH, Fontana GA, Belvisi MG, Birring SS, Chung KF, Dicpinigaitis PV, et al. ERS guidelines on the assessment of cough. *Eur Respir J*. 2007 Jun;29(6):1256–76.
9. Chang AB, Glomb WB. Guidelines for evaluating chronic cough in pediatrics: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2006 Jan;129(1 Suppl):260S-283S.
10. Morice AH, Millqvist E, Bieksiene K, Birring SS, Dicpinigaitis P, Domingo Ribas C, et al. ERS guidelines on the diagnosis and treatment of chronic cough in adults and children. *Eur Respir J*. 2020 Jan;55(1).
11. Chang AB. Pediatric cough: children are not miniature adults. *Lung*. 2010 Jan;188 Suppl 1:S33-40.
12. Song WJ, Chang YS, Faruqi S, Kim JY, Kang MG, Kim S, et al. The global epidemiology of chronic cough in adults: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2015 May;45(5):1479–81.
13. Singh D, Arora V, Sobti PC. Chronic/recurrent cough in rural children in Ludhiana, Punjab. *Indian Pediatr*. 2002 Jan;39(1):23–9.
14. Leonardi GS, Houthuijs D, Nikiforov B, Volf J, Rudnai P, Zejda J, et al. Respiratory symptoms, bronchitis and asthma in children of Central and Eastern Europe. *Eur Respir J*. 2002 Oct;20(4):890–8.
15. Liang H, Ye W, Wang Z, Liang J, Yi F, Jiang M, et al. Prevalence of chronic cough in China: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm Med*. 2022 Feb 12;22(1):62.

16. Pan G, Zhang S, Feng Y, Takahashi K, Kagawa J, Yu L, et al. Air pollution and children's respiratory symptoms in six cities of Northern China. *Respir Med*. 2010 Dec;104(12):1903–11.
17. Morice AH, McGarvey L, Pavord I, British Thoracic Society Cough Guideline Group. Recommendations for the management of cough in adults. *Thorax*. 2006 Sep;61 Suppl 1(Suppl 1):i1-24.
18. Chang AB, Oppenheimer JJ, Irwin RS, CHEST Expert Cough Panel. Managing Chronic Cough as a Symptom in Children and Management Algorithms: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*. 2020 Jul;158(1):303–29.
19. Reddel HK, Bacharier LB, Bateman ED, Brightling CE, Brusselle GG, Buhl R, et al. Global Initiative for Asthma Strategy 2021: Executive Summary and Rationale for Key Changes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022 Jan 1;205(1):17–35.
20. Dodge R, Martinez FD, Cline MG, Lebowitz MD, Burrows B. Early childhood respiratory symptoms and the subsequent diagnosis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Jul;98(1):48–54.
21. Rancière F, Clarisse B, Nikasinovic L, Just J, Momas I. Cough and dyspnoea may discriminate allergic and infectious respiratory phenotypes in infancy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 Jun;23(4):367–75.
22. Chauveau A, Dalphin ML, Mauny F, Kaulek V, Schmausser-Hechfellner E, Renz H, et al. Skin prick tests and specific IgE in 10-year-old children: Agreement and association with allergic diseases. *Allergy*. 2017 Sep;72(9):1365–73.
23. Tamazouzt S, Adel-Patient K, Deschildre A, Roduit C, Charles MA, de Lauzon-Guillain B, et al. Prevalence of Food Allergy in France up to 5.5 Years of Age: Results from the ELFE Cohort. *Nutrients*. 2022 Sep 2;14(17):3624.
24. Owora AH, Becker AB, Chan-Yeung M, Chan ES, Chooniedass R, Ramsey C, et al. Wheeze trajectories are modifiable through early-life intervention and predict asthma in adolescence. *Pediatr Allergy Immunol*. 2018 Sep;29(6):612–21.
25. Tang HH, Teo SM, Belgrave DC, Evans MD, Jackson DJ, Brozynska M, et al. Trajectories of childhood immune development and respiratory health relevant to asthma and allergy. *Elife*. 2018 Oct;7:e35856.
26. Bacharier LB, Beigelman A, Calatroni A, Jackson DJ, Gergen PJ, O'Connor GT, et al. Longitudinal Phenotypes of Respiratory Health in a High-Risk Urban Birth Cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Jan;199(1):71–82.
27. Fuchs O, Bahmer T, Weckmann M, Dittrich AM, Schaub B, Rösler B, et al. The all age asthma cohort (ALLIANCE) - from early beginnings to chronic disease: a longitudinal cohort study. *BMC Pulm Med*. 2018 Aug;18(1):140.
28. Bougas N, Just J, Beydon N, De Blic J, Gabet S, Lezmi G, et al. Unsupervised trajectories of respiratory/allergic symptoms throughout childhood in the PARIS cohort. *Pediatr Allergy Immunol*. 2019 May;30(3):315-324.
29. Spycher BD, Silverman M, Brooke AM, Minder CE, Kuehni CE. Distinguishing phenotypes of childhood wheeze and cough using latent class analysis. *Eur Respir J*. 2008 May 1;31(5):974–81.

30. Rancière F, Nikasinovic L, Bousquet J, Momas I. Onset and persistence of respiratory/allergic symptoms in preschoolers: new insights from the PARIS birth cohort. *Allergy*. 2013 Sep;68(9):1158–67.
31. Spycher BD, Silverman M, Pescatore AM, Beardsmore CS, Kuehni CE. Comparison of phenotypes of childhood wheeze and cough in 2 independent cohorts. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Nov;132(5):1058–67.
32. Rancière F, Nikasinovic L, Momas I. Dry night cough as a marker of allergy in preschool children: the PARIS birth cohort. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013 Mar;24(2):131–7.
33. Tomori JK Z. Cough and Other Respiratory Reflexes. Karger Book 1979.
34. Canning BJ. Encoding of the cough reflex. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007;20(4):396–401.
35. Bonham AC, Sekizawa S ichi, Chen CY, Joad JP. Plasticity of brainstem mechanisms of cough. *Respir Physiol Neurobiol*. 2006 Jul;152(3):312–9.
36. Ohi Y, Yamazaki H, Takeda R, Haji A. Functional and morphological organization of the nucleus tractus solitarius in the fictive cough reflex of guinea pigs. *Neurosci Res*. 2005 Oct;53(2):201–9.
37. Jakus J, Poliacek I, Halasova E, Murin P, Knocikova J, Tomori Z, et al. Brainstem circuitry of tracheal-bronchial cough: c-fos study in anesthetized cats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008 Feb 29;160(3):289–300.
38. Canning BJ, Mori N. An essential component to brainstem cough gating identified in anesthetized guinea pigs. *FASEB J*. 2010 Oct;24(10):3916–26.
39. Mazzone SB, Cole LJ, Ando A, Egan GF, Farrell MJ. Investigation of the neural control of cough and cough suppression in humans using functional brain imaging. *J Neurosci*. 2011 Feb 23;31(8):2948–58.
40. Hilton E, Marsden P, Thurston A, Kennedy S, Decalmer S, Smith JA. Clinical features of the urge-to-cough in patients with chronic cough. *Respir Med*. 2015 Jun;109(6):701–7.
41. Davenport PW. Clinical cough I: the urge-to-cough: a respiratory sensation. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(187):263–76.
42. McGovern AE, Short KR, Kywe Moe AA, Mazzone SB. Translational review: Neuroimmune mechanisms in cough and emerging therapeutic targets. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Nov;142(5):1392–402.
43. Chang AB, Widdicombe JG. Cough throughout life: children, adults and the senile. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007;20(4):371–82.
44. Thach BT. Maturation of cough and other reflexes that protect the fetal and neonatal airway. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007;20(4):365–70.
45. Perkett EA, Vaughan RL. Evidence for a laryngeal chemoreflex in some human preterm infants. *Acta Paediatr Scand*. 1982 Nov;71(6):969–72.
46. Pickens DL, Schefft G, Thach BT. Prolonged apnea associated with upper airway protective reflexes in apnea of prematurity. *Am Rev Respir Dis*. 1988 Jan;137(1):113–8.

47. Schaad UB, Rossi E. Infantile chlamydial pneumonia--a review based on 115 cases. *Eur J Pediatr.* 1982 Mar;138(2):105-9.
48. Singh I, Gathwala G, Yadav SP, Sharma A. Foreign body airway in neonates. *Indian J Pediatr.* 1999 Mar-Apr;66(2):288-9.
49. Stiles J. Neural plasticity and cognitive development. *Dev Neuropsychol.* 2000;18(2):237-72.
50. Chang AB, Phelan PD, Sawyer SM, Del Brocco S, Robertson CF. Cough sensitivity in children with asthma, recurrent cough, and cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 1997 Oct;77(4):331-4.
51. Ladics GS, Chapin RE, Hastings KL, Holsapple MP, Makris SL, Sheets LP, et al. Developmental toxicology evaluations--issues with including neurotoxicology and immunotoxicology assessments in reproductive toxicology studies. *Toxicol Sci.* 2005 Nov;88(1):24-9.
52. Demoulin-Alexikova S, Plevkova J, Mazurova L, Zatkan T, Alexik M, Hanacek J, et al. Impact of Air Pollution on Age and Gender Related Increase in Cough Reflex Sensitivity of Healthy Children in Slovakia. *Front Physiol.* 2016 Feb;7:54.
53. Simeoni U. Le développement et les 1000 premiers jours : une opportunité de prévention précoce en santé. *Spirale.* 2019;92(4):42-4.
54. Udem BJ, Carr MJ, Kollarik M. Physiology and plasticity of putative cough fibres in the Guinea pig. *Pulm Pharmacol Ther.* 2002;15(3):193-8.
55. Mazzone SB, Canning BJ. Plasticity of the cough reflex. *Eur Respir Rev.* 2002 Dec;12(85):236-42.
56. McGarvey L, McKeagney P, Polley L, MacMahon J, Costello RW. Are there clinical features of a sensitized cough reflex? *Pulm Pharmacol Ther.* 2009 Apr;22(2):59-64.
57. O'Connell F, Thomas VE, Studham JM, Pride NB, Fuller RW. Capsaicin cough sensitivity increases during upper respiratory infection. *Respir Med.* 1996 May;90(5):279-86.
58. Curley FJ, Irwin RS, Pratter MR, Stivers DH, Doern GV, Vernaglia PA, et al. Cough and the common cold. *Am Rev Respir Dis.* 1988 Aug;138(2):305-11.
59. Dicipinigaitis PV, Bhat R, Rhoton WA, Tibb AS, Negassa A. Effect of viral upper respiratory tract infection on the urge-to-cough sensation. *Respir Med.* 2011 Apr;105(4):615-8.
60. Morice AH. The cough hypersensitivity syndrome: a novel paradigm for understanding cough. *Lung.* 2010 Jan;188 Suppl 1:S87-90.
61. Guilleminault L, Chazelas P, Melloni B, Magdelaine C, Villeneuve T, Brouquières D, et al. Repeat Expansions of RFC1 in Refractory Chronic Cough: A Missing Piece of the Puzzle? *Chest.* 2022 Nov 17;S0012-3692(22)04162-9.
62. Morice AH, Millqvist E, Belvisi MG, Bieksiene K, Birring SS, Chung KF, et al. Expert opinion on the cough hypersensitivity syndrome in respiratory medicine. *Eur Respir J.* 2014 Nov;44(5):1132-48.
63. Taillé C, Guilleminault L. [The great challenge of global asthma care]. *Rev Mal Respir.* 2021 Jan;38(1):1-2.

64. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Sep;118(3):551–9; quiz 560–1.
65. Cockcroft DW. Direct challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. 2010 Aug;138(2 Suppl):18S-24S.
66. Udem BJ, Taylor-Clark T. Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jun;133(6):1521–34.
67. Oetjen LK, Kim BS. Interactions of the immune and sensory nervous systems in atopy. *The FEBS Journal*. 2018 Sep;285(17):3138–51.
68. Bautista DM, Wilson SR, Hoon MA. Why we scratch an itch: the molecules, cells and circuits of itch. *Nat Neurosci*. 2014 Feb;17(2):175–82.
69. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989 Nov;299(6710):1259–60.
70. Johnson CC, Ownby DR. The infant gut bacterial microbiota and risk of pediatric asthma and allergic diseases. *Transl Res*. 2017 Jan;179:60–70.
71. Haahtela T. A biodiversity hypothesis. *Allergy*. 2019 Aug;74(8):1445–56.
72. von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology*. 2007;212(6):433–9.
73. Mutius E, Schmid S. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy*. 2006;61(4):407–13.
74. Vuitton DA, Divaret-Chauveau A, Dalphin ML, Laplante JJ, von Mutius E, Dalphin JC. Protection contre l'allergie par l'environnement de la ferme : en 15 ans, qu'avons-nous appris de la cohorte européenne « PASTURE » ? *Bull Acad Natl Med*. 2019 Oct;203(7):618–30.
75. Karvonen AM, Hyvärinen A, Gehring U, Korppi M, Doekes G, Riedler J, et al. Exposure to microbial agents in house dust and wheezing, atopic dermatitis and atopic sensitization in early childhood: a birth cohort study in rural areas. *Clin Exp Allergy*. 2012 Aug;42(8):1246–56.
76. Roduit C, Frei R, Depner M, Schaub B, Loss G, Genuneit J, et al. Increased food diversity in the first year of life is inversely associated with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Apr;133(4):1056–64.
77. Loss G, Apprigh S, Waser M, Kneifel W, Genuneit J, Büchele G, et al. The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: The GABRIELA study. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Oct;128(4):766-773.e4.
78. Nicklaus S, Divaret-Chauveau A, Chardon ML, Roduit C, Kaulek V, Ksiazek E, et al. The protective effect of cheese consumption at 18 months on allergic diseases in the first 6 years. *Allergy*. 2019 Apr;74(4):788–98.
79. Stein MM, Hrusch CL, Gozdz J, Igartua C, Pivniouk V, Murray SE, et al. Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *N Engl J Med*. 2016 Aug 4;375(5):411–21.
80. Paller AS, Spergel JM, Mina-Osorio P, Irvine AD. The atopic march and atopic multimorbidity: Many trajectories, many pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Jan;143(1):46–55.

81. Haahtela T, Valovirta E, Bousquet J, Mäkelä M, Allergy Programme Steering Group. The Finnish Allergy Programme 2008-2018 works. *Eur Respir J*. 2017 Jun;49(6):1700470.
82. Krzych-Fałta E, Furmańczyk K, Piekarska B, Raciborski F, Tomaszewska A, Walkiewicz A, et al. Extent of protective or allergy-inducing effects in cats and dogs. *Ann Agric Environ Med*. 2018 Jun 20;25(2):268–73.
83. Lødrup Carlsen KC, Roll S, Carlsen KH, Mowinckel P, Wijga AH, Brunekreef B, et al. Does pet ownership in infancy lead to asthma or allergy at school age? Pooled analysis of individual participant data from 11 European birth cohorts. *PLoS One*. 2012;7(8):e43214.
84. Roduit C, Wohlgensinger J, Frei R, Bitter S, Bieli C, Loeliger S, et al. Prenatal animal contact and gene expression of innate immunity receptors at birth are associated with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jan;127:179-185.e1.
85. Heinrich J. Influence of indoor factors in dwellings on the development of childhood asthma. *Int J Hyg Environ Health*. 2011 Jan;214(1):1–25.
86. Cook DG, Strachan DP. Health effects of passive smoking. 3. Parental smoking and prevalence of respiratory symptoms and asthma in school age children. *Thorax*. 1997 Dec;52(12):1081–94.
87. Cable N, Kelly Y, Bartley M, Sato Y, Sacker A. Critical role of smoking and household dampness during childhood for adult phlegm and cough: a research example from a prospective cohort study in Great Britain. *BMJ Open*. 2014 Apr 19;4(4):e004807.
88. Raheison C, Pénard-Morand C, Moreau D, Caillaud D, Charpin D, Kopfersmitt C, et al. In utero and childhood exposure to parental tobacco smoke, and allergies in schoolchildren. *Respir Med*. 2007 Jan;101(1):107–17.
89. Owora AH, Zhang Y. Childhood wheeze trajectory-specific risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2021 Jan;32(1):34–50.
90. Apel K, Costet N, Chapron A, Cordier S, Monfort C, Chevrier C, et al. Home environment: respiratory and allergic phenotypes from birth to age six in the PELAGIE cohort. *NPJ Prim Care Respir Med*. 2019 Jul 25;29(1):29.
91. Coker E, Katamba A, Kizito S, Eskenazi B, Davis JL. Household air pollution profiles associated with persistent childhood cough in urban Uganda. *Environ Int*. 2020 Mar;136:105471.
92. Cecchi L, D’Amato G, Annesi-Maesano I. External exposome and allergic respiratory and skin diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Mar;141(3):846–57.
93. Loss GJ, Depner M, Hose AJ, Genuneit J, Karvonen AM, Hyvärinen A, et al. The Early Development of Wheeze. Environmental Determinants and Genetic Susceptibility at 17q21. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Apr 15;193(8):889–97.
94. Asher MI, Stewart AW, Mallol J, Montefort S, Lai CK, Ait-Khaled N, et al. Which population level environmental factors are associated with asthma, rhinoconjunctivitis and eczema? Review of the ecological analyses of ISAAC Phase One. *Respiratory Research*. 2010 Jan;11(1):8.
95. Basagaña X, Torrent M, Atkinson W, Puig C, Barnes M, Vall O, et al. Domestic aeroallergen levels in Barcelona and Menorca (Spain). *Pediatr Allergy Immunol*. 2002 Dec;13(6):412–7.

96. Ferris BG. Epidemiology Standardization Project (American Thoracic Society). *Am Rev Respir Dis*. 1978 Dec;118(6 Pt 2):1–120.
97. Chauveau A, Dalphin ML, Kaulek V, Roudit C, Pugin A, von Mutius E, et al. Disagreement between Skin Prick Tests and Specific IgE in Early Childhood. *Int Arch Allergy Immunol*. 2016;170(2):69–74.
98. Lanza ST, Collins LM, Lemmon DR, Schafer JL. PROC LCA: A SAS Procedure for Latent Class Analysis. *Structural Equation Modeling: A Multidisciplinary Journal*. 2007 Oct 23;14(4):671–94.
99. Weller BE, Bowen NK, Faubert SJ. Latent Class Analysis: A Guide to Best Practice. *Journal of Black Psychology*. 2020 May 1;46(4):287–311.
100. McLachlan GJ, Peel D. *Finite Mixture Models*. John Wiley & Sons; 2004. 450 p.
101. Keir S, Page C. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008 Oct;21(5):721–30.
102. Keir SD, Spina D, Douglas G, Herd C, Page CP. Airway responsiveness in an allergic rabbit model. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2011 Oct;64(2):187–95.
103. Varechova S, Poussel M, Schweitzer C, Demoulin B, Chenuel B, Marchal F. Stimulus response latency of cough and expiration reflex depends on breathing in the rabbit. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012 Jun;25(3):242–7.
104. Tiotiu A, Chenuel B, Foucaud L, Demoulin B, Demoulin-Alexikova S, Christov C, et al. Lack of desensitization of the cough reflex in ovalbumin-sensitized rabbits during exercise. *PLoS ONE*. 2017;12(2):e0171862.
105. Varechova S, Demoulin B, Poussel M, Chenuel B, Marchal F. Cough threshold and reactivity to mechanical stimulation of the trachea in the rabbit preliminary observations. *Bratisl Lek Listy*. 2011;112(3):136–9.
106. Varechova S, Demoulin B, Leblanc AL, Coutier L, Ioan I, Bonabel C, et al. Neonatal hyperoxia up regulates cough reflex in young rabbits. *Respir Physiol Neurobiol*. 2015 Mar;208:51–6.
107. Schweitzer C, Demoulin B, Varechova S, Poussel M, Marchal F. Neural control of airway to deep inhalation in rabbits. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011 Jul 31;177(2):169–75.
108. Marchal F, Evrot E, Schweitzer C, Demoulin B, Poussel M, Varechova S. Bronchodilation induced by muscular contraction in spontaneously breathing rabbits: neural or mechanical? *Respir Physiol Neurobiol*. 2012 Mar 15;180(2–3):311–5.
109. Clay E, Patacchini R, Trevisani M, Preti D, Branà MP, Spina D, et al. Ozone-Induced Hypertussive Responses in Rabbits and Guinea Pigs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016 Apr;357(1):73–83.
110. Mutolo D, Cinelli E, Bongiani F, Pantaleo T. Inhibitory control of the cough reflex by galanin receptors in the caudal nucleus tractus solitarii of the rabbit. *Am J PhysiolReg Integr Comp Physiol*. 2014 Dec;307(11):R1358–67.
111. Coutier-Marie L, Ioan I, Bonabel C, Demoulin B, Leblanc AL, Debitu L, et al. Maturation of Airway Defensive Reflexes Is Related to Development of Feeding Behavior during Growth in Rabbits. *Front Physiol*. 2017 Feb;8:64.

112. Varechova S, Demoulin B, Leblanc AL, Coutier L, Ioan I, Bonabel C, et al. Neonatal hyperoxia up regulates cough reflex in young rabbits. *Respir Physiol Neurobiol*. 2015 Mar;208:51–6.
113. Plevkova J, Brozmanova M, Matloobi A, Poljacek I, Honetschlager J, Buday T. Animal models of cough. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2021 Aug 1;290:103656.
114. Peták F, Hantos Z, Adamicza A, Gálity H, Habre W. Development of bronchoconstriction after administration of muscle relaxants in rabbits with normal or hyperreactive airways. *Anesth Analg*. 2006 Jul;103(1):103–9, table of contents.
115. Basmajian JV, Stecko G. The role of muscles in arch support of the foot. *J Bone Joint Surg Am*. 1963 Sep;45:1184–90.
116. 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 Oct;23(5):397–402.
117. Marchal F, Demoulin B, Schweitzer C, Leblanc AL, Bertin N. Airway response to induced muscular contraction in spontaneously breathing rabbits. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008 Feb 1;160(2):224–31.
118. Foucaud L, Demoulin B, Leblanc AL, Ioan I, Schweitzer C, Demoulin-Alexikova S. Modulation of protective reflex cough by acute immune driven inflammation of lower airways in anesthetized rabbits. *PLoS One*. 2019;14(12):e0226442.
119. Fung G. A Comprehensive Overview of Basic Clustering Algorithms. *Computer Science* 2001.
120. Everitt B. Cluster analysis is a generic term for a wide range of numerical methods for examining data. *Stat Methods Med Res*. 2004 Oct;13(5):343–5.
121. Kim HJ, Abraham I, Malone PS. Analytical methods and issues for symptom cluster research in oncology. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2013 Mar;7(1):45–53.
122. Nagin DS. Group-Based Trajectory Modeling: An Overview. *ANM*. 2014;65(2–3):205–10.
123. Abarda A, Dakkon M, Azhari M, Zaaloul A, Khabouze M. Latent Transition Analysis (LTA) : A Method for Identifying Differences in Longitudinal Change Among Unobserved Groups. *Procedia Computer Science*. 2020 Jan;170:1116–21.
124. Latent Class and Latent Transition Analysis. John Wiley & Sons, Ltd; 2009. p. 1–22.
125. Genolini C, Pingault JB, Driss T, Côté S, Tremblay RE, Vitaro F, et al. KmL3D: a non-parametric algorithm for clustering joint trajectories. *Comput Methods Programs Biomed*. 2013 Jan;109(1):104–11.
126. Just J, Elegbede CF, Deschildre A, Bousquet J, Moneret-Vautrin DA, Crepet A, et al. Three peanut-allergic/sensitized phenotypes with gender difference. *Clin Exp Allergy*. 2016 Dec;46(12):1596–604.
127. Nadif R, Febrissy M, Andrianjafimasy MV, Le Moual N, Gormand F, Just J, et al. Endotypes identified by cluster analysis in asthmatics and non-asthmatics and their clinical characteristics at follow-up: the case-control EGEA study. *BMJ Open Respir Res*. 2020 Dec;7(1):e000632.

128. Roduit C, Frei R, Depner M, Karvonen AM, Renz H, Braun-Fahrländer C, et al. Phenotypes of Atopic Dermatitis Depending on the Timing of Onset and Progression in Childhood. *JAMA Pediatr.* 2017 Jul;171(7):655–62.
129. Hose AJ, Depner M, Illi S, Lau S, Keil T, Wahn U, et al. Latent class analysis reveals clinically relevant atopy phenotypes in 2 birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Jun;139(6):1935-1945.e12.
130. Siroux V, Boudier A, Bousquet J, Dumas O, Just J, Le Moual N, et al. Trajectories of IgE sensitization to allergen molecules from childhood to adulthood and respiratory health in the EGEA cohort. *Allergy.* 2022 Feb;77(2):609–18.
131. Verboon P, Hutten E, Smeekens S, Jongen EMM. Trajectories of loneliness across adolescence: An empirical comparison of longitudinal clustering methods using R. *J Adolesc.* 2022 Jun;94(4):513–24.
132. Bougas N, Just J, Beydon N, De Blic J, Gabet S, Lezmi G, et al. Unsupervised trajectories of respiratory/allergic symptoms throughout childhood in the PARIS cohort. *Pediatr Allergy Immunol.* 2019 May;30(3):315–24.
133. Forster F, Ege MJ, Gerlich J, Weinmann T, Kreißl S, Weinmayr G, et al. Trajectories of asthma and allergy symptoms from childhood to adulthood. *Allergy.* 2022 Apr;77(4):1192-1203
134. Pechlivanis S, Depner M, Kirjavainen PV, Roduit C, Täubel M, Frei R, et al. Continuous Rather Than Solely Early Farm Exposure Protects From Hay Fever Development. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022 Nov 7;S2213-2198(22)01137-0.
135. Scott EA, Bruning E, Nims RW, Rubino JR, Ijaz MK. A 21st century view of infection control in everyday settings: Moving from the Germ Theory of Disease to the Microbial Theory of Health. *Am J Infect Control.* 2020 Nov;48(11):1387–92.
136. Rook GAW, Bloomfield SF. Microbial exposures that establish immunoregulation are compatible with targeted hygiene. *J Allergy Clin Immunol.* 2021 Jul 1;148(1):33–9.
137. Weber J, Illi S, Nowak D, Schierl R, Holst O, von Mutius E, et al. Asthma and the hygiene hypothesis. Does cleanliness matter? *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Mar;191(5):522–9.
138. Yang Z, Chen Z, Lin X, Yao S, Xian M, Ning X, et al. Rural environment reduces allergic inflammation by modulating the gut microbiota. *Gut Microbes.* 2022 Jan-Dec;14(1):2125733.
139. Berger I, Schierl R, Ochmann U, Egger U, Scharrer E, Nowak D. Concentrations of dust, allergens and endotoxin in stables, living rooms and mattresses from cattle farmers in southern Bavaria. *Ann Agric Environ Med.* 2005;12(1):101–7.
140. Schierl R, Heise A, Egger U, Schneider F, Eichelser R, Nesper S, et al. Endotoxin concentration in modern animal houses in southern Bavaria. *Ann Agric Environ Med.* 2007;14(1):129–36.
141. Kullman GJ, Thorne PS, Waldron PF, Marx JJ, Ault B, Lewis DM, et al. Organic dust exposures from work in dairy barns. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1998 Jun;59(6):403–13.
142. Theodorou J, Nowak E, Böck A, Salvermoser M, Beerweiler C, Zeber K, et al. Mitogen-activated protein kinase signaling in childhood asthma development and environment-mediated protection. *Pediatr Allergy Immunol.* 2022 Jan;33(1):e13657.

143. Pali-Schöll I, Bianchini R, Afify SM, Hofstetter G, Winkler S, Ahlers S, et al. Secretory protein beta-lactoglobulin in cattle stable dust may contribute to the allergy-protective farm effect. *Clin Transl Allergy*. 2022 Feb;12(2):e12125.
144. Loss G, Depner M, Ulfman LH, van Neerven RJJ, Hose AJ, Genuneit J, et al. Consumption of unprocessed cow's milk protects infants from common respiratory infections. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Jan;135(1):56–62.
145. Braun-Fahrländer C, von Mutius E. Can farm milk consumption prevent allergic diseases? *Clin Exp Allergy*. 2011 Jan;41(1):29–35.
146. Lluís A, Depner M, Gaugler B, Saas P, Casaca VI, Raedler D, et al. Increased regulatory T-cell numbers are associated with farm milk exposure and lower atopic sensitization and asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Feb;133(2):551–9.
147. Brick T, Hettinga K, Kirchner B, Pfaffl MW, Ege MJ. The Beneficial Effect of Farm Milk Consumption on Asthma, Allergies, and Infections: From Meta-Analysis of Evidence to Clinical Trial. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020 Mar;8(3):878-889.e3.
148. Von Mutius E. MARTHA Study [Internet]. [cited 2023 Jan 22]. Available from: <https://www.martha-studie.de/english-version/>
149. Frei R, Lauener RP, Cramer R, O'Mahony L. Microbiota and dietary interactions: an update to the hygiene hypothesis? *Allergy*. 2012 Apr;67(4):451–61.
150. Nicklaus S, Divaret-Chauveau A, Chardon ML, Roduit C, Kaulek V, Ksiazek E, et al. The protective effect of cheese consumption at 18 months on allergic diseases in the first 6 years. *Allergy*. 2019 Apr;74(4):788–98.
151. Roduit C, Frei R, Ferstl R, Loeliger S, Westermann P, Rhyner C, et al. High levels of Butyrate and Propionate in early life are associated with protection against atopy. *Allergy*. 2019 Apr;74(4):799-809.
152. Depner M, Taft DH, Kirjavainen PV, Kalanetra KM, Karvonen AM, Peschel S, et al. Maturation of the gut microbiome during the first year of life contributes to the protective farm effect on childhood asthma. *Nat Med*. 2020 Nov;26(11):1766–75.
153. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BLK, Skov T, Paludan-Müller G, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Sep;128(3):646-652.e1-5.
154. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clin Exp Allergy*. 2014 Jun;44(6):842–50.
155. Ashique S, De Rubis G, Sirohi E, Mishra N, Rihan M, Garg A, et al. Short Chain Fatty Acids: Fundamental mediators of the gut-lung axis and their involvement in pulmonary diseases. *Chem Biol Interact*. 2022 Dec;368:110231.
156. Budden KF, Gellatly SL, Wood DLA, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. *Nat Rev Microbiol*. 2017 Jan;15(1):55–63.

157. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *mBio*. 2015 Mar 3;6(2):e00037.
158. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Prinz M. Communicating systems in the body: how microbiota and microglia cooperate. *Immunology*. 2017 Jan;150(1):7–15.
159. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol*. 2020 Jan;11.
160. Kazachkov M, Kapoor BC, Malecha PW, Wu BG, Li Y, Levine J, et al. Aerodigestive dysbiosis in children with chronic cough. *Pediatr Pulmonol*. 2018 Sep;53(9):1288–98.
161. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med*. 2014 Feb;20(2):159–66.
162. Metzler S, Frei R, Schmaußer-Hechfellner E, von Mutius E, Pekkanen J, Karvonen AM, et al. Association between antibiotic treatment during pregnancy and infancy and the development of allergic diseases. *Pediatr Allergy Immunol*. 2019 Jun;30(4):423–33.
163. Millqvist E, Bende M. Capsaicin cough sensitivity is decreased in smokers. *Respir Med*. 2001 Jan;95(1):19–21.
164. Stein RT, Holberg CJ, Sherrill D, Wright AL, Morgan WJ, Taussig L, et al. Influence of parental smoking on respiratory symptoms during the first decade of life: the Tucson Children's Respiratory Study. *Am J Epidemiol*. 1999 Jun 1;149(11):1030–7.
165. Rancière F, Nikasinovic L, Bousquet J, Momas I. Onset and persistence of respiratory/allergic symptoms in preschoolers: new insights from the PARIS birth cohort. *Allergy*. 2013 Sep;68(9):1158–67.
166. Mohammad Y, Shaaban R, Hassan M, Yassine F, Mohammad S, Tessier JF, et al. Respiratory effects in children from passive smoking of cigarettes and narghile: ISAAC Phase Three in Syria. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014 Nov;18(11):1279–84.
167. Montefort S, Ellul P, Montefort M, Caruana S, Grech V, Agius Muscat H. The effect of cigarette smoking on allergic conditions in Maltese children (ISAAC). *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 Aug;23(5):472–8.
168. Henderson J, Hilliard TN, Sherriff A, Stalker D, Al Shammari N, Thomas HM. Hospitalization for RSV bronchiolitis before 12 months of age and subsequent asthma, atopy and wheeze: a longitudinal birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005 Aug;16(5):386–92.
169. Makrinioti H, Hasegawa K, Lakoumentas J, Xepapadaki P, Tsofia M, Castro-Rodriguez JA, et al. The role of respiratory syncytial virus- and rhinovirus-induced bronchiolitis in recurrent wheeze and asthma—A systematic review and meta-analysis. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2022;33(3):e13741.
170. Valkonen H, Waris M, Ruohola A, Ruuskanen O, Heikkinen T. Recurrent wheezing after respiratory syncytial virus or non-respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy: a 3-year follow-up. *Allergy*. 2009 Sep;64(9):1359–65.

171. Kenmoe S, Atenguena Okobalemba E, Takuissu GR, Ebogo-Belobo JT, Oyono MG, Magoudjou-Pekam JN, et al. Association between early viral lower respiratory tract infections and subsequent asthma development. *World J Crit Care Med.* 2022 Jul;11(4):298–310.
172. Heinonen S, Rodriguez-Fernandez R, Diaz A, Oliva Rodriguez-Pastor S, Ramilo O, Mejias A. Infant Immune Response to Respiratory Viral Infections. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2019 Aug;39(3):361–76.
173. Larsen JM, Brix S, Thyssen AH, Birch S, Rasmussen MA, Bisgaard H. Children with asthma by school age display aberrant immune responses to pathogenic airway bacteria as infants. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Apr;133(4):1008–13.
174. van Meel ER, Mensink-Bout SM, den Dekker HT, Ahluwalia TS, Annesi-Maesano I, Arshad SH, et al. Early-life respiratory tract infections and the risk of school-age lower lung function and asthma: a meta-analysis of 150 000 European children. *Eur Respir J.* 2022 Oct;60(4):2102395.
175. Mazzone SB, Chung KF, McGarvey L. The heterogeneity of chronic cough: a case for endotypes of cough hypersensitivity. *Lancet Respir Med.* 2018 Aug;6(8):636–46.
176. Binns E, Tuckerman J, Licciardi PV, Wurzel D. Respiratory syncytial virus, recurrent wheeze and asthma: A narrative review of pathophysiology, prevention and future directions. *Journal of Paediatrics and Child Health.* 2022;58(10):1741–6.
177. Bergroth E, Roponen M, Karvonen AM, Keski-Nisula L, Remes S, Riedler J, et al. Enhanced T helper 1 and 2 cytokine responses at birth associate with lower risk of middle ear infections in infancy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2017 Feb;28(1):53–9.
178. Pfefferle PI, Büchele G, Blümer N, Roponen M, Ege MJ, Krauss-Etschmann S, et al. Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: The PASTURE Study. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Jan;125:108-115.e3.
179. Jacqmin-Gadda H, Thiébaud R, Dartigues JF. Modélisation conjointe de données longitudinales quantitatives et de délais censurés: Joint modeling of quantitative longitudinal data and censored survival time. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique.* 2004 Dec 1;52(6):502–10.

Valorisation

Publications scientifiques

Divaret-Chauveau A, Mauny F, Hose A, Depner M, Dalphin M-L, Kaulek V, Barnig C, Schaub B, Schmausser-Hechfellner E, Renz H, Riedler J, Pekkanen J, Karvonen AM, Täubel M, Lauener R, Roduit C, Vuitton DA, von Mutius E, Demoulin-Alexikova S, PASTURE study group. Trajectories of cough without a cold in early childhood and associations with atopic diseases. *Clin Exp Allergy*. Dec 2022. <https://doi.org/10.1111/cea.14257>. Rang C – Impact factor 5,40

Divaret-Chauveau A, Foucaud L, Demoulin B, Teston C, Loison P, Le Cann P, Schweitzer C, De Carvalho Bittencourt M, Mauny F, Demoulin-Alexikova S. Early exposure to farm dust in an allergic airway inflammation rabbit model: does it affect bronchial and cough hyperresponsiveness? *PLoS ONE* Jan 2023; 18(1): e0279498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279498>. Rang C – Impact factor 3,75

Communications orales et affichées

Communication affichée au 10ème symposium international sur la toux en Juin 2018 à Londres :

Divaret-Chauveau A, Demoulin-Alexikova S, Dalphin M-L, Kaulek V, Schmausser-Hechfellner E, Renz H, Riedler J, Pekkanen J, Karvonen AM, Lauener R, Roduit C, Vuitton DA, von Mutius E, Dalphin JC, PASTURE study group. Clinical phenotypes of cough during the 10 first years of life: association with environment and allergic diseases. **Prix de la meilleure présentation de poster**

Résumé soumis en janvier 2023 en vue d'une communication orale au Congrès Francophone d'Allergologie 2023 et au congrès de l'Académie Européenne d'Allergologie 2023 : Divaret-Chauveau A, Demoulin-Alexikova S, Dalphin M-L, Barnig C, Kaulek V, Hose A, Depner M, Schaub B, Schmausser-Hechfellner E, Skevaki C, Riedler J, Pekkanen J, Karvonen AM, Täubel M, Lauener R, Roduit C, Vuitton DA, Mauny F, von Mutius E, PASTURE study group. Early environment and trajectories of cough without a cold in the European birth cohort PASTURE.

Title: Cough without a cold in children: trajectories in the first ten years of life, association with allergic diseases and role of perinatal environment

Keywords: allergy, children, cough, environment, trajectories

Abstract: Cough is a frequent and non-specific respiratory symptom in children. In the majority of otherwise healthy children, cough is a symptom related to a self-limiting viral upper respiratory tract infection. However, some children have cough hypersensitivity that manifests as frequent or recurrent coughs, without a respiratory infection, and triggered by normally innocuous stimuli. Although atopy is one of the etiological mechanisms of this hypersensitivity, few studies have explored the relationship between cough trajectories in children and allergic diseases, as well as their association with early environment.

In order to identify trajectories of cough in childhood, to analyse their relationship with allergic diseases and with early environment, the thesis work consisted of two complementary parts: an epidemiological observational part in children and an experimental part in rabbit. The epidemiological part was based on analysis of data from the prospective European birth cohort PASTURE (Protection against Allergy: STUdy in Rural Environment). Among the 961 children included in the epidemiological study, a latent class analysis allowed to identify five trajectories of cough without a cold: never or infrequent (59.9%), acute transient (24.1%), moderate transient (6.8%), late persistent (4.8%) and early persistent (4.4%). Compared with the never/infrequent trajectory, the other trajectories were significantly associated with wheezing, asthma and allergic rhinitis. Early persistent trajectory had the strongest association with asthma and was inversely associated with farm environment.

Food allergy was associated with both persistent trajectories. Atopic sensitisation was only associated with the late persistent trajectory. Consumption of boiled farm milk during the first year of life was the only farm-specific exposure significantly associated with a decreased risk of early persistent cough and acute transient cough. Repeated or prolonged respiratory tract infections during the first year of life was associated with a higher risk of early persistent cough. The experimental part allowed to evaluate the impact of perinatal exposure to farm dust on cough sensitivity and airway responsiveness in an allergic airway inflammation rabbit model. A specific environment has been applied to pregnant rabbits and their offspring until six weeks after birth (pathogen-free zone for the control group, calf barn for the farm group). Rabbit pups were then housed in a conventional zone and sensitised to ovalbumin by intraperitoneal route. Cough sensitivity was assessed by mechanical stimulation of cough and airway responsiveness by a methacholine challenge. We did not find any effect of early exposure to the calf barn on cough sensitivity or bronchial reactivity.

Our results suggest 1/ a close link between persistent cough and atopic diseases and 2/ the existence of potential common preventive factors. Children having persistent or recurrent cough should be referred to an allergist for a complete allergy assessment. Prevention studies for atopic diseases should also explore symptoms of cough without a cold in order to evaluate the relevance of developing common prevention strategies.

Titre : La toux en dehors d'une infection chez l'enfant : trajectoires au cours des dix premières années de vie, association avec les maladies allergiques et rôle de l'environnement périnatal

Mots clés : allergie, enfant, environnement, toux, trajectoires

Résumé : La toux est un symptôme respiratoire fréquent et non spécifique chez l'enfant, habituellement présent uniquement durant une infection aiguë des voies respiratoires. Cependant, certains enfants présentent une toux par excès de sensibilité se manifestant par des épisodes de toux fréquents ou récurrents, en dehors d'une infection, et des facteurs déclenchants habituellement non tussigènes. Bien qu'un des mécanismes étiologiques de cette hypersensibilité soit l'atopie, très peu d'études se sont intéressées à la relation entre trajectoires de toux dans l'enfance et maladies allergiques ainsi qu'à leur association avec l'environnement précoce.

Afin d'identifier les trajectoires de toux dans l'enfance, d'analyser leur relation avec les maladies allergiques et avec l'environnement précoce, le travail de cette thèse a porté sur deux volets complémentaires : un volet épidémiologique observationnel chez l'enfant et un volet expérimental chez le lapin. Le volet épidémiologique reposait sur l'analyse des données de la cohorte prospective européenne PASTURE (Protection against Allergy: STUdy in Rural Environment) Parmi les 961 enfants inclus dans l'étude épidémiologique, une analyse en classes latentes a permis d'identifier cinq trajectoires de toux en dehors d'une infection : peu ou pas de symptômes (59,9 %), transitoire aiguë (24,1 %), transitoire modérée (6,8 %), persistante à début tardif (4,8 %), et persistante à début précoce (4,4 %). En comparaison avec la trajectoire peu ou pas de symptômes, les autres trajectoires étaient significativement associées avec les sibilants, l'asthme et la rhinite allergique. La trajectoire persistante à début précoce avait la plus forte association pour l'asthme et était inversement associée à l'environnement fermier. La trajectoire persistante à début précoce avait la plus forte association pour l'asthme et était inversement associée à l'environnement fermier. L'allergie alimentaire était associée aux deux trajectoires persistantes.

La sensibilisation atopique était associée uniquement à la toux persistante à début tardif. La consommation de lait de ferme bouilli durant la première année de vie était la seule exposition spécifique à l'environnement fermier significativement associée à une diminution du risque de toux persistante à début précoce et de toux transitoire aiguë. Des infections respiratoires répétées ou prolongées dans la première année de vie étaient significativement associées à un risque plus élevé de toux persistante à début précoce. Le volet expérimental a permis d'évaluer l'impact de l'exposition périnatale à la poussière de ferme sur la sensibilité tussigène et la réactivité bronchique chez un modèle de lapin d'inflammation bronchique d'origine allergique. Un environnement spécifique a été appliqué aux lapines gestantes et à leurs lapereaux jusqu'à la sixième semaine de vie (zone exempte d'agent pathogène pour le groupe contrôle ; étable de veaux pour le groupe ferme). Les lapereaux étaient ensuite hébergés dans une zone conventionnelle de l'animalerie et sensibilisés à l'ovalbumine par voie intrapéritonéale. La sensibilité à la toux a été évaluée par la stimulation mécanique de la toux et la réactivité bronchique par un test à la méthacholine. Nous n'avons pas retrouvé d'effet de l'exposition précoce à une étable de veaux sur la sensibilité tussigène ni la réactivité bronchique. Nos résultats suggèrent un lien étroit entre toux persistante et pathologies atopiques ainsi que l'existence de potentiels facteurs de prévention communs. La forte association des trajectoires de toux persistantes avec les pathologies atopiques respiratoires et les allergies alimentaires doit nous amener à orienter les enfants présentant une toux persistante ou récurrente vers un médecin allergologue pour qu'une évaluation allergologique complète soit réalisée. Les études de prévention des pathologies atopiques devraient également s'intéresser aux symptômes de toux en dehors d'une infection afin d'évaluer la pertinence de développer des stratégies de prévention communes.