



**HAL**  
open science

**Etude du système nerveux autonome du fœtus à l'enfant : modélisation de son fonctionnement chez le fœtus et application chez l'enfant en réanimation pédiatrique**

Morgan Recher

► **To cite this version:**

Morgan Recher. Etude du système nerveux autonome du fœtus à l'enfant : modélisation de son fonctionnement chez le fœtus et application chez l'enfant en réanimation pédiatrique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2020. Français. NNT : 2020LILUS036 . tel-03358870

**HAL Id: tel-03358870**

**<https://theses.hal.science/tel-03358870>**

Submitted on 29 Sep 2021

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

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

UNIVERSITE LILLE  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE

THESE D'UNIVERSITE  
En vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

Discipline : Physiologie

**Morgan Recher**

---

**Etude du système nerveux autonome du fœtus à l'enfant : modélisation de son fonctionnement chez le fœtus et application chez l'enfant en réanimation pédiatrique**

---

Thèse dirigée par le Professeur Laurent Storme  
Et co-encadrée par le Professeur Stéphane Leteurtre

**Présentée et soutenue publiquement le**

Devant le jury composé de

**Madame le Professeur Véronique Debarge**, Université de Lille, Examineur

**Madame le Professeur Géraldine Gascoin**, Université d'Angers, Rapporteur

**Monsieur le Professeur Stéphane Leteurtre**, Université de Lille, Co-Directeur

**Monsieur le Professeur Laurent Storme**, Université de Lille, Directeur

**Monsieur le Professeur Pierre Tourneux**, Université d'Amiens, Rapporteur

**Madame le Professeur Marisa Tucci**, Université de Montréal, Examineur,  
Présidente du jury



## REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le résultat de travaux menés au sein de l'ULR 2694 – METRICS : Evaluation des technologies de santé et des pratiques médicales, environnement périnatal et santé, du Département Hospitalo-Universitaire de Recherche Expérimentale de l'Université de Lille, et du service de Réanimation et de Soins Continus Pédiatriques du CHU de Lille.

A Madame le Professeur Véronique Debarge : un grand merci Véronique de m'avoir accompagné durant mon master 2 et lors de ma Thèse. Un grand merci pour tes conseils et encouragements qui m'ont permis de toujours progresser. Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

A Madame le Professeur Gascoin : je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et d'être rapporteur de cette Thèse. J'espère que ce travail sera à la hauteur de votre exigence. Soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Tourneux : je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail, d'être rapporteur de cette Thèse et d'avoir fait partie de mon comité de suivi individuel de Thèse. Vos conseils ont été une aide précieuse afin d'améliorer le contenu scientifique de celle-ci. Soyez assuré de mon profond respect.

A Madame le Professeur Tucci : je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de mon jury de Thèse lors de mon passage dans votre service des soins

intensifs pédiatriques de Sainte-Justine. J'espère que ce travail sera à la hauteur de votre exigence et de votre compétence. Soyez assuré de mon profond respect.

A mon directeur de thèse, Monsieur Laurent Storme : un grand merci pour votre enseignement depuis mes débuts en tant qu'interne de pédiatrie, vos conseils, votre pédagogie au lit du patient mais également lors de discussions informelles, et votre soutien depuis le début. Je vous remercie de m'avoir aiguillé et supervisé pour ce travail. Je vous remercie de 'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A mon co-directeur de thèse, Monsieur Stéphane Leteurtre : je te remercie de m'avoir épaulé, supervisé et conseillé pour cette Thèse. Tes conseils ont été une aide précieuse afin d'améliorer ce travail. Je te remercie de plus de m'avoir fait confiance afin d'intégrer ton équipe. J'ai de la chance d'apprendre auprès de toi, en tant qu'interne de pédiatrie, et maintenant en tant que praticien hospitalier dans ton service de réanimation pédiatrique. Sois assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur Julien De Jonckheere : un grand merci à toi pour tes conseils et tes idées sur ce travail. Merci de m'accompagner depuis mon master 2, et de me permettre de toujours progresser. Tes conseils sont (toujours) pertinents. Puisse continuer encore longtemps ce partenariat et cette amitié naissante.

A Monsieur Arthur Lauriot-Dit-Prevost : un grand merci d'avoir partagé ton année de master 2 avec moi, de tes remarques pertinentes et de ta bonne humeur. Ce fut une belle rencontre.

A Monsieur le Professeur Regis Logier : un grand merci d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi individuel de Thèse. Vos conseils et remarques ont permis à ce travail de se concrétiser.

Aux membres de l'équipe d'accueil et du DHURE :

Madame Capucine Besengez, un grand merci pour ton implication, la logistique et les moments de rigolade !!

Monsieur le Docteur Thomas Hubert et aux animaliers Arnold, Martin et Michel, un grand merci pour votre engagement, votre disponibilité, vos conseils, et votre humour !

Madame Mathilde Flocteil, un grand merci pour la gestion du projet NIPE en Réanimation Pédiatrique.

Un grand merci au service de Réanimation Pédiatrique, à mes collègues médecins, aux infirmières qui m'ont permis de faire aboutir ce travail. C'est une joie et un honneur de travailler à leur côté.

A mes parents, qui m'ont toujours soutenu et appris la qualité du travail, ainsi que les valeurs humaines.

Un grand merci à ma femme, Hélène, pour la joie et le bonheur qu'elle m'apporte, son soutien et surtout, sa patience.

A mes enfants, Eliot et Maé, qui illuminent ma vie.

A toutes ma famille et mes amis, pour leur soutien et leurs encouragements.

## RESUMES ET MOTS CLES

### 1. Résumé en français

Le système nerveux autonome (SNA) assure le maintien de l'homéostasie par ses deux composantes opposées que sont le système sympathique ( $\Sigma$ ) et le système parasympathique ( $\text{para}\Sigma$ ). Il régule de nombreuses fonctions autonomes de l'organisme (régulation du rythme cardiaque, pression artérielle, thermorégulation, digestion, miction etc.). Ce système contrôle en particulier le rythme cardiaque et ses variations rapides. L'analyse de la variabilité sinusale du rythme cardiaque est une méthode permettant d'évaluer les variations de tonus du SNA. Les méthodes de mesure de la variabilité du rythme cardiaque (Heart Rate Variability, HRV) sont nombreuses et validées depuis de nombreuses années, permettant d'apprécier le fonctionnement normal ou pathologique du SNA. Ainsi, l'HRV peut être appréhendé par des méthodes temporelles, des méthodes spectrales, des méthodes géométriques ou des méthodes non linéaires par exemple. L'application de ces différentes approches a permis de concevoir plusieurs dispositifs d'évaluation du SNA, notamment du système parasympathique, que ce soient pour les patients adultes avec l'*Analgesia Nociception Index* (ANI), permettant de monitorer la balance analgésie/nociception, pour les enfants prématurés avec le *Newborn Infant Parasympathetic Evaluation* (NIPE) permettant de monitorer le bien être, et pour le fœtus le *Fetal Stress Index* (FSI) en cours d'étude par notre équipe d'accueil. Cependant, il existe encore des limitations empêchant l'utilisation de ces dispositifs avec, en particulier pour le fœtus : (1) l'absence de consensus quant au rôle des composants  $\Sigma$  et  $\text{para}\Sigma$  du SNA pendant le travail maternel, (2) les difficultés d'interprétation de variations du SNA d'origine multifactorielle ; et pour les enfants de 1 mois à 18 ans : (3) l'absence de validation de ces méthodes d'analyse.



Le but principal de cette série de travaux était : pour le fœtus (1) d'évaluer l'implication des composants  $\Sigma$  et  $\text{para}\Sigma$  du SNA lors du travail, (2) d'évaluer la réponse du SNA du fœtus lors de l'administration d'opioïdes à la maman ; et pour les enfants hospitalisés en réanimation pédiatrique (3) de valider le NIPE pour les moins de 3 ans comme outil de monitoring de la balance analgésie/nociception.

## **2. Anglais**

### **a. Titre en anglais**

Autonomic Nervous System and Heart Rate Variability: from fetus to child.

### **b. Résumé en anglais**

The autonomic nervous system (ANS) maintains homeostasis through its two opposing components, the sympathetic system ( $\Sigma$ ) and the parasympathetic system ( $\text{para}\Sigma$ ). It regulates many of the body's autonomous functions (regulation of heart rate, blood pressure, thermoregulation, digestion, urination, etc.). In particular, the ANS controls the heart rate and its rapid variations. The analysis of the sinus variability of the heart rate is a method to evaluate the variations in the ANS tone. There are many methods for measuring the heart rate variability (HRV), which have been validated for many years, making it possible to assess the normal or pathological functioning of the ANS. Thus, the HRV can be apprehended by temporal methods, spectral methods, geometric methods or non-linear methods for example. The application of these different approaches has made it possible to design several ANS evaluation devices, particularly for the parasympathetic system, whether for adult patients with the Analgesia Nociception Index (ANI), which monitors the analgesia/nociception balance, for premature children with the Newborn Infant Parasympathetic Evaluation (NIPE), which monitors well-being, and for the fetus with the Fetal Stress Index (FSI), which is

currently being studied by our team. However, there are still limitations limiting the use of these devices with, in particular for the fetus: (1) the lack of consensus on the role of the  $\Sigma$  and  $\text{para}\Sigma$  components of ANS during maternal labor, (2) difficulties in interpreting variations in ANS of multifactorial origin; and for children from 1 month to 18 years of age: (3) the lack of validation of these analytical methods.

The main goal of this study was: for the fetus (1) to assess the involvement of the  $\Sigma$  and  $\text{para}\Sigma$  components of the ANS during labor, (2) to assess the fetal ANS response during opioid administration to the mother; and for children hospitalized in pediatric intensive care units (3) to validate the NIPE for children under 3 years of age as a tool for monitoring the analgesia/nociception balance.

### **3. Mots-clés en français**

Système nerveux autonome ; variabilité du rythme cardiaque ; fœtus ; opioïde ; sympathique ; parasympathique ; réanimation ; enfant.

### **4. Mots-clés en anglais**

Autonomic nervous system; heart rate variability; fetus; opioid; sympathetic; parasympathetic; intensive care; child.

## **INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE**

Travail de recherche réalisé au sein de l'ULR 2694 – METRICS : Evaluation des technologies de santé et des pratiques médicales, environnement périnatal et santé.

Professeur Benoit Dervaux

Adresse

CERIM, Faculté de Médecine

Tel : +33 (0) 3-20-62-69-69

## VALORISATION SCIENTIFIQUE

### 1. Publications

#### a. Acceptée

**Morgan Recher**, Jérémie Rousseaux, Mathilde Flocteil, Mylène Jouancastay, Alice Potisek, Marie-Emilie Lampin, Stéphane Leteurtre, Julien De jonckheere.

***Assessment of procedural distress in sedated/intubated children under 3 years old using the Newborn Infant Parasympathetic Evaluation (NIPE): A Diagnostic Accuracy Pilot Study.*** Pediatric Critical Care Medicine.

#### b. En cours de révision

**Morgan Recher**, Arthur Lauriot Dit Prevost, Dyuti Sharme, Julien De jonckheere, Charles Garabedian, Laurent Storme.

***Roles of parasympathetic outflow and sympathetic outflow in the hemodynamic response to brief umbilical cord occlusion in fetal sheep.***

PLoS One.

#### c. Soumises

**Morgan Recher**, Charles Garabedian, Estelle Aubry, Dyuti Sharma, Laura Butruille, Laurent Storme, Julien De jonckheere.

***Opioid Effect on the Autonomic Nervous System in a Fetal Sheep Model.***

Archives of Gynecology and Obstetrics.

### 2. Communications orales

***Cardiovascular effects and autonomic nervous system response to calcium channel blockers and opioid in fetal lamb: experimental study in sheep.***

Congress of the international symposium on infusion technologies (Lille), Novembre 2016

***Impact des morphiniques et des inhibiteurs calciques sur l'hémodynamique et le système nerveux autonome du fœtus : étude expérimentale chez la brebis.***

Congrès de la Société Française de Pédiatrie (Marseille), Juin 2017

***Rôle du système nerveux autonome dans la réponse hémodynamique à l'occlusion de cordon : étude chez la brebis gestante.***

Journées Francophones de Recherche en Néonatalogie (Paris), Décembre 2018.

***Role of the autonomic nervous system on hemodynamic response during cordal occlusion: model of near-term fetal sheep.***

Congress of the European Society of Paediatric and Neonatal Intensive Care (Salzburg, Autriche), Juin 2019



## ABBREVIATIONS

SNA : Système Nerveux Autonome

$\Sigma$  : sympathique

Para $\Sigma$  : parasympathique

HRV : Heart Rate Variability (Variabilité de la fréquence cardiaque)

ANI : Analgesia Nociception Index

NIPE : Newborn Infant Parasympathetic Evaluation

FSI : Fetal Stress Index

PA : Pression Artérielle

PAM : Pression Artérielle Moyenne

FC : Fréquence Cardiaque

PaO<sub>2</sub> : Pression partielle Artérielle en Oxygène

PaCO<sub>2</sub> : Pression partielle Artérielle en Dioxyde de Carbone

ECG : Electrocardiogramme

AMP<sub>C</sub> : Adénosine Monophosphate Cyclique

VRS : Variabilité Respiratoire Sinusale du rythme cardiaque

NN : Normal-to-Normal

RCF : rythme Cardiaque Fœtal

VCT: Variabilité à Court Terme

VLT: Variabilité à Long Terme

VLF : Very Low-Frequency

LF : Low-Frequency

HF : High-Frequency

ULF : Ultra Low-Frequency

ARMA : Auto Regressive Moving Average

DHURE : Département Hospitalier et Universitaire de Recherche Expérimentale

PIA : Pression Intra-Amniotique

BE : Base Excess

RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin

CBS : Comfort Behaviour Scale

NIPEm : NIPE moyen

NIPEi : NIPE instantané

ROC : Receiver Operator Characteristics

## TABLE DES MATIERES

<b>RESUMES ET MOTS-CLES .....</b>	<b>7</b>
1. Résumé en français .....	7
2. Anglais .....	8
a. <i>Titre en anglais</i> .....	8
b. <i>Résumé en anglais</i> .....	8
3. Mots-clés en français.....	9
4. Mots-clés en anglais .....	9
<b>INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE .....</b>	<b>10</b>
<b>VALORISATION SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>11</b>
1. Publications.....	11
a. <i>Acceptée</i> .....	11
b. <i>Soumises</i> .....	11
2. Communications orales .....	11
<b>ABBREVIATIONS .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
A. Système nerveux autonome .....	19
1.A.1. <i>Fonctionnement du système nerveux autonome</i> .....	19
1.A.2. <i>Boucles réflexes du système nerveux autonome</i> .....	20
1.A.3. <i>Exploration du système nerveux autonome</i> .....	24
B. Variabilité de la fréquence cardiaque .....	24
1.B.1. <i>Anatomie et physiologie cardiaque</i> .....	24
1.B.2. <i>Variabilité respiratoire sinusale de la fréquence cardiaque</i> .....	28
C. Analyse de la variabilité du rythme cardiaque .....	31
1.C.1. <i>Historique</i> .....	31
1.C.2. <i>Recueil de l’ECG et création de la série R-R</i> .....	32
1.C.3. <i>Techniques d’analyse de la variabilité du rythme cardiaque</i> .....	37



a. Méthodes temporelles .....	38
b. Méthodes spectrales .....	39
c. Correspondances entre les méthodes temporelles et spectrales .....	41
a. Autres méthodes d’analyse .....	41
<b>1.C.4. Transformée en Ondelettes.....</b>	<b>42</b>
<b>D. Applications cliniques.....</b>	<b>43</b>
<b>1.D.1. L’Analgesia Nociception Index .....</b>	<b>43</b>
<b>1.D.2. Le Newborn Infant Parasympathetic Evaluation .....</b>	<b>47</b>
<b>1.D.3. Le fetal Stress Index .....</b>	<b>47</b>
<b>E. Problématiques posées .....</b>	<b>51</b>
<b>2. MODELE D’ETUDE EXPERIMENTALE CHEZ LE FŒTUS DE BREBIS.....</b>	<b>53</b>
A. Description du modèle animal.....	53
B. Mesure des paramètres hémodynamiques .....	59
C. Mesure des paramètres biologiques fœtaux.....	60
<b>3. Rôles des systèmes parasympathique et sympathique dans la réponse hémodynamique à une brève occlusion du cordon ombilical chez le fœtus de brebis.....</b>	<b>61</b>
A. Introduction.....	61
B. Objectifs .....	62
C. Méthodologie .....	62
D. Résultats .....	65
E. Discussion .....	71
F. Conclusion .....	80
<b>4. Effets de thérapeutiques maternelles sur le SNA fœtal .....</b>	<b>82</b>
A. Introduction.....	82
B. Objectifs .....	83
C. Méthodologie .....	83
D. Résultats .....	84
E. Discussion .....	88
F. Conclusion .....	90

<b>5. Utilisation du NIPE en réanimation pédiatrique .....</b>	<b>91</b>
<b>A. Introduction.....</b>	<b>91</b>
<b>B. Objectifs .....</b>	<b>92</b>
<b>C. Méthodologie .....</b>	<b>92</b>
<b>D. Résultats .....</b>	<b>96</b>
<b>E. Discussion .....</b>	<b>104</b>
<b>F. Conclusion .....</b>	<b>109</b>
<b>6. Avis des relecteurs lors de la soumission de cet article au journal PCCM..</b>	<b>111</b>
<b>7. Discussion globale des résultats .....</b>	<b>113</b>
<b>A. Etude de la physiologie fœtale cardiaque lors du travail.....</b>	<b>113</b>
<b>B. Etude des thérapeutiques maternelles sur le SNA fœtal .....</b>	<b>114</b>
<b>C. Etude de la variabilité de la fréquence cardiaque chez les enfants         comme reflet du bien-être.....</b>	<b>114</b>
<b>8. Suite du programme de recherche, perspectives.....</b>	<b>116</b>
<b>A. Réponse du SNA fœtal à l'occlusion cordonale .....</b>	<b>116</b>
<b>B. Etude de l'HRV par le NIPE en pédiatrie .....</b>	<b>117</b>
<b>9. Conclusion .....</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>120</b>
<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>132</b>
<b>ANNEXE 2.....</b>	<b>162</b>
<b>ANNEXE 3.....</b>	<b>191</b>
<b>ANNEXE 4.....</b>	<b>215</b>



# 1. INTRODUCTION

## A. Système nerveux autonome

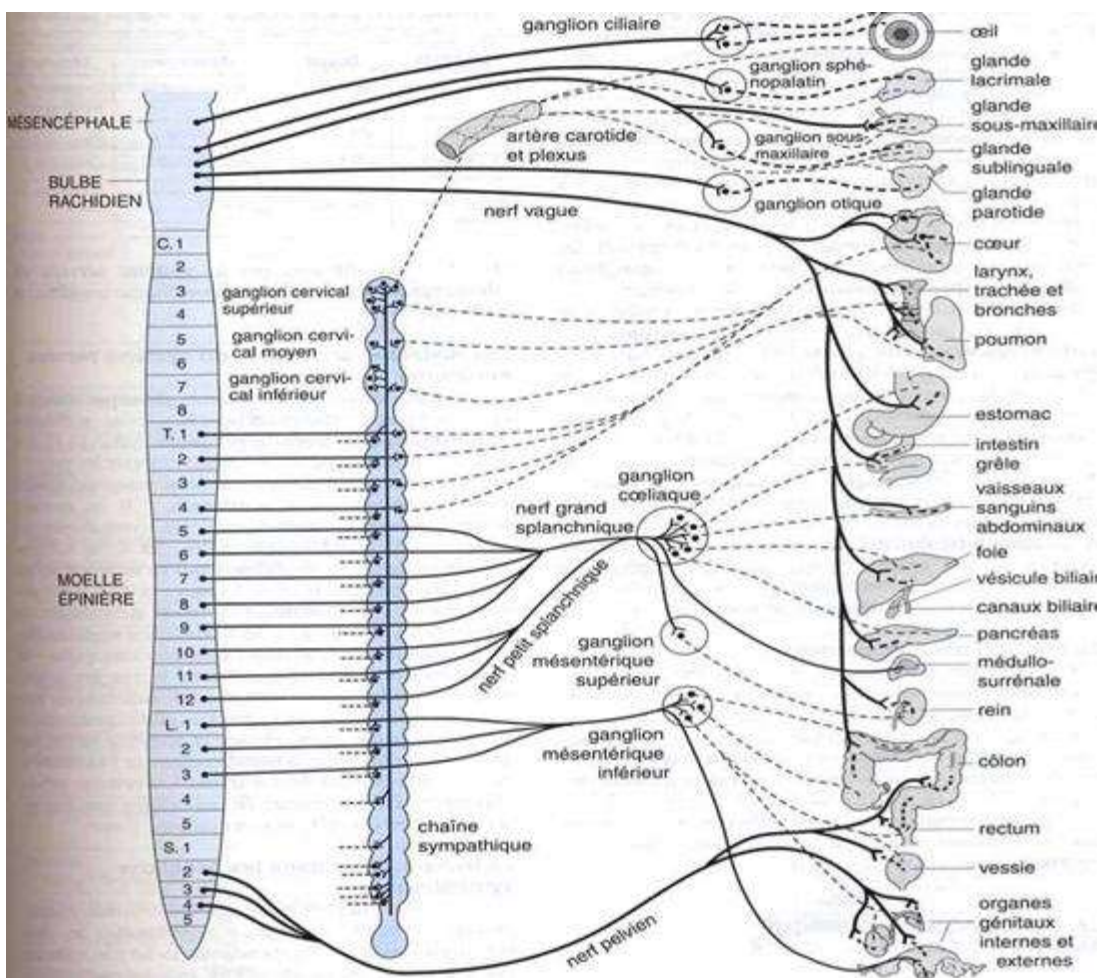
### 1.A.1. Fonctionnement du système nerveux autonome

Le SNA assure le recueil des informations nécessaires à la régulation de l'homéostasie par ses récepteurs, localisés dans les viscères et les vaisseaux. Ils envoient ces informations vers les centres intra-axiaux (moelle épinière, tronc cérébral, hypothalamus et système limbique) via des voies afférentes dédiés (nerfs  $\Sigma$  viscéraux, nerfs para $\Sigma$  sacrés, nerf glosso-pharyngien, pneumogastrique, et phrénique). Les voies effectrices sont composées de deux neurones : pré- et post-ganglionnaire. Les neurones pré ganglionnaires ont un fonctionnement semblable dans le  $\Sigma$  et le para $\Sigma$ , Dans le  $\Sigma$ , le neurone post ganglionnaire fonctionne par relargage de Noradrénaline, et dans le para $\Sigma$  par relargage d'Acétylcholine. En post-ganglionnaire, le  $\Sigma$  présente plusieurs types de récepteurs à la Noradrénaline, les récepteurs  $\beta$  (stimulation cardiaque, et vasodilatation) et  $\alpha$  (vasoconstriction). Le para $\Sigma$  présente un seul type de récepteur à l'acétylcholine post-ganglionnaire dit muscarinique (baisse du rythme cardiaque, vasodilatation). Le SNA régule ainsi la pression artérielle (PA), les résistances vasculaires systémiques et la fréquence cardiaque (FC).

Les efférences  $\Sigma$  à destinée cardiovasculaire sont issues de la moelle thoracolombaire entre TH1 et L2. Les fibres à destinée cardiaque cheminent au niveau du plexus cardiaque au contact des fibres para $\Sigma$ . Les fibres qui sont issues du ganglion stellaire jouent un rôle particulier : celles issues du côté droit innervent préférentiellement l'oreillette droite et la région sinoatriale, celles issues du côté gauche innervent préférentiellement le côté gauche.

Les neurones initiaux des fibres para $\Sigma$  sont situés dans le centre pneumogastrique (X), situé dans le bulbe cérébral. Les neurones cheminent dans les nerfs pneumogastriques puis s'en détachent pour former les ganglions cholinergiques dans les oreillettes. Les nerfs post-ganglionnaires para $\Sigma$  se distribuent surtout autour du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire.

L'organisation générale du SNA est présentée **Figure 1.A.1.**



**Figure 1.A.1.** Organisation du système nerveux autonome.

### **1.A.2. Boucles réflexes du système nerveux autonome**

La régulation de l'homéostasie est sous l'influence de signaux afférents et de 2 boucles réflexes principales (**Figure 1.A.2.a**):

- Le baroréflexe contribue au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire par son action sur la FC. L'action du baroréflexe est médiée par les variations de PA qui sont captés au niveau des barorécepteurs situés au niveau du sinus carotidien et de l'arc aortique. Les informations sont envoyées au système nerveux central (moelle épinière principalement, avec quelques afférences cérébrales) à chaque pulsation via le nerf vague et le nerf glossopharyngien. La voie efférente para $\Sigma$  médié par le nerf vague (nerf X) envoie en permanence des signaux de régulation au niveau du nœud sinusal cardiaque, adaptant ainsi en permanence le rythme cardiaque. Une stimulation du baroréflexe par augmentation de la PA provoque une diminution de la FC par activation para $\Sigma$ , ainsi qu'une vasodilatation artérielle (1). Inversement, une baisse de PA diminuera le tonus para $\Sigma$ . Le système  $\Sigma$  joue également un rôle dans la régulation du baroréflexe. Une augmentation de PA, en plus de stimuler la voie efférente para $\Sigma$ , inhibera la voie efférente  $\Sigma$  à visée cardiaque (2). Il est possible d'évaluer la réponse du baroréflexe par le rapport entre le delta de FC en millisecondes (ms) et le delta de PA en mmHg sur une période donnée. Ce rapport est nommé *baroreflex sensitivity* (3)

- Le chémoréflexe, issu des chémorécepteurs périphériques situés au niveau de la carotide et de l'arc aortique (sensibles à la PaO<sub>2</sub>), et des chémorécepteurs centraux, situés dans le tronc cérébral (sensibles au pH et à la PaCO<sub>2</sub>). Lors d'une hypoxie, définie par une diminution de la PaO<sub>2</sub>, les chémorécepteurs périphériques provoquent, via leurs afférences vers le système nerveux central, une stimulation  $\Sigma$ , permettant l'obtention d'une réponse cardiovasculaire (tachycardie, augmentation de la pression

artérielle par vasoconstriction périphérique) et ventilatoire (augmentation de la fréquence respiratoire).

Le baroréflexe et le chémoréflexe sont en étroite interaction. En effet, en provoquant une augmentation de PA, la stimulation  $\Sigma$  du chémoréflexe stimule également les barorécepteurs artériels qui inhibent la fonction effectrice  $\Sigma$  (du chémoréflexe). Ce mécanisme agit alors comme un rétrocontrôle négatif (**Figure 2.A.2.a**) (4). Il existe également de nombreuses afférences du SNA issues du cœur lui-même, avec une présence de barorécepteurs et de chémorécepteurs dans les parois des veines caves, des oreillettes, des ventricules et des veines pulmonaires (4). Les neurones cheminent dans le nerf pneumogastrique ou le réseau  $\Sigma$  épicaudique, jouant un rôle majeur dans l'adaptation cardiovasculaire aux conditions de charge du myocarde. De plus, Les modulations vagales induites par la respiration entraînent à chaque cycle respiratoire une variabilité du rythme cardiaque autour de son rythme moyen. Ces modulations sont anatomiquement distinctes de la boucle vagale du baroréflexe (4). La **figure 1.A.2.b** illustre les interactions complexes entre les systèmes  $\Sigma$  et para $\Sigma$ , ventilation et nœud sinusal cardiaque.

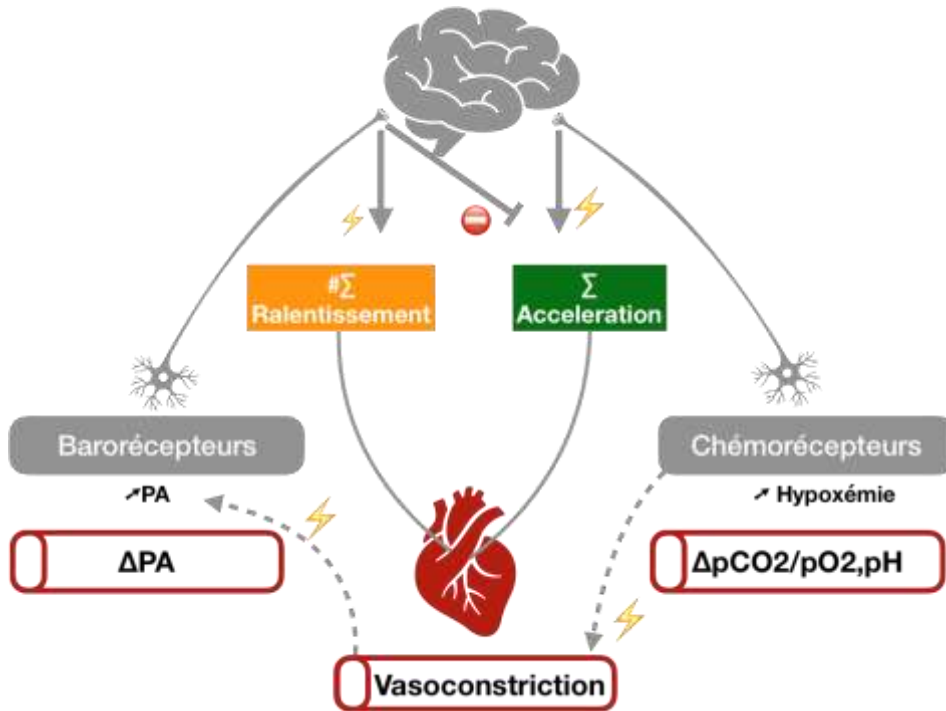


Figure 2.A.2.a. Régulation de la FC par le baroréflexe et le chémoréflexe, en réponse à une augmentation de PA (gauche, activation para $\Sigma$ ), et en réponse à une hypoxie (droite, stimulation  $\Sigma$ ).

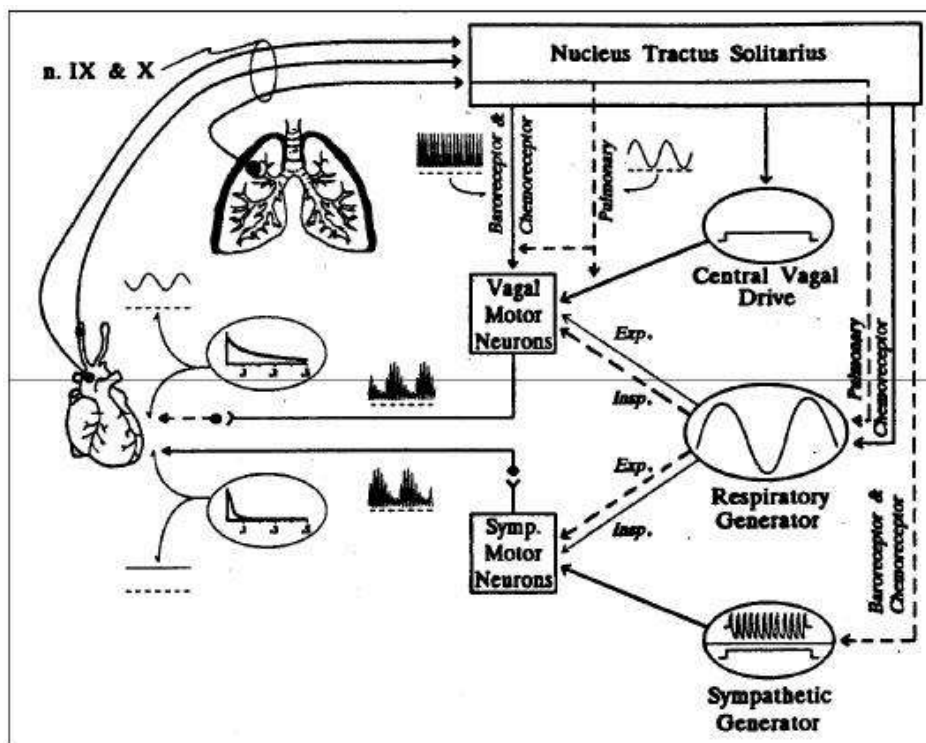


Figure 1.A.2.b. Schéma de l'interaction entre systèmes  $\Sigma$  et para $\Sigma$ , ventilation et nœud sinusal.



### **1.A.3. Exploration du système nerveux autonome**

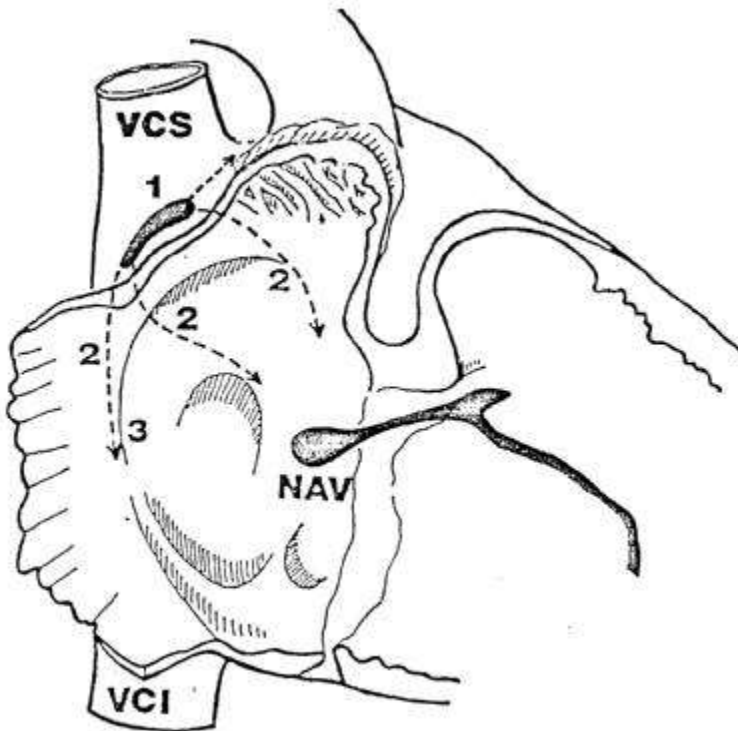
Pour explorer le rôle du SNA et des différents mécanismes de réponse à des stimuli, les outils pharmacologiques les plus fréquemment utilisés sont l'Atropine, un anticholinergique (se fixant sur les récepteurs muscariniques, action parasympatholytique) permettant de lever le frein vagal ; et le Propranolol, un bêtabloquant non sélectif (se fixant sur les récepteurs  $\beta$  du système adrénergique, action sympatholytique) permettant de bloquer la stimulation  $\Sigma$  (5,6).

Le nœud sinusal est l'échantillonneur des variations du tonus des systèmes  $\Sigma$  et para $\Sigma$ . L'analyse de l'HRV est une méthode connue et non invasive pour la mesure de la régulation du système cardio-vasculaire par le SNA (7).

## **B. Variabilité sinusale de la fréquence cardiaque**

### **1.B.1. Anatomie et physiologie cardiaque**

La position anatomique du nœud sinusal et des voies de conduction vers le nœud auriculo-ventriculaire sont illustrés dans la **Figure 1.B.1.a**.



**Figure 1.B.1.a.** Schéma anatomique du nœud sinusal et des voies de conduction.

(1) : nœud sinusal

(2) : voies de conduction préférentielles

(3) : Crista terminalis

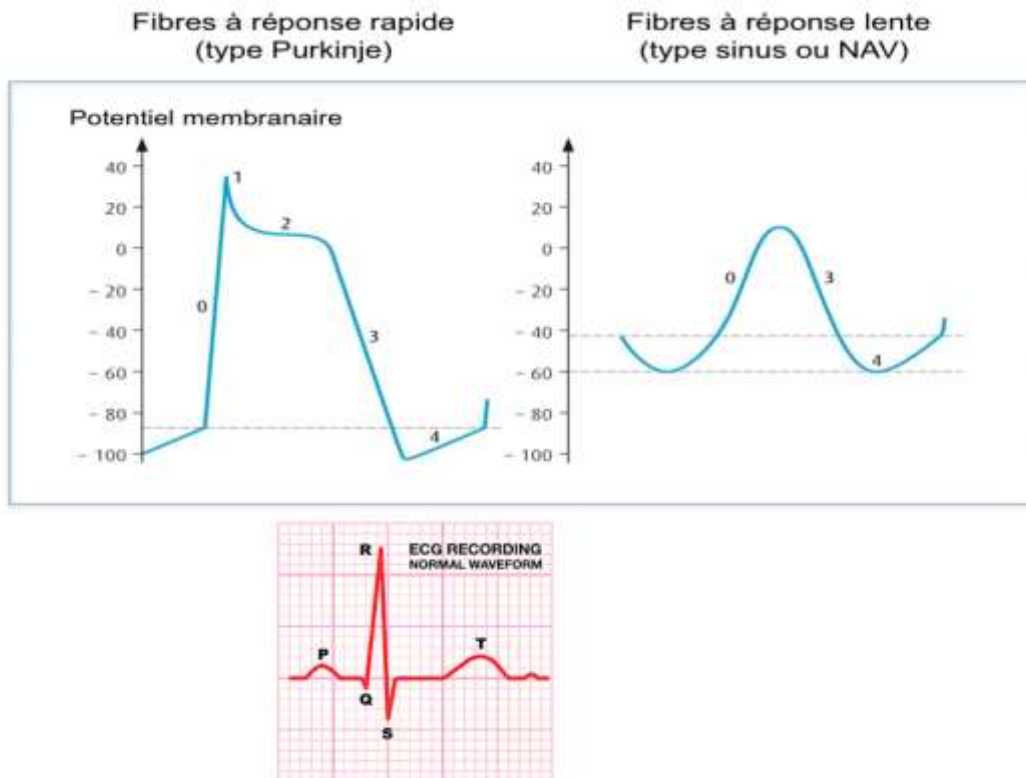
VCS : Veine Cave Supérieure

VCI : Veine Cave Inférieure

NAV : Nœud Auriculo-Ventriculaire

*Le nœud sinusal détermine le rythme cardiaque sous l'influence du tonus sympathique et parasympathique*

L'innervation du nœud sinusal provient du nerf vague X (pneumogastrique) et du  $\Sigma$  droit faisant relais au niveau des ganglions situés dans la graisse épicaudique. Le potentiel de membrane transmembranaire a été mesuré permettant l'excitation cellulaires et la création d'un battement cardiaque, ainsi que la variation cyclique des battements (**Figure 1.B.1.b**).



**Figure 1.B.1.b.** Schéma de la dépolarisation membranaire en fonction du type de cellule cardiaque (en haut) avec les 4 phases (phases 0 à 4), et effet électrique sur l'électrocardiogramme (ECG) en bas.

La décharge électrique des terminaisons nerveuses parasympathiques entraîne la libération d'acétylcholine dans la fente synaptique qui se lie aux récepteurs pré membranaires muscariniques, entraînant l'ouverture des canaux potassiques transmembranaires. Le courant potassique diminue la pente de dépolarisation (phase 4) des cellules du nœud sinusal (**Figure 1.B.1.c**). La stimulation sympathique entraîne la libération, dans la fente synaptique, de noradrénaline qui, en se liant aux récepteurs  $\beta_1$ , provoque une cascade de signaux intracellulaires avec activation d'une protéine kinase. Cette activation entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire au sodium et au calcium

augmentant ainsi l'excitabilité cellulaire, se traduisant par une augmentation de la fréquence cardiaque de décharge du nœud sinusal.

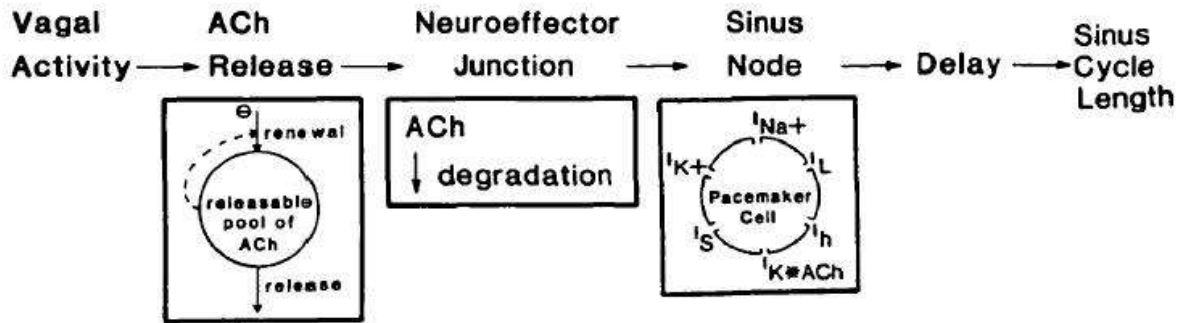


Figure 1.B.1.c. Schéma de l'activité du tonus vagale sur le cycle cardiaque (8).

La réponse vagale est très rapide, avec un maximum d'effet en 0,5 seconde, avec un retour à l'état basal en 1 seconde. La réponse  $\Sigma$  est par contre plus lente que la réponse vagale : un burst  $\Sigma$  n'a pas d'effet pendant 1 seconde puis entraîne un effet croissant jusque 4 secondes. Le retour à la ligne de base ne se fait qu'en 20 secondes. Ceci explique les différences observées dans la mesure des variations des tonus para $\Sigma$  (domaine des hautes fréquences) et  $\Sigma$  (domaine des basses fréquences).

Ces différences dans le temps d'action des effecteurs adrénergiques et cholinergiques s'expliquent en raison de différents facteurs :

- 1) Le mécanisme d'élimination du neurotransmetteur dans la fente synaptique : alors que la noradrénaline est majoritairement recapturée par les terminaisons nerveuses ou emportée dans le flot coronaire, l'acétylcholine est hydrolysée par les terminaisons nerveuses.
- 2) Les effets post-synaptiques sont différents : tandis que les récepteurs  $\beta$  sont couplés à l'AMPC, les récepteurs muscariniques sont directement couplés à

des transporteurs transmembranaires de potassium du sarcolemme, dont l'activation entraîne une hyperpolarisation membranaire dans les 100 ms suivant le début de la stimulation para $\Sigma$ .

Ainsi, les réponses cholinergiques et adrénérgiques sont cinétiquement différentes, avec une réponse para $\Sigma$  plus rapide. Ceci fixe donc la base pour l'analyse spectrale de la variabilité à court terme de la fréquence cardiaque.

### ***1.B.2. Variabilité respiratoire sinusale de la fréquence cardiaque***

Les variations de fréquence cardiaque, appelées HRV, ont lieu sur une large gamme de fréquence. Du fait d'origines très variées, les diverses influences qui s'exercent sur le rythme cardiaque ont été classées par catégories ; six ont été mises en évidence chez le mammifère :

- L'âge gestationnel – la fréquence cardiaque augmentant de façon régulière avec l'âge, en rapport avec la maturation du muscle cardiaque
- Après la naissance, la fréquence cardiaque diminue avec l'âge
- Les variations saisonnières surtout pour les espèces hibernantes, en rapport avec des variations de température interne et de sécrétions hormonales
- Les variations sur le nyctémère reflétant les variations du SNA sur les 24 heures
- Les variations courtes sur des périodes de 1 à 3 heures, probablement secondaire à des influences centrales et hormonales

- Les variations de l'ordre de la minute, en rapport avec les oscillations neurohormonales des concentrations de catécholamines sanguines ou d'angiotensine (7,9)
- Les variations de battement à battement, dite variabilité court terme, existant chez de nombreuses espèces animales. Ces variations sont associées à l'innervation  $\Sigma$  et para $\Sigma$  du nœud sinusal (10).

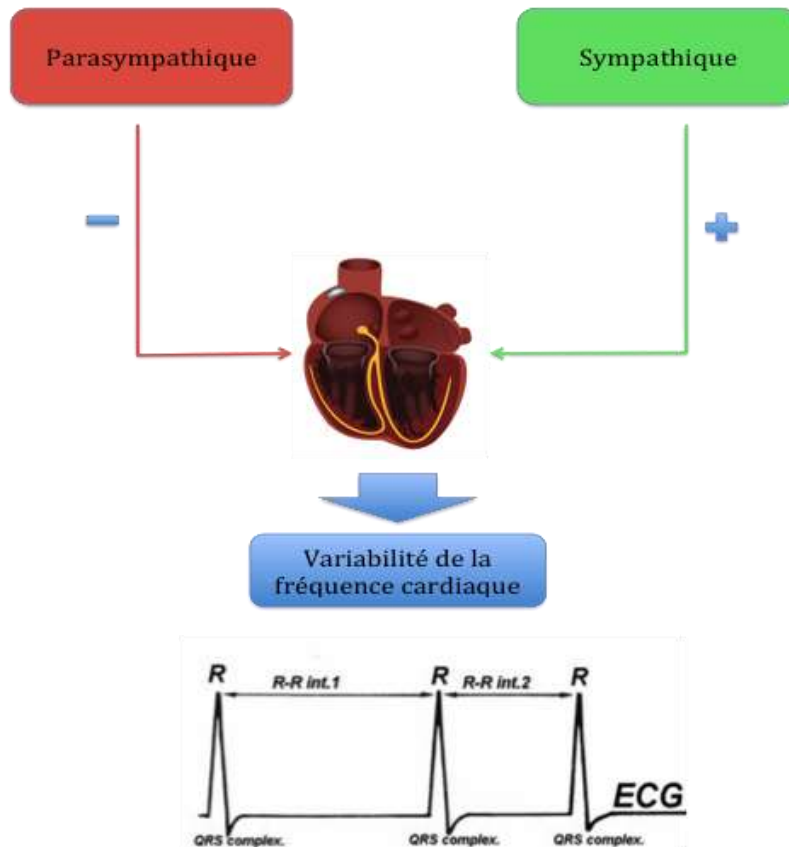
La variabilité du rythme cardiaque battement à battement appelée variabilité à court terme existe dans de nombreuses espèces animales. La sympathectomie chez le rat augmente cette variabilité et la vagotomie bilatérale chez le poisson diminue cette variabilité (11-13). Les patients transplantés cardiaques présentent une diminution de plus de 90% de cette variabilité (14).

La variabilité respiratoire sinusale du rythme cardiaque (VRS) est la variation de la fréquence cardiaque qui accompagne la respiration (15). La fréquence cardiaque augmente à l'inspiration et diminue à l'expiration (15). Cette VRS a été proposée comme indice du tonus para $\Sigma$ , mais d'autres oscillations se superposent expliquant la complexité de l'analyse de la variabilité sinusale de la fréquence cardiaque.

- Le domaine fréquentiel habituelle de la VRS (tonus para $\Sigma$ ) est de 0.15 à 0.4 Hz, soit de 9 à 24 cycles/minute chez l'adulte sain.
- Il existe également un autre domaine de fréquence, les basses fréquences correspondants à 3 à 9 cycles/minute, influencé par les systèmes  $\Sigma$  et para $\Sigma$ , ainsi que par le baroréflexe (16,17). Il est indépendant de la respiration sauf si le sujet respire lentement entre 3 et 9 cycles/minute.

- Il existe un domaine de très basse fréquence correspondants à 0.005 - 0.05 Hz essentiellement influencé par le tonus vasculaire et la thermorégulation (16).

Le rythme cardiaque est freiné en permanence par le tonus para $\Sigma$ , médié par la libération d'acétylcholine par les extrémités des neurones post-ganglionnaires au niveau des nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire. L'administration d'un anticholinergique tel que l'atropine démasque le frein vagal provoquant une tachycardie (18). Les modulations vagales induites par la respiration entraînent à chaque cycle respiratoire une variabilité du rythme cardiaque (**Figure 1.B.2**). Ces modulations sont anatomiquement distinctes de la boucle vagale du baroréflexe, dont les fibres afférentes comportant des barorécepteurs à haute pression situés dans le glomus carotidien, font synapses dans le noyau du tractus solitaire, et rejoignent le noyau dorsal moteur du nerf pneumogastrique X.



**Figure 1.B.2.** Contrôle du nœud sinusal par le Système Nerveux Autonome.

+ : stimulation accélératrice, - : stimulation décélératrice

Le nœud sinusal détermine le rythme cardiaque sous l'influence du tonus sympathique et parasympathique

## C. Analyse de la variabilité du rythme cardiaque

### 1.C.1. Historique

L'intérêt clinique d'analyse de l'HRV est apparu avec Hon et Lee en 1965 (19). Ils avaient remarqué que la souffrance fœtale était précédée d'une modification des intervalles R-R avant toute altération du rythme cardiaque lui-même. Ewing et al. en 1970 (20) ont développé des tests simples utilisant les variations des intervalles R-R sur de courtes périodes afin de détecter la dysautonomie chez des patients diabétiques. En 1977, Wolf et al (21) ont montré que la réduction de l'HRV après



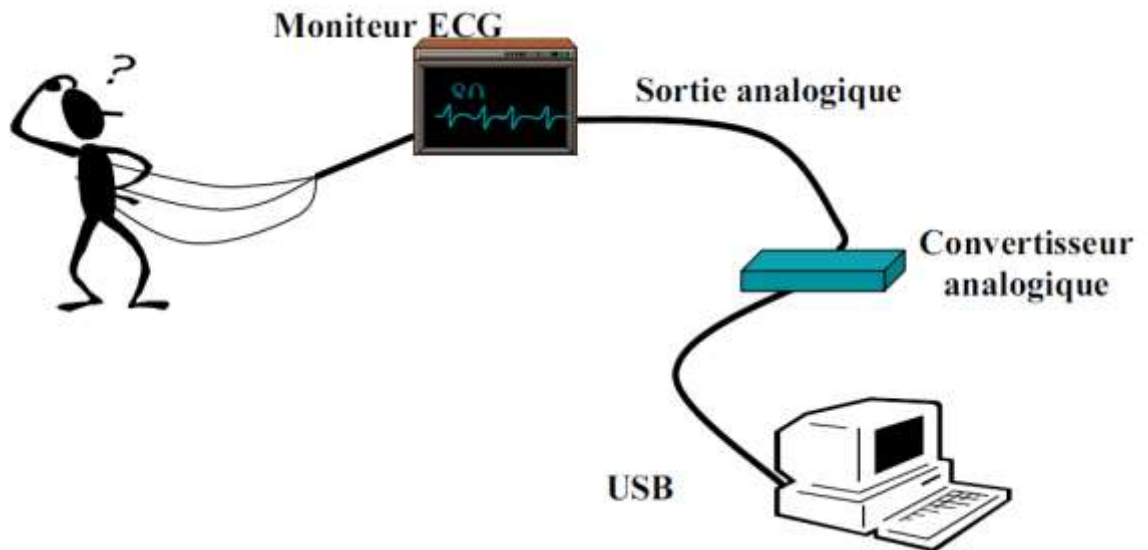
infarctus du myocarde était associée à une diminution de la survie de ces patients. Les premières analyses spectrales de la série R-R ont été mise au point par Akselrod et al pour quantifier le contrôle cardiovasculaire (22).

L'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque nécessite une chaîne d'acquisition du signal, débutant au patient jusqu'au moniteur d'analyse. Elle fait appel à différentes techniques qui vont être expliquées ci-après.

### **1.C.2. Recueil de l'ECG et création de la série R-R**

La chaîne d'acquisition du signal ne devrait pas débuter au recueil de l'ECG, comme c'est le cas le plus souvent, mais devrait remonter au contraire jusqu'au nœud sinusal lui-même. En effet, si le nœud sinusal est l'effecteur principal des variations des tons  $\Sigma$  et  $\text{para}\Sigma$ , il en représente l'échantillonneur principal. Il existe une limite à cette analyse de variabilité : plus la fréquence cardiaque est lente, plus le champ des fréquences étudiables se restreint, et ce, malgré le ré échantillonnage de la série R-R. Le théorème de Shannon stipule que la mesure d'un phénomène périodique nécessite une fréquence d'échantillonnage au moins du double de la fréquence la plus élevée. Ce principe s'applique à l'analyse fréquentielle des phénomènes cycliques. Quand celui-ci n'est pas respecté, la mesure du phénomène n'est pas fiable. Ainsi, si l'intervalle d'intérêt pour la mesure de l'HRV est [0.04 - 0.5 Hz], la fréquence cardiaque minimale pour une mesure correcte est de 1 Hz, soit 60 battements/min. Ce calcul suppose donc que le nœud sinusal lui-même serve d'échantillonneur principal, comme proposé par Koh et al. (23). Ceci souligne une limite intrinsèque de l'analyse spectrale de l'HRV. On peut calculer la fréquence cardiaque minimale nécessaire pour exploiter complètement le domaine fréquentiel d'intérêt [0.04 - 0.5 Hz], qui devrait être supérieure à 1 Hz, soit 60 battements/minute.

L'analyse de l'HRV nécessite l'acquisition et le traitement d'un signal permettant de détecter les cycles cardiaques. Habituellement, on utilise le signal électrocardiographique (ECG) pour détecter l'onde R du complexe QRS et créer la série R-R. Le signal ECG natif est analysé pour y sélectionner les ondes R permettant d'établir la série R-R, constituée des intervalles de temps qui séparent chaque onde R de la suivante. Chaque étape pour l'obtention d'une série R-R de bonne qualité est essentielle, faute de quoi son interprétation sera impossible (**Figure 1.C.2.a**).



**Figure 1.C.2.a.** Schéma de recueil de l'ECG et enregistrement.

La présence d'une extrasystole dans le tracé ECG constitue une perturbation de la série R-R, rendant l'interprétation de l'analyse de l'HRV erronée. Afin de corriger la série R-R, une technique consiste à ne pas prendre en compte l'extrasystole, et à considérer les complexes QRS normaux présents avant et après cette extrasystole. Celle-ci est alors remplacée dans la série par une onde R « virtuelle » située à la

moyenne de durée entre les 2 QRS adjacents. Une autre technique consiste à considérer les 2 ondes R précédentes et les 2 ondes R suivantes afin d'optimiser la position de l'onde R virtuelle (16,24). Le but étant de ne pas influencer le résultat de l'analyse avec une perturbation exceptionnelle, qui, en fait, ne traduit pas une modification de l'état du SNA mais un phénomène intra cardiaque indépendant (25).

La série R-R représente donc l'évolution des intervalles R-R au cours du temps (Figure 1.C.2.b).

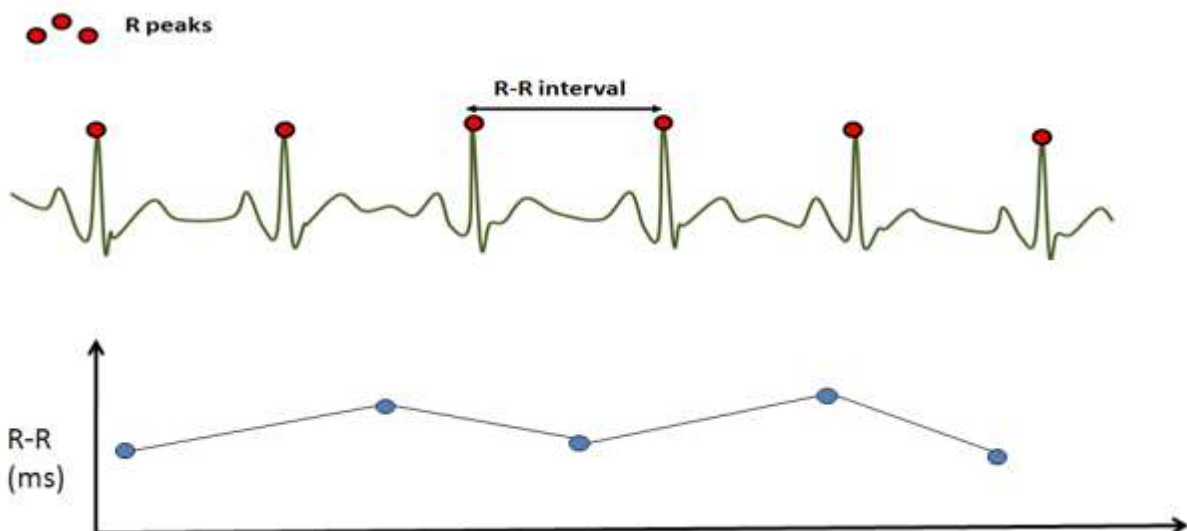
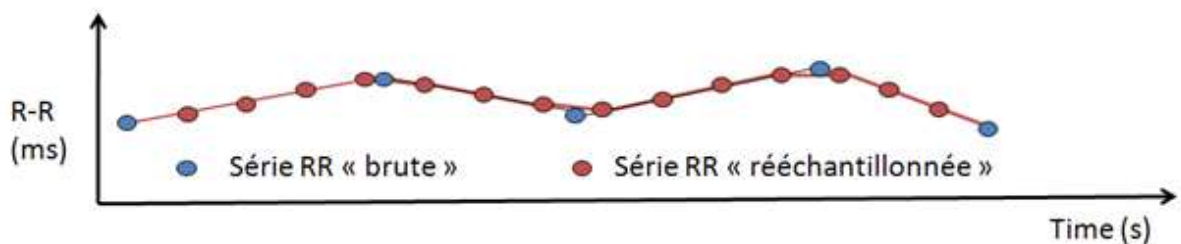


Figure 1.C.2.b. Série R-R et évolution temporelle.

Ce type de détection nécessite une bonne qualité de signal ECG en termes de résolution et de fréquence d'échantillonnage. Certains auteurs préconisent une fréquence d'échantillonnage de 1000 Hz pour obtenir une précision de  $\pm 1$  ms sur le calcul de l'intervalle R-R (26). En pratique, il est recommandé d'utiliser une fréquence d'échantillonnage d'au moins 250 Hz pour assurer une précision de  $\pm 4$  ms. Une fréquence d'échantillonnage inférieure à 250 Hz impliquerait l'utilisation de méthodes

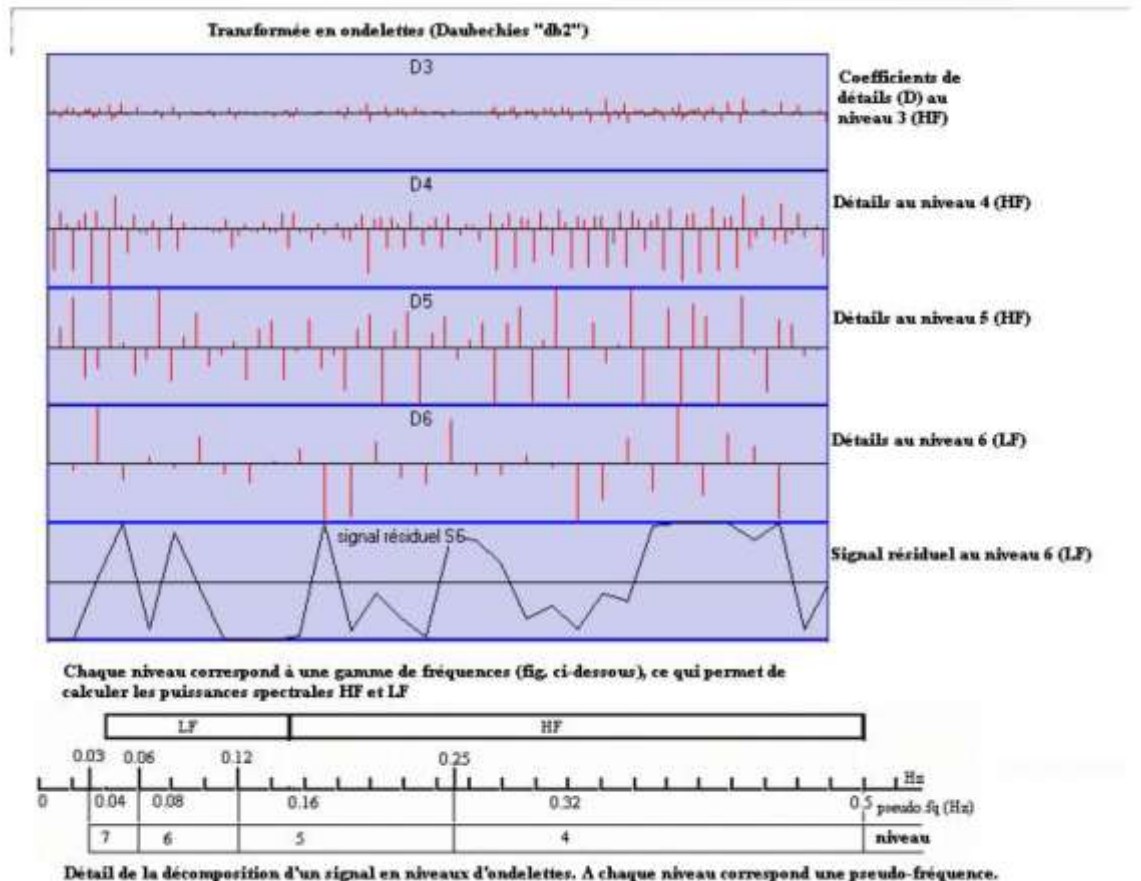
d'interpolation spécifique pour améliorer la précision des mesures (7). La série R-R obtenue est constituée d'une suite unidimensionnelle d'intervalles de temps irrégulier du fait de la variabilité du rythme cardiaque, et exprimées en secondes ou millisecondes. Plusieurs outils d'analyse, notamment fréquentielle, ne fonctionnent que sur des signaux échantillonnés à intervalle régulier, nécessitant généralement de ré échantillonner la série R-R, sauf dans quelques cas particuliers (transformée en ondelette spécifique). Ce genre d'algorithme consiste généralement à effectuer une interpolation, la plupart du temps linéaire, et parfois une spline cubique, sur le signal R-R brut (**Figure 1.C.2.c**). Les guidelines internationales recommandent une fréquence d'échantillonnage de la série R-R d'au moins 4 Hz pour pouvoir étudier l'HRV entre 0 et 2 Hz (7).



**Figure 1.C.2.c.** Série RR non échantillonnée (bleu) et série RR après échantillonnage (rouge).

La série R-R rééchantillonnée s'appelle le vecteur R-R. L'algorithme qui met en œuvre la transformée en ondelette utilise le calcul matriciel pour décomposer le vecteur signal R-R sur 8 à 10 niveaux. Chaque niveau est obtenu en multipliant le vecteur signal de taille  $N$  par la matrice d'ondelette (**Figure 1.C.2.d**). Ceci permet d'obtenir 2 demis vecteurs de taille  $N/2$  qui contiennent pour l'un, le détail du signal au niveau 1, et pour l'autre le signal résiduel. Le signal résiduel est analysé selon le même procédé, en le multipliant par la matrice d'ondelettes, donnant 2 demis vecteurs de





**Figure 1.C.2.e.** Illustration du processus d'analyse d'un vecteur signal par la transformée en ondelettes. Chaque niveau permet de coder une partie du signal, et de calculer la quantité d'énergie du signal.

### 1.C.3. Techniques d'analyse de la variabilité du rythme cardiaque

La variation du cycle des intervalles R-R est modulée par la respiration, le baroréflexe, et des interactions environnementales médiées par le SNA. Les enregistrements de longue durée (plus de 24h) permettent d'évaluer les variations du SNA au cours du nyctémère chez les sujets sains et malades. Les enregistrements de courte durée (5 à 15 minutes) permettent de mettre en évidence les modifications du SNA en rapport avec une intervention extérieure modifiant l'état physiologique, comme le stress, la douleur, des médicaments ou un état pathologique. Les méthodes de quantification de l'HRV comportent différents types d'analyse : temporelle,

spectrale, géométrique et non linéaires notamment. S'y ajoute le baroreflex sensitivity comme quantificateur de l'HRV (3).

*a. Méthodes temporelles*

Les mesures sont réalisées sur les intervalles de temps Normal-to-Normal (NN) qui séparent 2 ondes R produites sur un rythme sinusal. Ces intervalles forment une suite NN, et sont mesurée sur l'ensemble de l'enregistrement. Le **Tableau 1.C.3.a** résume les analyses les plus fréquemment réalisées.

**Tableau 1.C.3.a.** Mesures temporelles

Type d'analyse	Méthode de calcul
SDNN	Déviati on standard des intervalles NN
SDANN	Déviati on standard des intervalles NN moyennés sur 5 minutes
ASDNN	Moyenne sur 24h des déviati ons standards des intervalles NN sur tous les segments de 5 minutes
RMSSD	Racine carré de la moyenne des carrés des différences entre intervalles NN successifs
NN50	Nombre des intervalles NN différant de plus de 50ms de l'intervalle précédant
pNN50	Pourcentage des intervalles NN différant de plus de 50ms de l'intervalle précédant

D'autres méthodes d'analyse temporelle de l'HRV ont été spécifiquement développées pour l'analyse du rythme cardiaque fœtal (RCF), notamment, les variabilités à court et long terme (VCT et VLT) (27). Ces méthodes sont appliquées sur la série R-R ré échantillonnée à 4 Hz. Une valeur moyenne de la FC pour chaque époque de 3.75 s est calculée. La VCT analyse les différences de FC moyenne entre 2 époques successives sur un intervalle d'une minute (soit 16 époques). La VCT représente alors la moyenne de la valeur absolue de ces différences divisée par 2. En pratique, une valeur de VCT < 3ms est considérée pathologique en dehors du travail

(28). La VLT analyse la différence entre les valeurs minimales et maximales des moyennes des différentes époques sur un intervalle d'une minute.

*b. Méthode spectrale*

L'analyse de densité spectrale fournit une information dont la puissance, c'est-à-dire la variance de la série R-R, est distribuée entre les différentes zones de fréquence identifiées, très basse fréquence (very low-frequency: VLF), basse fréquence (low-frequency: LF) et haute fréquence (high-frequency: HF). Ils existent 2 grandes catégories de mesures pour l'analyse de densité spectrale : les non paramétriques et les paramétriques.

Les **techniques non paramétriques** permettent d'obtenir le spectre de l'HRV simplement et rapidement. Les algorithmes pour ce type d'analyse utilisent en effet la transformées de Fourier (**Figure 1.C.3.b**). Par contre, ce type d'analyse spectrale nécessite que le signal soit stationnaire, c'est-à-dire si ces caractéristiques sont invariants au cours du temps (10). Certaines méthodes d'analyse spectrale plus récente, comme la transformée en ondelette type Daubechies 4 coefficients, permettent de s'affranchir de cette non stationnarité (cf infra).

Sur des enregistrements d'ECG de 5 minutes, il est possible de distinguer 2 composantes principales :

- Les **LF (0.04 - 0.15 Hz)** influencés par le système  $\Sigma$ , le système para $\Sigma$  et le baroréflexe.

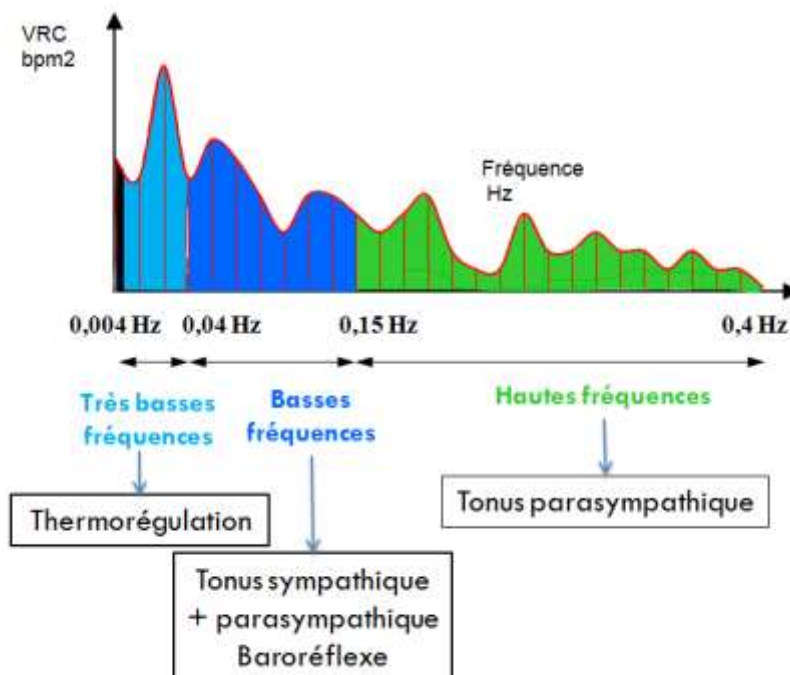
- Les **HF (0.15 - 0.4 Hz)** reflétant la modulation respiratoire du rythme cardiaque (arythmie respiratoire) par le système para $\Sigma$ . Lorsque la fréquence respiratoire change, la fréquence centrale du pic spectrale HF se modifie également et se superpose sur la fréquence respiratoire.



• Il est possible d'analyser les valeurs normalisées (**LFn.u.** et **KFn.u.**) définies par :

- $HFn.u. = HF/(HF+LF)$
- $LFn.u. = LF/(HF+LF)$
- $HFn.u. + LFn.u. = 1$

Des mesures spectrales enregistrées sur des périodes plus longues, de quelques heures à 24h, permettent de mesurer une bande de très basse fréquence, **VLF (0.0033 – 0.04Hz)**, et ultra basse fréquence, **ULF (<0.003Hz)**. Les VLF sont influencées principalement par la thermorégulation. La majorité des puissances spectrales sur des enregistrements longs est représentée par les ULF et VLF à 90%.



**Figure 1.C.3.b.** Fréquences de fluctuation de la fréquence cardiaque. L'aire sous la courbe de chaque fréquence correspond à l'amplitude de chaque fluctuation présente dans le rythme cardiaque de base (figure du CIC-IT)

Les techniques paramétriques comme l'Auto Regressive Moving Average (ARMA) peut s'utiliser sur des échantillons de petite taille, mais l'inconvénient majeur vient de la nécessité de vérifier la validité du modèle sur le signal et sa complexité.

*c. Correspondance entre les méthodes temporelles et spectrales*

Chaque mesure spectrale réalisée sur 24h à un équivalent dans le domaine temporel. Le **Tableau 1.C.3.c** présente ces équivalences.

**Tableau 1.C.3.c.** Mesures corrélés dans les domaines temporel et fréquentiel.

<b>Domaine temporel</b>	<b>Domaine fréquentiel</b>
SDNN	Spectre total
SDANN, VLT	LF
ASDNN	VLF
pNN50, RMSSD, VCT	HF

*d. Autres méthodes d'analyse*

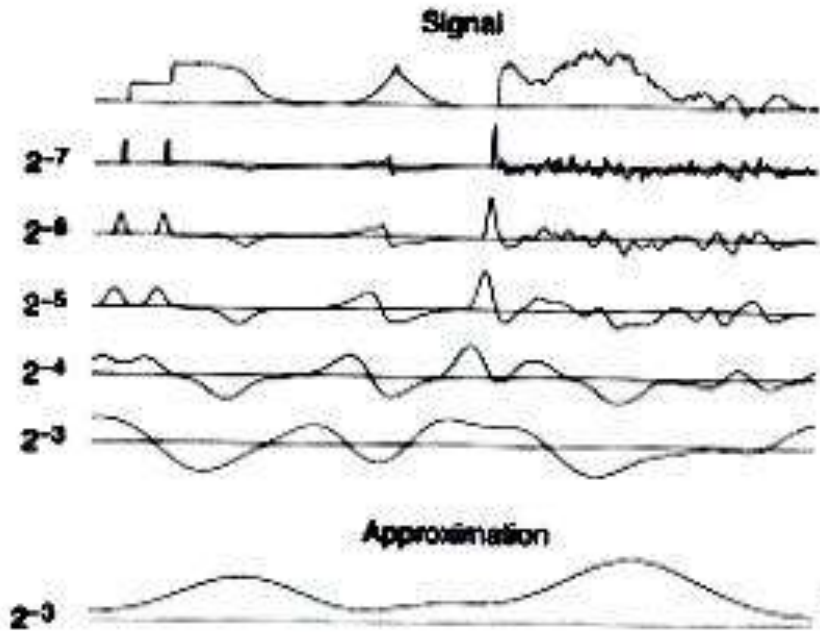
Parmi les autres méthodes d'analyse de l'HRV, il existe les **méthodes géométriques** et les **méthodes non linéaires**.

Afin de rendre moins sensible les méthodes d'analyse aux battements ectopiques et aux erreurs de détection, l' « HRV triangular index » a été développé (méthode linéaire), par lequel des histogrammes sont formés à partir des intervalles NN, avec création par la suite d'un triangle adaptée à chaque histogramme par la méthode des moindres carrés. L' « HRV triangular index » est fortement corrélé avec SDNN.

Les méthodes non linéaires ont, quant à elles, pour but de quantifier la structure et la complexité des séries R-R. Nous pouvons citer l'indice  $\alpha_1$ , le « Poincaré plot » et l'« Heart rate turbulence ».

#### **1.C.4. Transformée en Ondelettes (29)**

L'analyse par ondelettes est différente des techniques précédentes d'analyse du signal. La capacité principale des ondelettes réside dans l'analyse du contenu fréquentiel du signal au cours du temps, alors que la transformée de Fourier perd le repérage temporel des événements qui surviennent dans la fenêtre analysée. En cas de modification de la fréquence d'un phénomène dans la fenêtre temporelle analysée, la différence entre ces 2 méthodes de traitement du signal est parlante. Un phénomène enregistré avec une fréquence  $F_1$  sur la première moitié de la fenêtre et une fréquence  $F_2$  sur la seconde moitié sera analysé comme présentant une coexistence des 2 phénomènes en cas d'application de la transformée de Fourier, avec 2 raies de puissance spectrale autour de  $F_1$  et de  $F_2$ . De ce fait, l'information temporelle sera perdue dans l'analyse. La transformée en ondelettes de ce même signal codera la ressemblance du premier phénomène avec l'ondelette « mère » sur un niveau d'analyse  $N_1$ , puis celle du second phénomène sur un autre niveau  $N_2$ . Le périodogramme temps fréquence qui synthétisera l'analyse, correspondant au diagramme des coefficients d'ondelettes établi en fonction du temps, montrera l'évolution temporelle des 2 phénomènes en parallèle de leur contenu fréquentiel (**Figure 1.C.4.a**).



**Figure 1.C.4.a.** Transformée en ondelette calculée aux échelles  $2^{-7} < 2^i < 2^{-3}$ . Analyse des hautes fréquences (échelle  $2^{-7}$ ) vers les basses fréquences (échelle  $2^{-3}$ ). A chaque étape de l'analyse, la taille du vecteur est divisée par 2. L'approximation à l'échelle  $2^{-3}$  contient ce qui n'a pas été extrait du signal, c'est-à-dire les fréquences inférieures à  $2^{-3}$ .

## D. Applications cliniques

### 1.D.1. L'Analgesia Nociception Index

Depuis les travaux de Jeanne et al., qui, en étudiant les variations des contenus spectraux HF et LF sur un modèle de simulation, a montré que la sensibilité de l'analyse spectrale aux changements d'amplitude et de fréquence du signal pouvait être une explication à l'importante variabilité inter et intra individuelle de ce genre de méthode d'analyse de l'HRV, une nouvelle méthode de traitement original du signal R-R a été développée permettant de s'affranchir de ces variations. Cette nouvelle méthode permettait d'obtenir un indice de la balance analgésie/nociception : l'**ANI (Analgesia Nociception Index)** (30).

L'ANI est obtenu à partir du signal ECG. La série R-R est rééchantillonnée à 8 Hz (soit  $>4z$ ) et isolée dans une fenêtre de 64 secondes afin de conserver une bonne

résolution fréquentielle permettant une séparation des zones LF et HF. Premièrement, la moyenne des intervalles R-R de la fenêtre est calculée selon la formule :

$$M = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (RR_i)$$

- $RR_i$  représente la valeur instantanée de l'échantillon
- $N$  le nombre total d'échantillon de la fenêtre.

Le signal est ensuite centré sur cette moyenne pour éliminer l'influence de la FC basale, selon la formule :

$$RR'_i = RR_i - M$$

Deuxièmement, le signal est normalisé afin de réduire l'amplitude globale des variations, avec calcul de la norme  $S$  selon la formule :

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^N (RR'_i)^2}$$

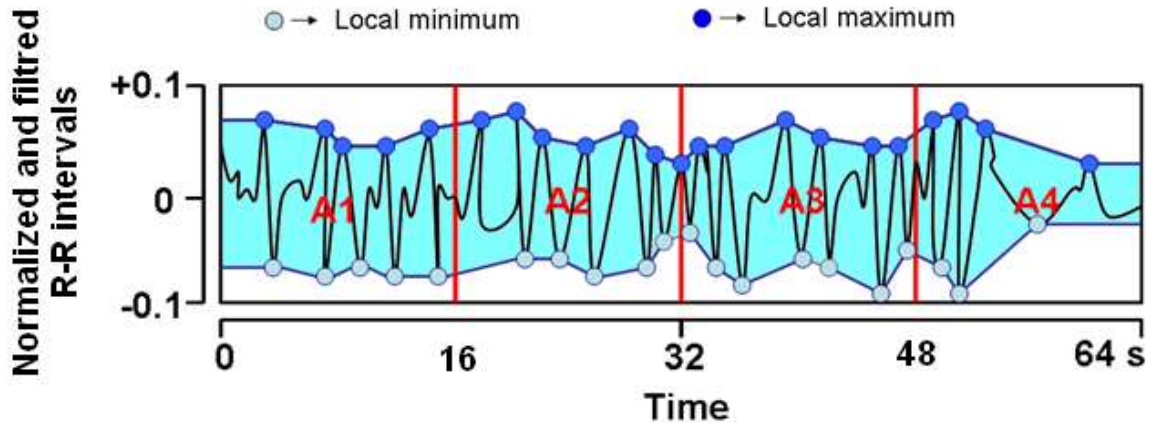
Chaque échantillon est par la suite divisé par la norme  $S$  selon la formule :

$$RR''_i = \frac{RR'_i}{S}$$

La série  $RR''$  normalisée est alors filtrée entre 0.15 et 0.4 Hz à l'aide d'un filtre passe bande basé sur l'utilisation d'une ondelette de Daubechies à 4 coefficients, afin de ne garder que les oscillations hautes fréquences, significatives du tonus para $\Sigma$ . Dans le but d'éliminer l'influence de la fréquence de ces oscillations, une aire sous la courbe de l'enveloppe du signal est calculée. Pour cela, les minimums et maximum locaux sont détectés et les enveloppes supérieures et inférieures sont tracées. Afin d'accroître la sensibilité temporelle de la méthode, la fenêtre est divisée en 4 sous

fenêtre et 4 aires sous la courbe des enveloppes sont calculées (A1, A2, A3 et A4) (**Figure 1.D.1.a**). AUCmin est alors définie comme la valeur minimum de ces 4 aires :

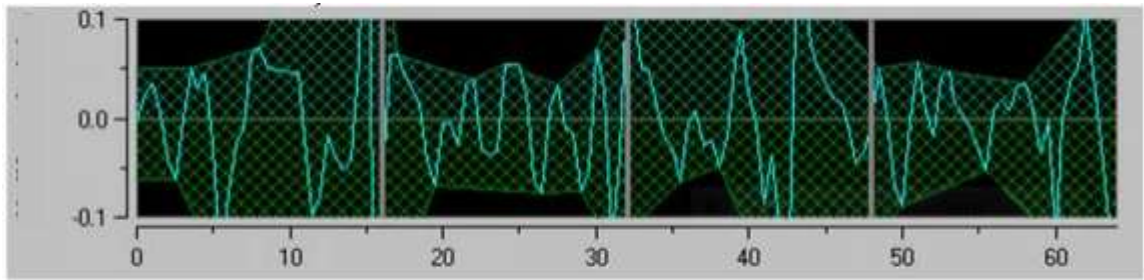
$$\text{AUCmin} = \min(A1, A2, A3, A4)$$



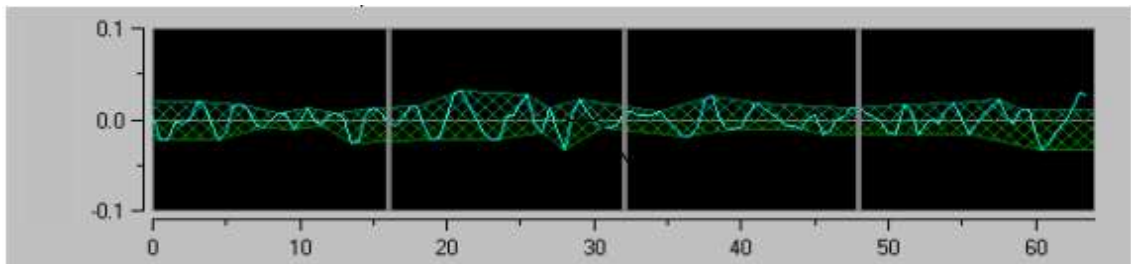
**Figure 1.D.1.a.** Série R-R filtrée et normalisée (courbe noire). Les aires A1, A2, A3, et A4 sont calculées entre les enveloppes supérieure et inférieure (aires en bleu). La plus petite aire est alors sélectionnée (A4). (Figure du CIC-IT).

L'ANI est défini comme  $100 \times (a \times \text{AUCmin} + b) / 12.8$ , où  $a = 5.1$  et  $b = 1.2$  ont été déterminés de manière empirique sur plus de 200 séries R-R issues d'anesthésie générale dans le but de conserver une bonne cohérence entre l'indice numérique et la représentation graphique de la série R-R normalisée et filtrée (**Figure 1.D.1.b**). L'analyse continue de l'ANI est rendue possible par décalage successive de la fenêtre d'analyse (fenêtre « glissante ») avec un pas de 1 s. Le moniteur donne une valeur de l'ANI, comprise entre 0 et 100, correspondant à la composante  $\text{para}\Sigma$  du SNA. Plus la valeur de l'ANI est élevée, plus la composante  $\text{para}\Sigma$  est importante.

a)



b)



**Figure 1.D.1.b.** Séries R-R normalisées et filtrées en cas de variabilité de la fréquence cardiaque élevée (a) ou faible (b).

Chez la patients adultes, l'ANI a montré son efficacité dans plusieurs études en anesthésie, permettant par exemple de détecter la nociception en étant meilleur que les paramètres hémodynamiques habituels (FC et pression artérielle) (31) ; permettant d'affiner la titration des opioïdes en évitant les sous ou surdosage (32) ; prédictif de la réponse hémodynamique liée à une douleur peropératoire (33).

Dans la population pédiatrique, sous anesthésie, le score de l'ANI permet de détecter un échec d'anesthésie locorégionale (34) ; l'ANI décroît après une stimulation douloureuse pendant une chirurgie, de façon plus marquée avec des plus petites doses de Remifentanyl (35).

### **1.D.2. Le Newborn Infant Parasympathetic Evaluation**

La mise en évidence que l'analyse de l'HRV chez le nouveau-né permettait d'évaluer son inconfort et sa douleur en post-opératoire (36), l'algorithme de l'ANI a été adapté aux particularités de cette population. Ainsi, un nouvel algorithme a été développé pour détecter les battements cardiaques spécifiques adaptés à la morphologie de l'ECG néonatal. La zone de filtrage haute fréquence a été élargie afin d'analyser les variations haute fréquences représentatives des fréquences ventilatoires plus élevées (entre 0.15 et 3 Hz soit entre 9 et 180 cycles/min). Un nouvel indice a donc vu le jour, le **NIFE (Newborn Infant Parasympathetic Evaluation)**. Il existe deux valeurs mesurées :

- Le NIFE moyenné, calculé sur 20 minutes, relatif au confort global du nouveau-né ainsi qu'à la douleur prolongée.
- Le NIFE instantané, calculé sur 3 minutes, relatif à la douleur aiguë pendant les soins.

Le moniteur donne une valeur comprise entre 0 et 100 correspondant à la composante  $\text{para}\Sigma$  du SNA.

### **1.D.3. Le Fetal Stress Index**

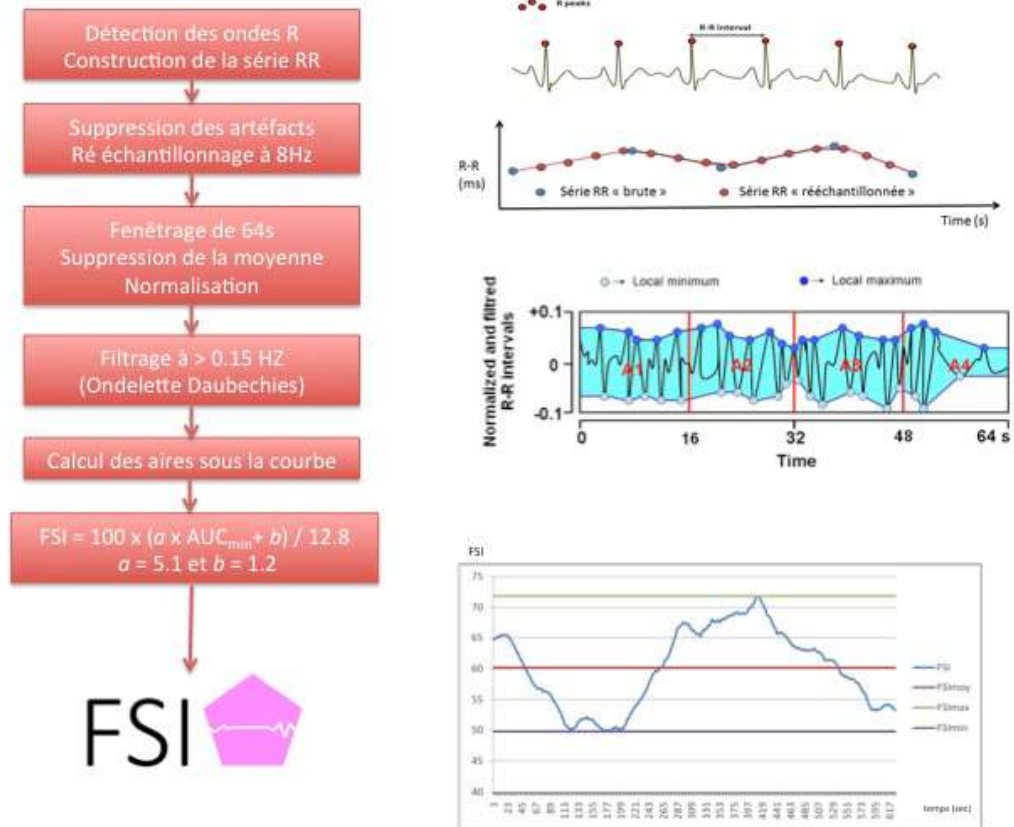
La surveillance du bien-être fœtal est un enjeu de taille afin de s'assurer des conditions de développement in utéro et de naissance optimales. Dans les conditions actuelles, cette surveillance consiste en l'utilisation d'outils non invasifs dans les cas les plus simples, représentés par le recueil des données cliniques de la mère, de trois échographies au cours de grossesse et d'un monitoring du RCF en continue pendant la phase de travail. Ce dernier est recueilli par une sonde Doppler placée sur



l'abdomen maternel et est utilisé pour caractériser l'état fœtal à la recherche de signes évocateurs de stress fœtal. L'interprétation visuelle du RCF fait l'objet de multiples classifications (37). Lors de situations franchement pathologiques ou de situation normale, son interprétation est le plus souvent simple, il peut être d'interprétation plus délicate en cas de situations intermédiaires. Ainsi, il existe des examens de seconde ligne afin de caractériser l'état du fœtus. Ces méthodes sont invasives et sont représentées par l'analyse du pH au scalp et l'analyse des lactates (38), ou l'analyse du segment ST de l'ECG fœtal (39). Ces méthodes cherchent à caractériser une acidose fœtale qui nécessiterait, dans ce cas, un accouchement rapide par césarienne ou par extraction instrumentale. Ces méthodes invasives de recherche de stress fœtal présentent un réel avantage sur l'analyse isolé du RCF, mais leurs conditions d'application les rendent parfois inutilisables ou inadaptés. En effet il s'agit d'examens invasifs et nécessitent une patiente en travail, une dilatation cervicale entamée, une présentation fœtale céphalique et des membranes amniotiques rompues (40).

Plusieurs publications ont montré une modification de l'HRV du fœtus pendant le travail, c'est-à-dire en situation d'hypoxie fœtale. Siira et al. ont ainsi montré que lors de la dernière heure du travail, les LF et les HF augmentaient chez tous les foetus (n=334), puis diminuaient proche de la naissance chez les fœtus dont le pH à la naissance était inférieur à 7,05 (41). Ils ont aussi évalué les variations en cas de pH in utero et ont montré une augmentation de l'HRV dans le groupe  $\text{pH} < 7,20$  (42). Van Laar et al. ont trouvé eux des résultats discordants avec une hausse des LFn.u. et une baisse des HFn.u. en cas de  $\text{pH} < 7,05$  à la naissance (43). Un nouvel algorithme de détection des battements cardiaques, spécifique de la morphologie de l'ECG fœtal, a ainsi été développé, le FSI. Comme pour le NIPE, la zone de filtrage haute fréquence a été élargie pour permettre d'analyser des variations hautes fréquences plus élevées

(entre 0.15 et 3 Hz soit entre 9 et 180 cycles/min). Comme pour le NIPE et l'ANI, la valeur obtenue est comprise entre 0 et 100 correspondant à la composante  $\text{para}\Sigma$  du SNA. Les étapes du développement du FSI sont résumées sur la **Figure 1.D.3**.



**Figure 1.D.3.** Etapes du calcul du FSI.

Il existe 2 mesures de FSI :

- Le FSI moyenné calculé sur une période de 20 minutes.
- Le FSI instantané calculé sur une période de 3 minutes.

Le FSI a fait l'objet de plusieurs publications. Il a été montré que c'était un indice ayant une variabilité inter individuelle moindre et une meilleure détection des modifications du système  $\text{para}\Sigma$  que les méthodes classiquement utilisées (44). De

plus, le FSI était corrélé à l'acidose métabolique sur un modèle de brebis gestante (44,45).

## E. Problématiques posées

1) Le FSI semble prometteur pour évaluer l'état acidobasique du fœtus dans un model mimant les contractions utérines provoquant des décélérations de la FC fœtale, et l'hypoxie résultante. Le FSI, étant un indicateur de l'activité  $\text{para}\Sigma$ , est corrélé à l'acidose métabolique hypoxique. Alors que l'ANI et le NIPE diminuent lors de phénomènes douloureux ou de stress physiologique, le FSI s'accroît en cas de souffrance fœtale. Les mécanismes provoquant cette augmentation du FSI pourraient s'expliquer par la présence de variations (décélérations ou accélérations) brutales de la FC, perturbant les algorithmes mathématiques de calcul et provoquant une sous-estimation des contenus spectraux (44). Ainsi, les diminutions des HF mesurées par Chung et al. et Siira et al. au cours de la dernière heure de travail (incluant donc les efforts expulsifs) pourraient s'expliquer par une augmentation des phénomènes de ralentissement/accélération en amplitude et en nombre (41,46). Ghesquière et al. avaient montré que l'activité du système nerveux  $\text{para}\Sigma$  augmenté durant l'acidose et pouvait être mesuré par le FSI (45). Les mécanismes par lesquelles les bradycardies apparaissent lors du travail ne sont uniformément démontrés. Le rôle du SNA est prépondérant dans l'apparition de ces décélérations mais le rôle relatif et l'activité des branches  $\Sigma$  et  $\text{para}\Sigma$  durant ces ralentissements brutaux ne sont pas clairement admis.

2) L'administration de thérapeutiques maternelles pendant le travail peut avoir des conséquences sur le fœtus, notamment sur la variabilité du rythme cardiaque fœtal. La surveillance fœtale étant basé principalement sur les variations du rythme cardiaque fœtal, il est nécessaire de connaître tous les facteurs pouvant modifier ce rythme. L'étude de l'HRV fœtal par les méthodes exposées précédemment permettra d'avoir accès au SNA du fœtus et son fonctionnement.

3) Le NIPE a été développé pour les nouveau-nés hospitalisés en réanimation néonatale. L'efficacité de l'ANI est prouvée pour les enfants sous anesthésie générale, afin de surveiller leur balance analgésie/nociception. L'extension de l'étude du système nerveux autonome en pédiatrie, comme moniteur de suivi de cette balance analgésie/nociception, n'est pas encore démontré pour les enfants hospitalisés en réanimation pédiatrique.

## 2. MODELE D'ETUDE EXPERIMENTALE CHEZ LE FŒTUS DE BREBIS

### A. Description du modèle animal

Le protocole expérimental a été effectué au sein du Département Hospitalier et Universitaire de Recherche Expérimentale (DHURE) de la Faculté de Médecine de Lille (agrément N°59 286). Les animaux provenaient de l'Institut Régional de la Recherche Agronomique (race INRA 401), domaine de Bressonvilliers. L'anesthésie, le protocole chirurgical et les expérimentations étaient en accord avec les recommandations du Ministère de l'Education Supérieure et de la Recherche ainsi que du ministère de l'Agriculture. Les études expérimentales ont été approuvées par le Comité d'Ethique d'Expérimentation Animale (CEEA75 #2015120811341994 et CEEA75 #2016121312148878). Le paragraphe suivant décrit les modalités anesthésiques et les différentes techniques chirurgicales utilisées en fonction des protocoles.

- *Premier temps opératoire*

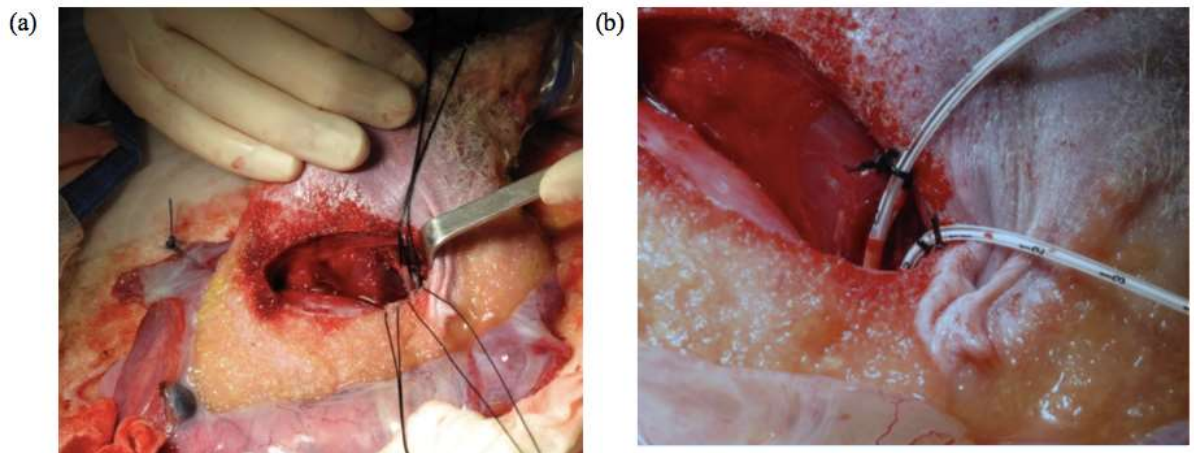
Les brebis ont été opérées à 123 jours de gestation (+/-2 jours) pour un terme de 145 jours après un jeûne préalable de 24 heures. Elles bénéficiaient d'une prémédication par une injection de 0,3ml de xylazine (Sedaxylan®, CEVA Santé animale, Libourne, France) puis ventilées au masque par des gaz halogénés (Isoflurane, Aerrane®, Baxter, Maurepas, France). Une intubation par une sonde endotrachéale n°9 permettait une ventilation assistée durant le geste chirurgical et assurait l'entretien de la sédation par les gaz halogénés. Une sonde nasogastrique était mise en place pour diminuer le risque d'inhalation peropératoire. Une

antibioprophylaxie était assurée par l'injection intramusculaire d'amoxicilline (Clamoxyl® LA, Pfizer, France) 0,5ml le jour de l'intervention et 48 heures après. Un cathéter veineux central de 7Fr de diamètre (Blue FlexTip®, ARROW, USA) était mis en place en préopératoire via la veine jugulaire droite. Dans des conditions d'asepsie chirurgicale, une laparotomie médiane était réalisée. La palpation utérine permettait de confirmer le nombre de fœtus, leur présentation et la position des cotylédons (unité fonctionnelle placentaire chez la brebis). Une hystérotomie dirigée sur environ 10 cm était réalisée au bistouri électrique. Après amniotomie, les membranes étaient fixées au myomètre et à la paroi maternelle pour améliorer l'exposition et éviter l'extériorisation des cotylédons.

- *Mise en place des prothèses*

Les pattes antérieures fœtales étaient extériorisées. Une anesthésie locale fœtale était réalisée par l'injection sous-cutanée de 2ml de Chlorhydrate de Lidocaïne à 20mg/1ml (Xylocaïne®, Astrazeneca, Reuil-malmaison, France) associée à une analgésie fœtale par une injection intramusculaire de 0,2ml de Buprénorphine (Vetergésic®, ChampionAlosté, USA). Sur une première patte, par une incision axillaire, les vaisseaux axillaires étaient abordés pour placer un cathéter artériel de diamètre 4 Fr (Arrow, USA) dans l'artère axillaire jusqu'à l'aorte, et un cathéter veineux de diamètre 4 Fr (Arrow, USA) dans la veine axillaire, jusqu'à la veine cave supérieure. Sur la seconde patte, un second cathéter artériel de 4 Fr (Arrow, USA) était inséré dans l'artère axillaire. Les cathéters étaient, au préalable, purgés au sérum hépariné (10UI/ml), et raccordés à des prolongateurs afin de pouvoir les extérioriser jusqu'au flanc de la brebis (**Figure 2.A.a**). Les cathéters artériels permettaient l'enregistrement

des paramètres hémodynamiques et les prélèvements sanguins artériels, et le cathéter veineux les prélèvements sanguins veineux et les injections intraveineuses.

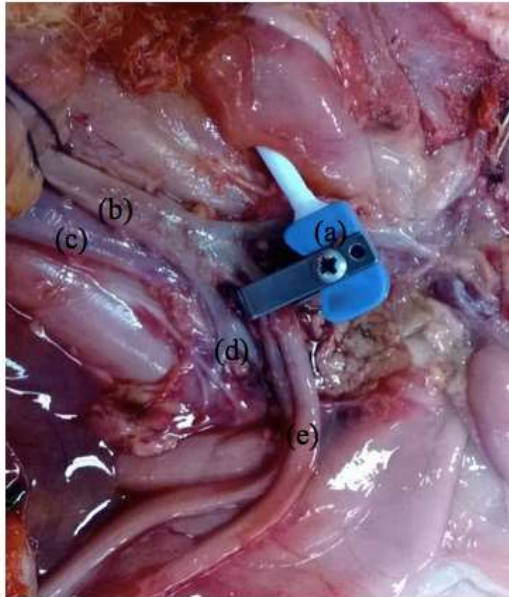


**Figure 2.A.a.** Vue per opératoire de l'abord fémoral de la patte arrière gauche du fœtus : dissection de l'artère et de la veine fémorales (a) et mise en place des cathéters artériel et veineux (b).

- *Mise en place de la sonde Doppler*

Une sonde Doppler (Perivascular flowprobe PS series T402 Transonic Systems Inc®, Ithaca, NY) était mise en place, via un abord rétro péritonéal, au niveau de l'artère ombilicale commune (union des deux artères ombilicales s'abouchant au niveau de la portion terminale de l'aorte, au niveau de la bifurcation iliaque), particularité anatomique ovine. La qualité du signal était testée en peropératoire (**Figure 2.A.b**).



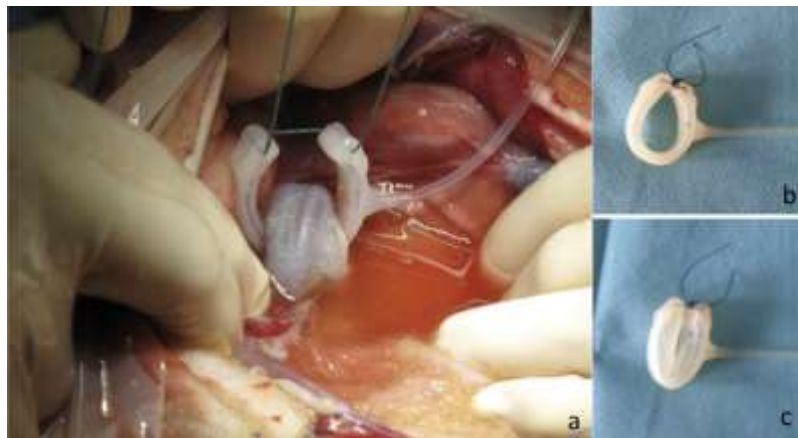


- (a) Sonde Doppler
- (b) Aorte
- (c) Veine cave inférieure
- (d) Bifurcation iliaque
- (e) Artères ombilicales

**Figure 2.A.b.** Positionnement de la sonde Doppler autour des vaisseaux.

- *Mise en place de l'occluteur*

Le cordon ombilical du fœtus était abordé afin de placer autour de celui-ci un occluteur relié à un prolongateur permettant d'effectuer la compression cordonale par injection de sérum physiologique (OC16 - In Vivo Metric - Healdsburg, California). Le volume maximal injectable pour obtenir une occlusion totale était testé avant la mise en place (**Figure 2.A.c**).



**Figure 2.A.c.** Mise en place de l'occluteur au niveau du cordon ombilical (a). Test préalable du volume injectable nécessaire à une occlusion complète (b et c).

- *Mise en place des électrodes ECG*

A partir de la seconde partie de ces expérimentations, la FC n'était plus obtenue à partir de la sonde Doppler mais à partir d'un ECG fœtal. Quatre électrodes (MYWIRE 10, MAQUET, Allemagne) précordiales étaient placées au niveau des muscles intercostaux pour recueil d'un signal ECG. Le signal ECG était testé en peropératoire. L'ECG fœtal était récupéré via la station d'acquisition PhysioTrace (47) développé par le laboratoire INSERM CIC-IT 1403. Cette station permet l'acquisition et l'enregistrement des ECG via la sortie analogique des scopes multiparamétrique (Merlin, Hewlett Packard). Les ECG ainsi enregistrés étaient traités *a posteriori* à l'aide des algorithmes décrits précédemment et adaptés aux particularités du signal cardiaque fœtal.

- *Dernière étape chirurgicale*

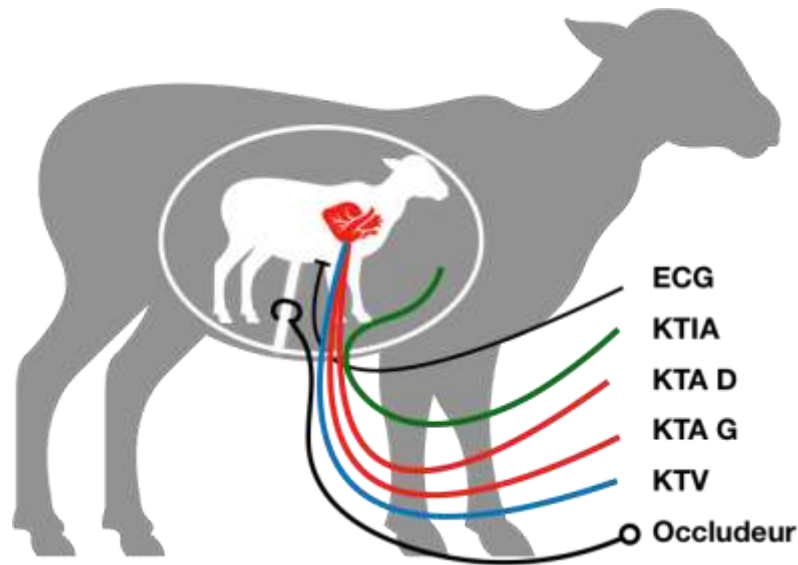
Le fœtus était replacé dans l'utérus. Avant la fermeture utérine, un cathéter de 5Fr de diamètre (Arrow, USA) était placé dans la cavité amniotique pour mesurer la pression de référence (Pression intra-amniotique, PIA), permettant également de réaliser avant la fermeture complète de l'utérus une amnio-infusion de 500mg d'Amoxicilline-Acide Clavulanique (Amoxicilline-Acide Clavulanique SANDOZ®, Sandoz, Levallois-Perret, France) dilué dans 250 ml de sérum physiologique. L'utérus et l'aponévrose abdominale étaient refermés. Les cathéters fœtaux et intra-amniotique étaient reliés à des prolongateurs. L'ensemble des prolongateurs, des électrodes et du Doppler étaient extériorisés au niveau du flanc droit de la brebis après tunnélisation sous-cutanée. L'ensemble de ces éléments était regroupé dans des gants stériles et rangés dans une poche plastifiée suturée à la peau au niveau de la sortie de

tunnélisation dans le but d'éviter toute contamination potentielle, et de pouvoir assurer la liberté de mouvement de la brebis en dehors des manipulations (**Figure 2.A.d**). Dans le même temps opératoire, un cathéter (Cathlon IV - JELCO) était placé au niveau de l'artère auriculaire postérieure de l'oreille droite de la brebis.

- *Soins post-opératoires*

Après la chirurgie, les brebis étaient autorisées à boire et manger, elles se levaient au bout de 2 heures environ. La perméabilité des cathéters fœtaux et de la voie jugulaire maternelle était entretenue par une injection quotidienne de sérum salé isotonique hépariné 10UI/ml (Héparine CHOAY® 500UI/ml, Sanofi-Aventis France, Paris). L'analgésie post-opératoire était assurée par une injection intra-veineuse maternelle de 3,5ml de Buprénorphine 24 heures et 48 heures après l'intervention. L'expérimentation débutait 48 heures après l'intervention afin que le fœtus soit stable avant l'expérimentation.

A la fin de chaque protocole et en cas de décès du fœtus, de mise en travail de la brebis ou de mauvais état maternel, les brebis étaient sacrifiées par une injection intra veineuse d'un anesthésique vétérinaire : 0,3 ml/kg de T61® intervet (Embutramide 20g, Mebezonium iodure 5g, Tetracaine Chlorhydrate 0.5g, Diméthyl Formamide 60ml). Une autopsie permettait de vérifier la position des cathéters et de rechercher, en cas de décès du fœtus, les causes de celui-ci. Les agneaux étaient pesés lors des autopsies ou de la mise bas. L'arrêt du protocole expérimental n'était réalisé qu'en cas de mise en travail de la brebis et/ou de mauvais état maternel.



**Figure 2.A.d.** Schéma de l'instrumentation chronique du fœtus. Électrodes d'électrocardiographie (ECG), cathéter artériel axillaire droit (KTA D) et gauche (KTA G), cathéter veineux axillaire (KTV), cathéter intra-amniotique (KTIA) et Occluteur de cordon.

## B. Mesure des paramètres hémodynamiques

Le cathéter artériel fœtal et le cathéter intra-amniotique étaient connectés à des capteurs de pression (Pressure Monitoring Kit, Baxter) reliés à un moniteur de pression (Merlin monitor, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). La pression artérielle moyenne (PAM) était mesurée à partir du signal phasique de la pression artérielle observée et référencée à la pression intra-amniotique (PIA) :  $PAM \text{ calculée} = PAM \text{ observée} - PIA \text{ observée}$ .

La sonde Doppler était reliée à un débitmètre calibré (TS420, Transonics Systems Inc®, Ithaca, NY) permettant un enregistrement continu de la courbe de débit dans l'artère ombilicale commune. Toutes les données hémodynamiques, le débit dans l'artère ombilicale ainsi que l'ECG fœtal étaient enregistrées sur un support informatique grâce au logiciel Physiotrace® (Estaris monitoring, Lille, France) (47) (**Figure 2.A.e**).

### C. Mesure des paramètres biologiques fœtaux

Un prélèvement de 0,2 ml de sang veineux fœtal était réalisé en début et fin de chaque protocole. Une mesure du pH, de la pression partielle de gaz carbonique ( $\text{PaCO}_2$ ), de la pression partielle en oxygène ( $\text{PaO}_2$ ), des Base Excess (BE), des bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) et des lactates était réalisée par micro méthode sur un pHmètre Hlstadt®, cartouches G4 (Abbott laboratoires®, Abbott Park, III, USA).



**Figure 2.A.e.** Enregistrement des paramètres hémodynamiques fœtaux.

### **3. Rôles des systèmes parasympathique et sympathique dans la réponse hémodynamique à une brève occlusion du cordon ombilical chez le fœtus de brebis**

Ce travail est actuellement en cours de révision dans la revue *PloS One* (Annexe 1)

#### **A. Introduction**

Pendant le travail, les enregistrements du RCF sont le seul outil non invasif qui permet de surveiller en permanence le bien-être du fœtus pendant l'accouchement. La connaissance et la compréhension de la physiologie du fœtus sont nécessaires pour interpréter les enregistrements du RCF (48,49). Les décélérations associées aux contractions utérines sont la composante la plus courante et la plus distinctive du RCF (50,51). Le rôle du SNA dans la régulation du RCF et de la PAM pendant les contractions utérines pour maintenir une perfusion optimale des organes est bien établi (6,50,52). La FC est contrôlée par l'activité parasympathique des récepteurs muscariniques M2 des cellules cardiaques et par l'activité sympathique médiée par les récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques des cellules du stimulateur cardiaque (6). Cependant, les activités parasympathique et sympathique à différents périodes, pendant et après les décélérations, restent controversés (50,53,54). Une meilleure compréhension de la séquence de l'activité du SNA pendant les décélérations pourrait aider à déchiffrer quels réflexes sont impliqués (55).

Des modèles expérimentaux ont montré qu'une brève occlusion du cordon ombilical induit une décélération du RCF aiguë et une augmentation de la PAM, suivie d'une augmentation du RCF lorsque l'occlusion a été levée (6,56). Cela peut se produire pendant le travail en cas de procidence du cordon. Nous avons émis l'hypothèse que les changements du RCF pendant et après une brève occlusion cordonale dépendaient de l'activation séquentielle des deux branches du SNA.

## **B. Objectifs**

En utilisant les médicaments du blocage cholinergique et  $\beta$ 1-adrénergique, nous avons cherché à déterminer les rôles des systèmes nerveux parasympathique et sympathique dans les changements du RCF et de la PAM pendant l'occlusion cordonale chez les fœtus de moutons.

## **C. Méthodologie**

Quinze brebis enceinte de type « Ile-de-France » (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, France) ont subi une hystérectomie sous anesthésie générale selon la procédure décrite au chapitre 2. Le modèle est tel que celui décrit auparavant avec mise en place de cathéters axillaires artériels et veineux et d'électrodes ECG sur le fœtus afin de recueillir les R-R.

### *Schéma expérimental*

Les expérimentations ont débuté quatre jours après l'intervention. Un protocole a été testé par jour pour permettre la récupération du fœtus. Quatre protocoles ont été conçus pour évaluer les mécanismes impliqués dans la décélération du RCF : occlusion cordonale sans injection de drogues (protocole de contrôle, n=9) ; occlusion cordonale après blocage parasympathique par une injection d'atropine (n=8) ; occlusion cordonale après blocage  $\beta$ -adrénergique par une injection de propranolol (n=7) ; et occlusion cordonale après blocage parasympathique et  $\beta$ -adrénergique à la fois par l'atropine et le propranolol (atropine-propranolol ; n=7). Le protocole de contrôle a été réalisé en premier, et l'ordre des autres protocoles a été randomisé

(paquet "Blockrand" pour le logiciel R). Les concentrations de médicaments ont été établies, selon les travaux précédents, comme suit : 2,5 mg de sulfate d'atropine (2,5 mg/2,5 ml ; Atropine ; Aguetant, Lyon, France) et 5 mg de chlorhydrate de propranolol (5 mg/5 ml de propranolol ; Karnodyl ; Primius Lab Ltd, Londres, Royaume-Uni) (6,44). Les deux ont été administrés sous forme de bolus 5 minutes avant la première occlusion. Pour tenir compte de la variabilité intra-individuelle de la réponse hémodynamique aux occlusions, chaque expérience a consisté en trois occlusions pendant 1 minute avec une période de récupération de 4 minutes entre chaque occlusion, comme décrit précédemment (6,44,57). Avant l'injection, une période initiale de 30 minutes, appelée période de stabilité, a été enregistrée. L'occlusion totale a été obtenue par un gonflage rapide et complet de l'occluseur à l'aide d'une solution saline. Si la brebis ou le fœtus décédaient ou si des problèmes survenaient pendant les expériences, des brebis supplémentaires étaient incluses pour garantir un minimum de sept expériences par protocole. À la fin de l'étude, les brebis étaient euthanasiées par une injection d'embutramide (T61® ; Intervet, Beacouze, France) et les fœtus étaient pesés.

#### *Paramètres hémodynamiques fœtaux et prélèvements sanguins*

La FC, la PAM et la PIA (IntelliVue MX700 ; Philips, Eindhoven, Pays-Bas) ont été contrôlés et enregistrés en continu à l'aide d'une carte d'acquisition de données (Physiotrace© ; Estaris Monitoring, Lille, France) pendant la période d'étude (47). La PAM fait référence à la pression dans la cavité amniotique (PAM = PAM observée - PIA observée). Nous avons défini six points temporels, dont la moyenne a été calculée sur 10 secondes, pour comparer la FC et la PAM à la ligne de base : juste avant l'occlusion (ligne de base) ; puis à 10, 30, 60, 120 et 300 secondes après le début de



l'occlusion. Notez que l'occlusion n'a été arrêtée qu'après 60 secondes, ce qui signifie que les mesures de 120 et 300 secondes ont été effectuées respectivement à 60 et 240 secondes après la fin de celle-ci. Les variations en pourcentage de la FC et de la PAM par rapport à la valeur de référence ont été calculées comme suit (valeur du point temporel - valeur de référence)  $\times$  100 / valeur de référence, et ont été décrites comme "variation de la FC" et "variation de la PAM", respectivement. On a ensuite calculé la moyenne des valeurs de FC, de PAM, de variation de FC et de PAM pendant l'occlusion pour tenir compte de la variabilité intra-individuelle de la réponse hémodynamique. Dans le cas de valeurs aberrantes dues à des problèmes techniques, ces valeurs n'ont pas été prises en compte lors de l'analyse. Les gaz du sang (pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>) et les concentrations de lactate dans le plasma ont été mesurés à partir d'échantillons de sang prélevés dans l'aorte ascendante au départ, avant la perfusion de la drogue, puis ajustés à la température physiologique de 39°C de la brebis (i-Stat Handheld® ; Abbott Laboratories, Washington, DC, USA). En outre, pour obtenir les gaz du sang (pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>) et les concentrations de lactate dans le plasma juste avant l'occlusion et à 30 secondes sans modifier l'hémodynamique, nous avons effectué cinq occlusions d'une minute sur cinq autres brebis avant de les utiliser dans un autre protocole de recherche. Par conséquent, des analyses des gaz du sang et la mesure de la concentration de lactate dans le plasma ont été effectuées chez ces cinq autres brebis.

### *Analyse statistique*

Les résultats sont présentés sous forme de médiane [intervalle interquartile ; du premier au troisième interquartile]. Pour comparer les valeurs à différents moments pour chaque protocole, un test de Friedman non paramétrique a été effectué pour les mesures répétées. Lorsqu'une signification statistique a été trouvée entre les points

temporels, des comparaisons post hoc ont été effectuées en utilisant un test non paramétrique des signes de Wilcoxon avec correction de Bonferroni. Pour comparer les protocoles à chaque point temporel, un test de Kruskal-Wallis a été effectué. Lorsque des résultats statistiquement significatifs ont été trouvés, un test de Dunn a été effectué pour comparer chaque protocole. Des valeurs de  $p < 0,05$  ont été considérées comme indiquant une différence significative. Dans chaque expérience,  $n$  représente le nombre de protocoles étudiés. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R version 3.4.1 disponible en ligne.

## **D. Résultats**

Quinze brebis ont été opérées.

### ***Paramètres hémodynamiques (Figures 3.a et 3.b)***

#### ***Avant les occlusions cordonales***

Avant l'injection du médicament, les gaz sanguins artériels fœtaux de base (pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>), les concentrations plasmatiques de lactate et les paramètres hémodynamiques fœtaux (FC, PAM) ne différaient pas entre les protocoles (**Tableau 3.a**). Le poids des fœtus était similaire dans chaque protocole. Après l'injection et avant l'occlusion cordonale, la FC fœtale était plus élevée dans le protocole atropine par ( $p < 0,001$ ), et plus basse dans le protocole propranolol ( $p < 0,001$ ). La PAM était la même quel que soit le médicament administré.

**Tableau 3.a.** Gaz du sang artériels fœtaux et paramètres fœtaux avant l'occlusion.

	Control	Atropine	Propranolol	Atropine- propranolol	Valeurs de p
Nombre de protocoles	9	8	7	7	
<b>Gaz du sang</b>					
pH	7.39 [7.37-7.40]	7.39 [7.39-7.40]	7.38 [7.37-7.40]	7.39 [7.37-7.41]	0.83
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	46 [43-47]	47 [42-48]	4 [42-48]	45 [41-46]	0.99
pO <sub>2</sub> (mmHg)	18 [17-20]	18 [17-21]	18 [15-20]	21 [18-21]	0.93
Lactates (mmol/L)	1.6 [1.6-1.9]	1.6 [1.2-2.1]	1.7 [1.3-2.9]	1.5 [1.1-1.8]	0.40
<b>Paramètres fœtaux</b>					
Poids (kg)	3.5 [3.1-4.0]	3.2 [3.1-3.9]	3.4 [3.1-3.9]	3.2 [3.1-3.8]	0.60
<b>Fréquence</b>					
cardiaque avant l'injection	164 [159-169]	171 [168-178]	153 [150-164]	165 [158-174]	0.11
cardiaque avant l'occlusion	162 [153-173]	209 [192-236]*	130 [119-148]*	172 [161-179]	<b>&lt;0.001</b>

Les données sont exprimées en médiane [Premier quartile-Troisième quartile]. Valeurs de p : test de Kruskal-Wallis. \* p<0,005 : Test de Dunn avec correction de Bonferroni (comparé au contrôle).

### ***Pendant les occlusions cordonales (Figures 3.a et 3.b)***

#### **Protocole contrôle**

L'occlusion était associée à une bradycardie et une hypertension rapide (p<0,0001).

#### **Protocole atropine**

La FC a lentement diminué pendant l'occlusion (p<0,01), tandis que la PAM était plus élevée que celle du début (p<0,0001). La variation de la FC était

significativement plus faible avec le protocole atropine qu'avec le protocole contrôle ( $p < 0,0001$ ). La variation de la PAM était similaire entre le protocole atropine et le protocole contrôle.

#### Protocole propranolol

Une bradycardie s'est produite par rapport à la période pré-occlusive ( $p < 0,0001$ ), tandis que la PAM était similaire à la ligne de base. Les variations de FC étaient similaires entre les protocoles propranolol et contrôle. Les variations de la PAM étaient plus faibles après 30 secondes avec le protocole propranolol qu'avec le protocole contrôle ( $p < 0,05$ ).

#### Protocole atropine - propranolol

La FC a diminué progressivement pendant l'occlusion ( $p < 0,0001$ ), alors que la PAM a augmenté ( $p < 0,001$ ). Les variations de FC étaient similaires entre les protocoles atropine-propranolol et atropine mais étaient significativement plus faibles avec le protocole atropine-propranolol qu'avec le protocole contrôle ( $p < 0,0001$ ). La variation de la FC était plus faible avec le protocole atropine-propranolol qu'avec le protocole propranolol ( $p < 0,0001$ ). La variation de la PAM était similaire entre les protocoles atropine-propranolol et contrôle, et avec le protocole propranolol.

### ***Après les occlusions cordoniales (Figures 3.a et 3.b)***

#### Protocole contrôle

La FC est progressivement revenue à des niveaux proches de la ligne de base ; la PAM est restée élevée pendant la première partie de la reprise.

#### Protocole atropine

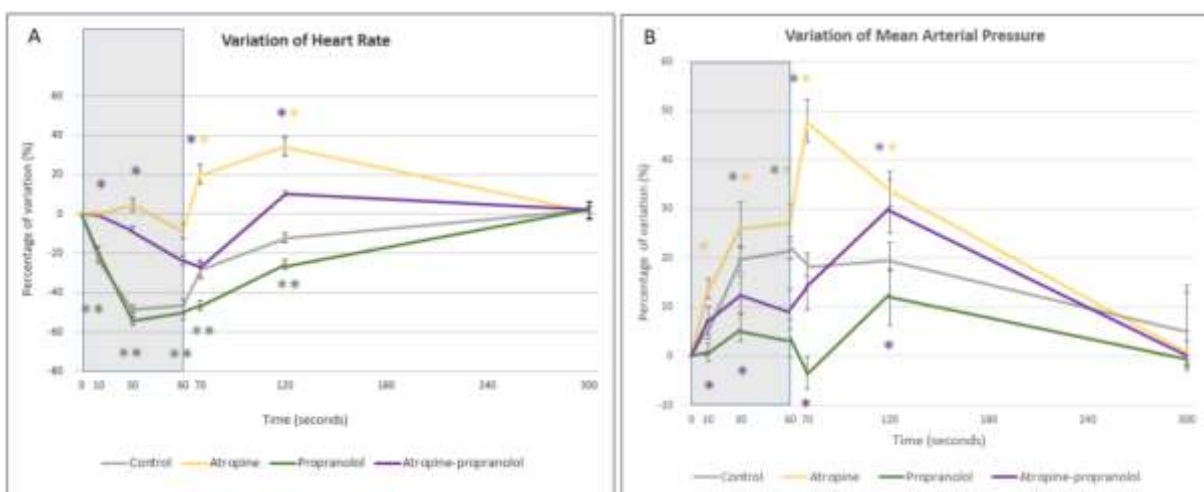
La FC est progressivement revenue à la ligne de base après un pic post-occlusion. La PAM est restée élevée puis est progressivement revenue au niveau de base. Immédiatement après la libération de l'occlusion, le changement de la PAM était plus important avec le protocole atropine qu'avec le protocole contrôle ( $p < 0,01$ ).

#### Protocole propranolol

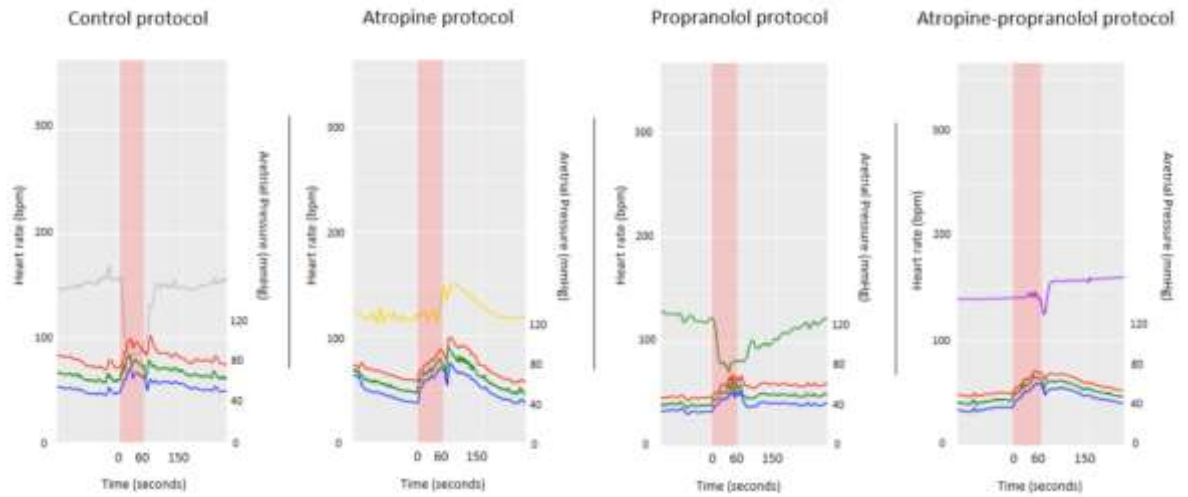
La FC est progressivement revenue au niveau de base, tandis que la PAM a toujours été similaire au niveau de base. Immédiatement après la libération de l'occlusion, le changement de FC était plus faible avec le protocole propranolol qu'avec le protocole contrôle ( $p < 0,05$ ).

#### Protocole atropine - propranolol

La FC est progressivement revenue au niveau de base. La PAM est restée élevée et est progressivement revenue au niveau de base. L'évolution de la PAM a été similaire entre les protocoles atropine-propranolol et contrôle.



**Figure 3.a.** Evolution de la FC (A) et de la MAP (B) en pourcentage de variation pendant (zone grisée) et après l'occlusion.



**Figure 3.b.** Exemples de tracé de variation de la FC et de la PAM pour les 4 protocoles pendant (zone rose) et après l'occlusion.

Les variations de FC et de PAM pendant et après l'occlusion du cordon sont décrites dans les **tableaux 3.b et 3.c.**

**Tableau 3.b.** Variations en pourcentage de la FC pendant et après l'occlusion cordonale.

A	OCCLUSION (secondes depuis le début de l'occlusion)		
	10s	30s	60s
<b>PROTOCOLE</b>			
<b>Contrôle</b>	-18 [(-34) - (-12)]	-53 [(-42) - (-81)]	-49 [(-38) - (-79)]
<b>Atropine</b>	-2 [(-3) - 1]*	7 [(-16) - 18]*	-11 [(-53) - 4]*
<b>Propranolol</b>	-21 [(-23) - (-9)]	-55 [(-50) - (-74)]	-51 [(-35) - (-79)]
<b>Atropine-propranolol</b>	-1 [(-1) - 0]*	-7 [(-2) - (-32)]*	-27 [(-53) - 4]*
<b>p-value (Kruskal-Wallis)</b>	<0.0001	<0.0001	<0.0001
B	POST OCCLUSION (secondes depuis le début de l'occlusion)		
	70s	120s	300s
<b>PROTOCOLE</b>			
<b>Contrôle</b>	-30 [(-39) - (-23)]	-11 [(-27) - (-2)]	2 [(-7) - 6]
<b>Atropine</b>	25 [14 - 35]*	32 [25 - 39]*	5 [(-12) - 8]
<b>Propranolol</b>	-47 [(-54) - (-38)]*	-19 [(-49) - (-15)]	0 [(-12) - 10]
<b>Atropine-propranolol</b>	-33 [(-43) - (-10)]	8 [0 - 13]*	8 [(-1) - 11]
<b>p-value (Kruskal-Wallis)</b>	<0.001	<0.0001	>0.05

Les données sont exprimées en médiane [Premier quartile-Troisième quartile]. \* p<0,005 : comparé au protocole contrôle.

**Tableau 3.c.** Variations en pourcentage de la PAM pendant et après l'occlusion cordonale.

A	OCCLUSION (secondes depuis le début de l'occlusion)		
	10s	30s	60s
<b>PROTOCOLE</b>			
<b>Contrôle</b>	7 [1 - 11]	20 [(-5) - 28]	26 [(-3) - 30]
<b>Atropine</b>	12 [6 - 21]	27 [0 - 38]	28 [(-32) - 42]
<b>Propranolol</b>	0 [(-2) - 4]	4 [(-19) - 16]*	1 [(-33) - 15]*
<b>Atropine-propranolol</b>	7 [5 - 13]	10 [(-31) - 27]	10 [(-37) - 17]
<b>p-value (Kruskal-Wallis)</b>	<0.0001	<0.01	<0.0001
B	POST OCCLUSION (secondes depuis le début de l'occlusion)		
	70s	120s	300s
<b>PROTOCOLE</b>			
<b>Contrôle</b>	18 [8 - 27]	19 [(-13) - 33]	4 [(-6) - 8]
<b>Atropine</b>	50 [38 - 61]*	33 [(-9) - 48]	1 [(-6) - 8]
<b>Propranolol</b>	-3 [(-9) - 1]*	8 [(-20) - 16]*	0 [(-13) - 20]
<b>Atropine-propranolol</b>	9 [0 - 24]	31 [(-11) - 41]	1 [(-17) - 25]
<b>p-value (Kruskal-Wallis)</b>	<0.0001	<0.0001	>0.05

Les données sont exprimées en médiane [Premier quartile-Troisième quartile]. \* p<0,005 : comparé au protocole contrôle.

### ***Paramètres biologiques fœtaux***

Les gaz du sang (pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>) et les concentrations plasmatiques de lactate n'ont pas changé de manière significative entre la période pré occlusion et après 30 secondes d'occlusion avec le protocole contrôle (**Tableau 3.d**). Les fœtus du protocole contrôle ont présenté une décélération et une hypertension pendant l'occlusion du cordon (à 10 secondes : variation de la FC, -18 [(-18) - (-17)] % et variations de la PAM, 9 [6 - 12] % ; à 30 secondes : variation de la FC, -46 [(-55) - (-17)] % et variation de la PAM, 27 [17-27] %).

**Tableau 3.d.** Evolution des gaz du sang entre la ligne de base et à 30 secondes per occlusion

<b>Gaz du sang</b>	<b>Pré-occlusion</b>	<b>30 s per-occlusion</b>	<b>p-value</b>
pH	7.36 (7.36-7.37)	7.37 (7.37-7.37)	0.38
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	47.4 (44.5-48.1)	42.8 (42.4-44.1)	0.06
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	21 (21-23)	21 (20-22)	0.85
Lactates (mmol/L)	1.46 (1.43-1.49)	1.32 (1.29-1.34)	0.13

Les données sont exprimées en médiane [Premier quartile-Troisième quartile]. Valeurs de p : test non paramétrique de Wilcoxon.

## **E. Discussion**

La décélération est fréquente pendant le travail et reflète la compensation fœtale en réponse à l'hypoxie pendant les contractions utérines (49). La présente étude examine notre compréhension de l'adaptation cardiovasculaire du fœtus et du rôle du SNA pendant une minute d'occlusion cordonale complète et pendant la période de récupération.

Nos résultats décrivent le rôle respectif du système parasympathique et de l'activité des  $\beta$ -adréno-récepteurs du myocarde pendant et après une brève mais complète occlusion du cordon. La compression du cordon induit une chute rapide de



la FC fœtale qui est la plus importante 30 secondes après le début de la compression du cordon. La diminution de la FC fœtale est secondaire à une augmentation de l'activité parasympathique, car l'atropine a supprimé la réponse de la FC à l'occlusion du cordon. L'activité des  $\beta$ -adréno-récepteurs du myocarde n'est pas impliquée dans la baisse de la FC pendant la période d'occlusion, car le propranolol n'a pas modifié la réponse de la FC à l'occlusion du cordon. Ceci est également confirmé par des valeurs de FC similaires dans les protocoles atropine versus atropine-propranolol.

Après avoir arrêté l'occlusion, la FC était encore inférieure à celui de base en raison d'un ton parasympathique soutenu. La suppression du tonus parasympathique dans le système cardiovasculaire révèle une augmentation de la FC au-dessus des valeurs de base. La FC plus faible avec le protocole propranolol-atropine qu'avec le protocole atropine seule soutient en outre une augmentation de la stimulation des récepteurs adrénergiques  $\beta$  du myocarde après la libération de l'occlusion du cordon. Quatre minutes après la libération de l'occlusion, la FC est revenue aux valeurs de base, quels que soient les médicaments perfusés, montrant ainsi une récupération du contrôle du SNA.

Pris ensemble, ces résultats indiquent que la réponse hémodynamique brève et complète induite par une occlusion cordonale résulte principalement de l'activation aiguë du système parasympathique et sympathique. La réponse hémodynamique précoce n'est pas liée aux changements de  $\text{PaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$  ou du pH artériel. Après la libération de l'occlusion, le tonus parasympathique était élevé et les récepteurs adrénergiques myocardiques  $\beta$  étaient stimulés dans les 60 premières secondes. Par conséquent, nos données confirment que pendant l'occlusion complète, le rôle clé du tonus parasympathique est de contrôler la FC, et le rôle clé du tonus sympathique est

de contrôler la PAM. Cependant, pendant l'occlusion d'une minute, nous n'avons trouvé aucun effet dû au tonus sympathique dans le contrôle de la FC et aucun changement dans les gaz sanguins du fœtus.

Lear et al. ont étudié la physiologie des décélérations du rythme cardiaque et l'implication de plusieurs réflexes (50). L'activation du chémoréflexe peut entraîner une décélération de la FC et une augmentation de la PAM via les chémorécepteurs périphériques (corps carotidien) et centraux, qui augmentent les activités sympathiques et parasympathiques (58). Le chémoréflexe est déclenché par la diminution de la PaO<sub>2</sub> ou du pH, ou par une augmentation de la PaCO<sub>2</sub> (58,59). Cependant, des études expérimentales d'asphyxie brève et répétée chez des fœtus de mouton n'ont jamais montré une diminution immédiate significative de la PaO<sub>2</sub> ou du pH, ou une augmentation de la PaCO<sub>2</sub> au début de la première occlusion ; elle n'est survenue qu'après quelques minutes d'asphyxie (6,52,60,61). Nos résultats ne soutiennent pas l'activation du chémoréflexe comme cause de la décélération de la FC et de l'augmentation de la PAM, au moins pendant la première phase d'une minute induite par l'occlusion. Cela est dû au fait que le sang a été prélevé à partir du cathéter placé dans l'aorte ascendante, c'est-à-dire en amont du corps carotidien ou des chémorécepteurs centraux, et nous n'avons pas observé de changements dans les gaz du sang artériel et la concentration de lactate du plasma à 30 secondes d'occlusion. Des études antérieures ont souligné que l'activation des chémorécepteurs est retardée de 6 secondes après que le corps carotidien ou les chémorécepteurs centraux ont détecté un changement de pH, de PaO<sub>2</sub> ou de PaCO<sub>2</sub> [59,62]. Cela retarde encore l'activation éventuelle du chémoréflexe lorsque les chémorécepteurs ont détecté un changement dans les gaz du sang. Dans l'étude de Künzel, la saturation fœtale a diminué pendant l'occlusion complète du cordon (63). Cependant,

contrairement à notre étude, les cathéters artériels ont été placés dans l'aorte descendante, qui est située après le canal artériel. Lear et al. ont montré que l'oxygénation cérébrale, mesurée comme la différence entre l'oxyhémoglobine et la désoxyhémoglobine, a diminué parallèlement à la FC jusqu'au nadir de celle-ci (64). De plus, des études précédentes ont rapporté que le principal stimulus des chémorécepteurs périphériques au niveau de la carotide est la baisse de la teneur en PaO<sub>2</sub> plutôt qu'en O<sub>2</sub> (qui est déterminée par la concentration d'hémoglobine et sa saturation) (62). La PaO<sub>2</sub> n'a pas changé pendant les 30 premières secondes de l'occlusion. Il est donc probable que la diminution de l'oxygénation résulte principalement de la baisse de la précharge cardiaque induite par l'occlusion. En effet, l'oxygénation peut diminuer malgré l'absence de changement de la PaO<sub>2</sub> pré ductale par une baisse du débit cardiaque. De plus, on ne peut exclure que la PaO<sub>2</sub> post ductale puisse diminuer plus tôt que la PaO<sub>2</sub> pré ductale, car le flux sanguin du ventricule droit dépend moins du flux sanguin ombilical que celui du ventricule gauche. Pendant une minute d'occlusion, nous n'avons vu aucune preuve d'un changement de l'activité myocardique des  $\beta$ -adrénergiques sur la FC. Lear et al. ont également constaté que la FC était significativement plus faible dans le groupe propranolol pendant les trois occlusions et les périodes d'inter-occlusion (65). De plus, Galinsky et al. ont montré une différence de décélération entre le groupe témoin et le groupe propranolol (6). Cependant, la procédure expérimentale était différente, puisque le cordon ombilical était occlus pendant 2 minutes. Dans l'étude de Galinsky, la différence de FC entre les deux groupes se produit principalement après la première minute de l'occlusion ou après des occlusions successives. Cependant, dans les deux études, les valeurs de base de la FC étaient différentes entre le protocole contrôle et le protocole propranolol. Dans notre étude, la FC a été exprimée en pourcentage de

changement par rapport au niveau de référence pour comparer les changements du FC entre les groupes, plutôt qu'en valeurs absolues de FC. Nos données prouvent que les changements de FC pendant l'occlusion d'une minute ne sont pas influencés par l'activité des adrénorécepteurs  $\beta_1$  au moins à 10, 30 et 60 secondes. Lear et al. ont souligné que l'activation sympathique a des effets limités sur la FC pendant les épisodes répétés de bref occlusion, indiquant que la régulation de la FC peut être due à d'autres stimuli, tels que les catécholamines surrénales (56). Cette conclusion est conforme à nos résultats, montrant des réponses similaires de la FC pendant 1 min d'occlusion avec ou sans  $\beta_1$ -blocage des adrénorécepteurs. Nous n'avons pas mesuré les catécholamines sanguines. Il est prouvé que les concentrations plasmatiques de catécholamines surrénales augmentent après une occlusion cordonale de 2 minutes (52). Cependant, la cinétique de la libération des catécholamines par les surrénales pendant l'occlusion est inconnue. Par conséquent, le rôle des catécholamines surrénaliens sur la FC est actuellement incertain, au moins pendant la première minute. L'activation du chémoréflexe est généralement associée à une augmentation de la production sympathique pour augmenter la PAM (52,58). Galinsky et al. ont conclu, dans un modèle de sympathectomie utilisant la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) avec 2 minutes d'occlusion, que le SNA soutient la PAM pendant une exposition prolongée à une occlusion brève et répétée avec acidose métabolique. Ils ont constaté que dans le groupe 6-OHDA, seule la première occlusion était associée à une chute initiale de la PAM qui était enregistrée pendant le reste de la période d'occlusion. Par la suite, la sympathectomie a été associée à une augmentation initiale rapide de la PAM pendant l'occlusion (52). Nous n'avons pas étudié le rôle du système nerveux sympathique sur la vasoconstriction périphérique lors de l'occlusion. Dans les études de Galinsky et Lear, pendant 2 minutes d'occlusion, le blocage des adrénorécepteurs

$\beta$  n'a pas modifié la réponse de la PAM pendant la première minute d'occlusion, mais seulement pendant la deuxième minute (6,65). Ces résultats ne concordent pas avec nos conclusions. L'augmentation de la pression artérielle pendant l'occlusion peut être due à une vasoconstriction périphérique, suggérant une augmentation du tonus sympathique ou de la libération des catécholamines surrenaliens, comme les agonistes  $\alpha$ -adrénergiques. Nous pouvons spéculer que la réponse adaptative aux occlusions pendant le blocage des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par la vasoconstriction périphérique  $\alpha$ -adrénergique pourrait être la raison pour laquelle la PAM est restée stable pendant la minute d'occlusion dans notre étude. Cependant, nous n'avons pas évalué le blocage des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques dans notre étude. Par ailleurs, comme l'ont décrit Künzel et al. l'augmentation initiale de la pression artérielle peut s'expliquer par la redistribution soudaine de la fraction placentaire du débit cardiaque après une occlusion vers le flux sanguin qui a perfusé du tissu fœtal à haute résistance (63). Les effets inotropes de l'activation des récepteurs adrénergiques  $\beta_1$  peuvent être nécessaires pour soutenir l'augmentation de la pression artérielle fœtale pendant une brève occlusion. Dans ce cas, l'activation du chémoréflexe périphérique et la vasoconstriction périphérique médiée par l'activation sympathique peuvent ne pas être nécessaires pour expliquer l'augmentation initiale de la pression artérielle pendant une occlusion. Inversement, nos données suggèrent que l'activité basale des récepteurs adrénergiques  $\beta$  est impliquée dans le maintien de l'élévation de la pression artérielle pendant l'occlusion du cordon. Le rôle inotrope de l'activité myocardique  $\beta$ -adrénergique associée aux activités périphériques  $\alpha$ -adrénergiques pourrait expliquer l'augmentation de la PAM observée pendant 1 minute d'occlusion. De plus, pendant l'occlusion avec le protocole atropine, Galinsky et al. ont observé une augmentation de la PAM (6). De même, nous avons observé que la PAM augmentait à la fois avec

le protocole atropine et le protocole contrôle. Ils ont conclu que l'augmentation de la PAM dans le groupe atropine reflète le maintien de la FC et du débit ventriculaire combiné. En effet, immédiatement après la libération de l'occlusion, nous avons constaté une augmentation plus importante de la PAM avec le protocole atropine qu'avec le protocole contrôle, ce qui pourrait s'expliquer par l'augmentation de la FC et du débit ventriculaire combiné.

D'autres études ont suggéré qu'une décélération rapide pourrait résulter de l'activation du baroréflexe (49,66). Dans la présente étude, l'occlusion cordonale a induit une élévation rapide et soutenue de la PAM, qui aurait déclenché le baroréflexe. Le clampage du cordon à la naissance est considéré comme l'une des principales causes de l'élévation immédiate de la pression artérielle. La résistance vasculaire placentaire est faible par rapport aux autres tissus ; par conséquent, la suppression de la circulation placentaire augmente la résistance vasculaire systémique et entraîne une augmentation de la pression artérielle (66). Cependant, l'augmentation de la pression artérielle n'est pas nécessaire pour déclencher une décélération pendant l'occlusion, comme l'ont démontré Lear et al (50). De plus, le baroréflexe est inhibiteur du tonus sympathique (50). Par conséquent, nos résultats, ainsi que les études précédentes, ne soutiennent pas l'hypothèse que la décélération de la FC pendant une minute d'occlusion résulte de la seule activation du baroréflexe (64).

Après avoir relâché la compression du cordon, l'activité sympathique et l'activité parasympathique ont toutes deux augmenté. Soixante secondes après le relâchement du cordon, la PAM était encore plus élevée que celle de départ en raison de la stimulation soutenue des  $\beta$ -adrénorécepteurs myocardiques, que le propranolol empêchait. De plus, une augmentation du tonus parasympathique était encore

présente à ce moment-là car la pression artérielle était plus élevée après l'injection d'atropine qu'elle ne l'était chez les agneaux fœtaux témoins. Quatre minutes après l'occlusion, aucune différence de pression artérielle n'a été constatée entre les protocoles lors de l'observation de l'évolution de la FC, ce qui suggère que l'activité du SNA est revenue au niveau de base. L'activation sympathique peut indiquer une activation du chémoréflexe pendant cette période, comme le suggèrent les études précédentes (6,52). Une augmentation de l'activité sympathique peut expliquer l'augmentation soutenue de la pression sanguine malgré la libération du cordon et la restauration de la circulation placentaire à faible résistance (5,52,67). L'activation des adréno-récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  peut augmenter la vasoconstriction périphérique et le débit ventriculaire (6,52).

Nos résultats fournissent des informations supplémentaires sur le rôle du SNA pendant le travail. Des décélérations variables de la FC sont couramment observées sur le cardiogramme, qui est utilisé pour surveiller le bien-être du fœtus (48,49). Le travail est caractérisé par des épisodes intermittents et brefs d'hypoxie (pas plus de 1 à 2 minutes) pendant les contractions utérines (48,49). Ces décélérations peuvent résulter, au moins en partie, d'une compression du cordon ombilical, comme lors d'une procidence du cordon. Cependant, il est peu probable que la compression du cordon soit la cause principale des décélérations dans la majorité des travaux (53,54,55). En effet, la compression de la tête du fœtus a été signalée, par Parer et al., comme étant responsable des premiers ralentissements, en raison d'un changement transitoire du flux sanguin cérébral entraînant des pertes vagales (68). Ils émettent la théorie que l'occlusion du cordon est probablement la cause de nombreuses décélérations variables de la FC au cours de la première phase du travail actif, et que la compression de la tête est responsable des décélérations au cours de la deuxième phase du travail

(67). Cependant, Lear et al ont conclu que la compression de la tête du fœtus n'était probablement pas un facteur majeur de décélération pendant la majorité des accouchements (50,69). Cependant, comme décrit par Parer et Lear, le réflexe vagal est impliqué dans la décélération quelle que soit l'étiologie (compression du cordon ombilical ou compression de la tête ou les deux) (68,69). La compréhension de la nature des réflexes impliqués dans la décélération peut nous aider à comprendre ce qui provoque des changements dans l'homéostasie fœtale et la réponse du fœtus. L'activité sympathique est essentielle pour maintenir la vasoconstriction périphérique et la pression artérielle lors d'une compression répétée du cordon (6,56). L'activité parasympathique est impliquée dans la diminution de la FC, telle qu'elle est observée dans la pratique clinique quotidienne. La compréhension du contrôle physiologique de l'adaptation est d'une importance fondamentale pour reconnaître quand l'adaptation autonome du fœtus n'est plus efficace pour celui-ci.

Notre étude avait plusieurs limites. Premièrement, malgré les nombreuses similitudes existantes entre la gestation des moutons et celle des humains, la reproductibilité de nos observations et l'extrapolation au fœtus humain doivent être considérées avec prudence. Deuxièmement, même si l'occlusion cordonale est l'une des causes de la bradycardie fœtale, la conclusion ne peut être interprétée que dans le cas d'une occlusion complète et brève pendant le travail, en particulier lors d'une procidence du cordon. D'autres mécanismes ont été décrits, tels que la compression du placenta ou de la tête, mais les conclusions ne peuvent être extrapolées pour ces mécanismes (53,54). En outre, nous n'avons pas évalué l'effet des contractions utérines sur le début des de la FC, comme on l'a observé chez les fœtus humains, ni le rôle des contractions utérines sur la stimulation sympathique ou parasympathique pendant le travail. En effet, les contractions utérines pourraient induire une réponse



sympathique chez les fœtus pour prévenir les décélérations du rythme cardiaque, comme le montre une accélération pendant la contraction. Le fœtus de mouton n'a pas d'avertissement de l'occlusion, pas d'augmentation prémonitoire de la pression intra-utérine ni d'option de sortie sympathique anticipée. Il serait important d'illustrer ces réponses chez les animaux de laboratoire également. En outre, nous n'avons pas étudié la composante vasomotrice, qui permettrait de mieux comprendre les réflexes. En outre, avant l'occlusion, les niveaux de lactate se situaient entre 1 et 2 mmol/l. Cependant, d'autres paramètres étaient normaux, et la littérature a fait état des mêmes niveaux de lactate (70). En outre, nous n'avons pas étudié le composant vasomoteur. Nous n'avons pas réalisé le protocole avec blocage des récepteurs  $\alpha$ . De plus, nous n'avons pas tenté de distinguer les réflexes, le but était d'examiner le rôle de l'activité parasympathique et sympathique dans les changements de la FC et de la PAM pendant l'occlusion. En outre, nous avons effectué une analyse des gaz du sang pour le protocole de contrôle dans un autre groupe de brebis, afin de ne pas modifier l'hémodynamique pendant le prélèvement sanguin. Cependant, cette cohorte séparée a connu une décélération et une hypertension pendant l'occlusion du cordon. Nous n'avons constaté aucune modification des gaz sanguins, en particulier de la  $PaO_2$ . Malheureusement, nous n'avons pas mesuré la saturation en hémoglobine et la teneur en oxygène dans cette étude. Cependant, il est probable que ni la saturation en hémoglobine ni la teneur en oxygène ne changent à 30 secondes de l'occlusion car aucun des principaux facteurs impliqués dans l'équation de Severinghaus n'a changé (pH,  $PCO_2$ ) (71). Enfin, nous n'avons pas effectué de gaz du sang dans les autres protocoles, mais les gaz du sang ne sont pas modifiés par l'injection d'atropine et de propranolol, comme l'ont démontré d'autres protocoles (6,44).

## **F. Conclusion**

Cette étude a examiné le rôle de l'activité parasympathique et de l'activité sympathique pendant et après une occlusion cordonale d'une minute. Une décélération de la FC a été causée par une élévation de l'activité parasympathique, qui n'a pas été déclenchée par un changement des concentrations de gaz sanguins artériels ou une élévation de la pression artérielle. De plus, nous avons montré que l'activité myocardique des  $\beta$ -adrénorécepteurs et les changements dans les gaz du sang n'étaient pas impliqués dans cette réponse, alors que l'activité des  $\beta$ -adrénorécepteurs est impliquée dans l'augmentation de la PAM. Ces résultats indiquent qu'il est possible que le baroréflexe et le chémoréflexe ne soient pas les seuls réflexes impliqués dans la phase précoce de la décélération induite par les occlusions. Plusieurs méthodes utilisent la variabilité du FC, qui reflète le contrôle du nœud sinusal par le SNA, pour évaluer le bien-être du fœtus (72,73). D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre comment le système autonome du fœtus s'adapte au fil du temps à la diminution de la PaO<sub>2</sub> et à l'hypoxie après des occlusions cordonales répétées.

## 4. Effet de thérapeutiques maternelles sur le SNA fœtal

Ce travail est actuellement en cours de soumission dans la revue *Archives of Gynecology and Obstetrics* (Annexe 2)

### A. Introduction

Les opioïdes en injection intra-veineuse pour soulager la douleur pendant le travail ou les contractions de Braxton Hicks sont largement utilisés pour fournir une analgésie, comme alternative à l'analgésie épidurale. Dans de tels cas, la nalbuphine, un opioïde agoniste-antagoniste mixte, est couramment utilisée (75).

L'effet des opioïdes sur le rythme cardiaque fœtal a été étudié, avec une réduction de la variabilité, en utilisant des médicaments tels que la buprénorphine (76). Les opioïdes exercent leur action sur le SNA. L'analyse de la variabilité du rythme cardiaque révèle les activités des systèmes nerveux sympathique et parasympathique sur le nœud sinusal. Il existe plusieurs méthodes d'analyse de la variabilité du RCF, telles que l'analyse du domaine temporel et l'analyse spectrale comme précédemment expliqué. L'analyse temporelle comprend des indices utilisés dans la pratique clinique tels que la variation à long terme (VLT) et la variation à court terme (VCT), en particulier dans les cas de retard de croissance intra-utérine (RCIU) (77-79). Plusieurs auteurs ont démontré la capacité de l'analyse spectrale à prédire l'acidose fœtale (43,80). Nous avons développé l'indice de stress fœtal (FSI), basé sur une méthode originale d'analyse de l'HRV (44) comme précédemment expliqué. Dans des études expérimentales précédentes, nous avons montré que cet indice est plus spécifique pour les fluctuations parasympathiques que les marqueurs de la variabilité du RCF couramment utilisés, et qu'il est associé à l'acidose fœtale (44,81).

Jeanne et al. ont montré que l'injection d'opioïdes provoquait directement des changements dans la variabilité de l'HRV chez les patients adultes (82). Giannina et al. ont observé que les injections maternelles de nalbuphine diminuaient le nombre d'accélération du RCF, de la VCT et de la VLT (83). Cependant, aucune étude n'a rapporté l'effet de la nalbuphine sur divers marqueurs de l'HRV et sur les statuts hémodynamiques et gazométriques du fœtus.

## **B. Objectifs**

Evaluer l'impact des injections maternelles de Nalbuphine sur i) l'HRV fœtale (analyses temporelles et spectrales), ii) les paramètres sanguins du fœtus et iii) le statut hémodynamique du fœtus dans un modèle expérimentale fœtal.

## **C. Méthodologie**

Le modèle est tel que celui décrit auparavant avec mise en place de cathéters axillaires artériels et veineux et d'une sonde Doppler permettant le recueil du signal ECG.

### *Schéma expérimental*

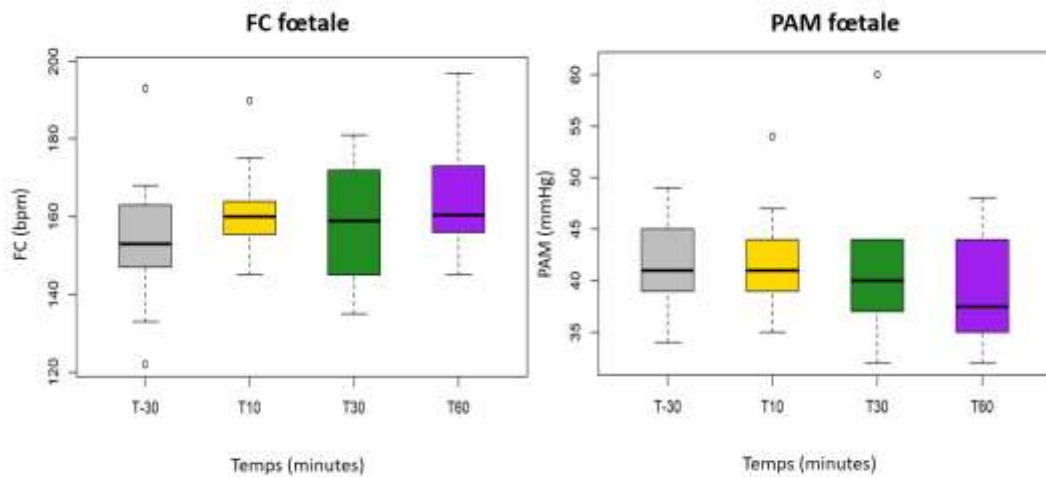
Le schéma expérimental était le suivant : après 30 minutes de stabilité hémodynamique fœtale, une injection de 20 mg de Nalbuphine était réalisée chez la brebis. Les paramètres hémodynamiques fœtaux (FC, PAM, PIA et FSI) étaient enregistrés en continue pendant le temps de l'expérimentation. La durée de chaque expérimentation était de 60 min. Quatre périodes étaient : la ligne de base à 30 min avant l'injection (T-30), 10 min après l'injection (T10), 30 min après l'injection (T30) et 60 min après l'injection (T60). Les gaz sanguins du fœtus ont été mesurés avant et à 60 et 90 min après l'injection de Nalbuphine.

### *Analyse statistique*

Un test de Friedman non paramétrique a été effectué pour les mesures répétées. Les périodes pré-injection et post-injection ont été comparées par un test non paramétrique de Wilcoxon avec correction de Bonferroni. Les paramètres hémodynamiques étaient présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SD. Les résultats étaient présentés sous la forme médiane [premier – troisième quartile] pour les mesures VCT, VLT, FL, HF, HFnu et FSI. Des valeurs de  $P < 0,05$  ont été considérées comme indiquant des différences significatives. Dans chaque expérience,  $n$  représentait le nombre de fœtus étudiés. Les données ont été gérées avec la version 3.4.1 du logiciel R disponible en ligne.

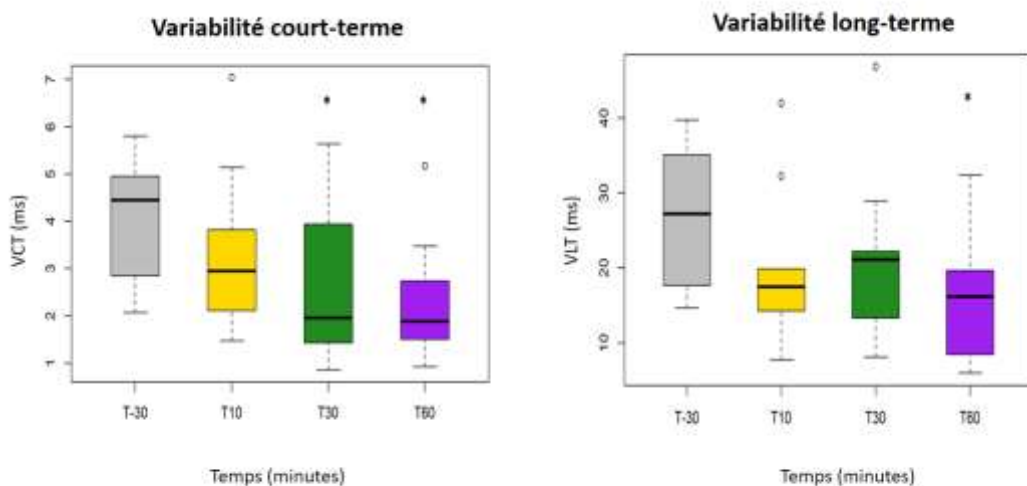
### **D. Résultats**

Quatre brebis ont été opérées, et 11 expérimentations ont été réalisées. La FC fœtale initiale était de 153 [147-161] bpm avant l'injection de Nalbuphine. Elle est passée à 159 [148-170] bpm à T30 min et à 161 [156-171] bpm à T60 min; cependant, le changement n'était pas significatif. De plus, la PAM fœtale est restée constante tout au long de l'expérimentation, passant de 41 [40-45] mm Hg avant l'injection à 40 [37-44] mm Hg à T30 min et à 38 [36-43] mm Hg à T60 min (**Figure 4.a**).



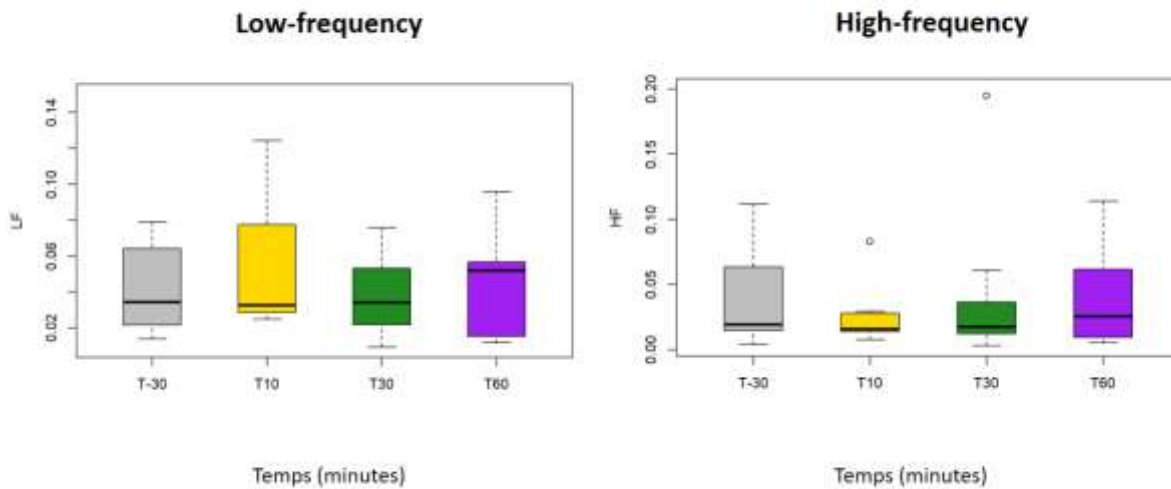
**Figure 4.a.** Evolution de la fréquence cardiaque (FC) fœtale et de la pression artérielle moyenne (PAM) après injection maternelle de Nalbuphine. \* $P < 0.05$  vs. T-30.

Cependant, la VCT fœtale a montré une diminution significative de 4,4 [2,9-4,9] ms avant l'injection de Nalbuphine à 2,0 [1,5-3,5] ms à T30 min après l'injection ( $P=0,02$ ) et à 1,9 [1,5-2,7] ms à T60 min ( $P=0,04$ ). De même, la VLT fœtale a également diminué significativement, passant de 27,2 [18,2-34,7] ms avant l'injection à 16,2 [8,9-19,6] ms à T60 min ( $P=0,02$ ) (**Figure 4.b**).

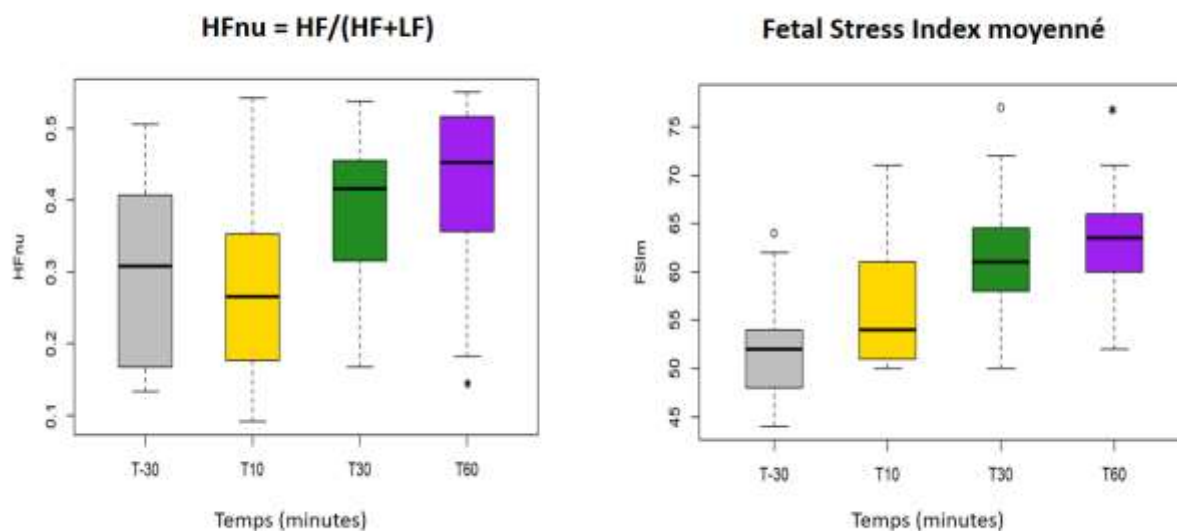


**Figure 4.b.** Evolution de la variabilité à court-terme (VCT) et à long-terme (VLT) après injection maternelle de Nalbuphine. \* $P < 0.05$  vs. T-30.

Les LF après injection sont restés stables, passant seulement de 0,034 [0,025-0,062] avant l'injection à 0,034 [0,022-0,053] à T30 min, et à 0,052 [0,020-0,056] à T60 min ( $P=0,51$ ). De même, les HF étaient stables pendant l'expérimentation, passant seulement de 0,019 [0,015-0,064] avant injection à 0,018 [0,012-0,037] à T30 min et à 0,026 [0,011-0,055] à T60 min ( $P=0,62$ ) (**Figure 4.c**). Cependant, les HFnu sont passés de 0,31 [0,17-0,39] pendant la période de stabilité à 0,42 [0,32-0,45] à T30 min ( $P=0,32$ ) et à 0,45 [0,36-0,51] à T60 min ( $P=0,004$ ). De même, le FSI a progressivement augmenté de 52,0 [48,5-53,8] pendant la période de stabilité à 61 [58-64,5] à T30 min ( $P=0,09$ ) et à 63,5 [60,5-65,8] à T60 min ( $P=0,02$ ) (**Figure 4.d**).



**Figure 4.c.** Evolution des basses fréquences (LF) et des longues fréquences (HF) après injection maternelle de Nalbuphine. \* $P < 0.05$  vs. T-30.



**Figure 5.d.** Evolution des HF normalisés (HFnu) et du Fetal Stress Index moyenné (FSIm) après injection maternelle de Nalbuphine. \* $P < 0.05$  vs. T-30.

Aucun changement des gaz du sang fœtaux n'a été observé au cours de l'expérience (**Tableau 4.1**).

**Tableau 4.1.** Evolution des gaz du sang fœtaux.

	Avant injection	60 minutes après injection	90 minutes après injection	P-value
pH	7,34±0,01	7,34±0,01	7,34±0,01	NS
pCO <sub>2</sub> (mm Hg)	32,2±2,6	36±1,7	28,3±3,3	NS
Excès de Base (mmol.L <sup>-1</sup> )	-7±1	-6±1	-8±2	NS
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol.L <sup>-1</sup> )	18,8±1,4	19,6±1,0	17±1,8	NS
Lactates (mmol.L <sup>-1</sup> )	0,9±0,2	0,8±0,2	0,7±0,2	NS

NS: non significatif.



## E. Discussion

Dans cette étude, l'injection de Nalbuphine n'a pas influencé les paramètres hémodynamiques et gazométriques du fœtus. Cependant, elle a modifié plusieurs indices de variabilité du rythme cardiaque du fœtus : La VCT et la VLT ont diminué après l'injection de Nalbuphine, tandis que les HFn.u. et le FSI ont augmenté. Les modifications des indices HRV n'étaient pas liées à l'acidose mais aux fluctuations de l'activité du SNA causées par les opioïdes.

Nicolle et al. ont montré un transfert fœto-maternel de Nalbuphine avec un aplatissement de la variabilité du rythme cardiaque chez 54% des fœtus, 5 min après une injection intraveineuse ou 15 min après une injection intramusculaire (84). La Nalbuphine est un médicament couramment utilisé chez les femmes enceintes au début du travail ou en cas de contractions de Braxton Hicks. Il s'agit d'un morphinique agoniste-antagoniste qui agit sur un récepteur opioïde sélectif  $\mu$ , sans effets tératogènes (85,86). La mesure des concentrations de Nalbuphine dans le sang du cordon ombilical a montré que ce médicament peut traverser la barrière placentaire et entrer dans la circulation fœtale (87,88). Les effets cardiovasculaires d'un opioïde sélectif  $\mu$  ont été étudiés chez le fœtus de brebis. Holsey et al. ont étudié les effets sur le fœtus de l'administration de Tyrosine-D-arginine-phénylalanine-lysine-NH<sub>2</sub>, un agoniste opioïde  $\mu$ -sélectif. Des doses bolus intraveineuses de 0,1 à 0,5 mg/kg administrées directement au fœtus ont montré une augmentation de l'HRV fœtal mais aucun changement de la pression sanguine fœtale. L'augmentation de la variabilité cardiaque a été bloquée par la Naloxone et le bêta-bloquant (89). Sherer et al. ont décrit un cas de résolution d'une tachycardie fœtale après l'injection intraveineuse maternelle de Nalbuphine, où le fœtus est passé d'un état d'éveil à un état de sommeil après l'injection (90). Guillonnet et al. ont décrit une bradycardie

foetale après l'injection maternelle de 10 mg de Nalbuphine et une réduction de la variabilité cardiaque (91). L'effet hémodynamique de la Nalbuphine peut être variable compte tenu des divers résultats publiés dans la littérature (92,93). Cependant, dans le cas de l'injection maternelle, on peut observer une tendance à la baisse de la FC. Dans notre étude, la FC n'a pas été modifiée malgré l'administration de 20 mg de Nalbuphine, ce qui est le double de la dose utilisée par Guillonnet et al. Kopecky et al. ont montré la capacité des opiacés à provoquer une vasoconstriction du placenta et du système vasculaire ombilical, avec des modifications de la vitesse Doppler de l'artère ombilicale (94). De plus, selon Holsey et al, une injection directe d'un agoniste opioïde au fœtus ne modifie pas la pression artérielle foetale (89). Nous n'avons pas évalué la vitesse de circulation de l'artère ombilicale, bien que nous ayons montré que l'injection maternelle de Nalbuphine ne modifiait pas la pression artérielle foetale ; ce résultat concorde avec celui observé par Hosley et al. En outre, nous n'avons pas observé de modifications de l'échange gazeux placentaire.

L'évaluation du bien-être du fœtus est actuellement basée sur l'analyse de la variabilité cardiaque du fœtus. Une diminution des VCT et VLT après l'injection d'opioïdes a été montrée dans des études précédentes (83,90), ce qui a été confirmé par nos résultats. La VLT représentant la quantité absolue de variations de basse fréquence et la VCT la quantité absolue d'activité parasympathique, l'utilisation d'opioïdes réduit l'activité globale du SNA. En outre, nous avons démontré une augmentation du FSI et des HFn.u., qui représentent la quantité relative d'activité parasympathique par rapport à l'ensemble de la variabilité.

## **F. Conclusion**

Selon ces résultats, l'utilisation d'opioïdes peut complètement diminuer l'activité du SNA du fœtus et modifier l'équilibre entre les activités parasympathiques et sympathiques avec une prédominance des premières, ce qui explique l'augmentation du FSI et des HFn.u. Nous avons précédemment démontré que l'activité parasympathique relative augmentait en cas d'acidose fœtale (95). Ces fluctuations de l'activité autonome sont directement causées par l'effet de l'opioïde sur le SNA et ne reflètent pas l'acidose fœtale. Cette constatation est une information importante pour les obstétriciens afin de surveiller le bien-être du fœtus pendant le travail.

## 5. Utilisation du NIPE en réanimation pédiatrique

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Pediatric Critical Care Medicine* (Annexe 3).

### A. Introduction

L'évaluation de la douleur ou de l'inconfort chez les patients hospitalisés en soins intensifs reste difficile, en particulier chez les patients incapables de communiquer l'intensité de leur douleur (96). Le déséquilibre entre inconfort et sédation chez les patients pédiatriques sédatisés est souvent évalué à l'aide de paramètres physiologiques (fréquence cardiaque et pression artérielle), qui ont une faible sensibilité et spécificité pour détecter la nociception (97). Par conséquent, des échelles d'hétéro-évaluation de douleur ou d'inconfort sont utilisées pour standardiser l'évaluation de la gêne et/ou de la douleur afin d'adapter les doses thérapeutiques (98,99).

Les échelles d'évaluation de la douleur ou de l'inconfort sont largement utilisées pour chez les enfants. À titre d'exemple, l'échelle FACES consiste en une série de diagrammes linéaires des visages avec des expressions de détresse croissante et a été développée pour permettre aux enfants d'autoévaluer leur niveau de détresse. Cependant, les échelles d'autoévaluation ne peuvent pas être utilisées chez les patients sous sédatifs ou non communiquant (100,101). Le gold-standard pour l'évaluation de la douleur chez les patients sédatisés et sous ventilation mécanique dans les unités de réanimation pédiatrique était initialement l'échelle COMFORT, qui comprenait des éléments comportementaux et physiologiques (fréquence cardiaque et pression artérielle) (99-103). Cependant, les éléments relatifs à la fréquence

cardiaque et à la pression artérielle ont démontré une fiabilité et une validité très limitées en tant que déterminants du score total (103,104). Ainsi, Carnevale et al. ont développé l'échelle COMFORT Behaviour Scale (CBS) (104), qui exclut les items physiologiques et qui est maintenant recommandée pour évaluer la douleur et l'inconfort en réanimation pédiatrique (103,104). Cependant, cette méthode n'est pas continue et dépend de la formation de l'examineur et de sa capacité à utiliser cet outil clinique (101,105,106). Actuellement, il existe plusieurs dispositifs de surveillance physiologique disponibles, basés pour la plupart sur l'analyse du système nerveux autonome, pour une évaluation continue de l'inconfort et de la douleur (107,108). Cependant, l'utilisation de ces dispositifs reste faible dans la pratique clinique.

## **B. Objectifs**

Notre objectif était d'évaluer si le système NIPE pouvait être un outil utile pour la surveillance continue de l'inconfort, par rapport au Comfort Behaviour Scale (CBS), l'outil de référence d'évaluation de la douleur et de l'inconfort chez l'enfant hospitalisé en réanimation pédiatrique, chez les enfants de moins de 3 ans sédatisés et intubés lors d'interventions douloureuses. En outre, nous avons cherché à déterminer les variables hémodynamiques et les traitements reçus qui pourraient influencer les scores NIPE.

## **C. Méthodologie**

Le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique de recherche de la Société Française de Pédiatrie, France (CER-SFP 2016-030-2) on 02 November 2016 (Dr H. Chappuy).

L'étude prospective et unicentrique a été menée dans l'unité de réanimation et soin continus pédiatriques de l'hôpital Jeanne de Flandre du centre hospitalier

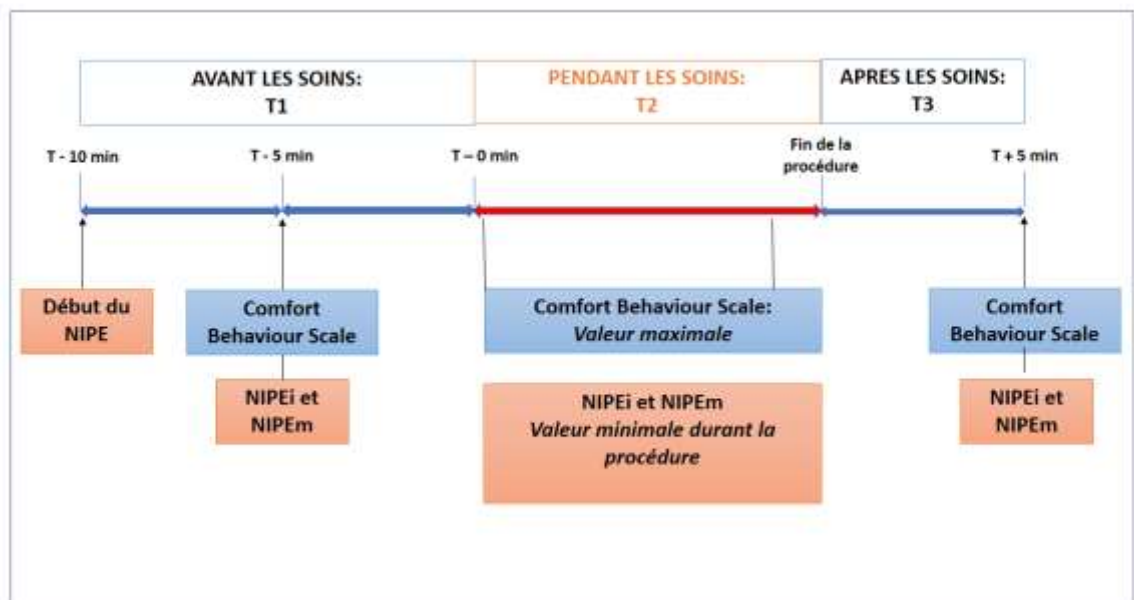
universitaire de Lille, en France, entre le 1er octobre 2017 et le 30 avril 2019. Tous les patients entre 1 mois de vie et 3 ans sous ventilation invasive étaient éligibles. Les critères d'exclusion étaient les suivants : état instable empêchant les procédures de soins prévues, décision de limitation de traitements ou conditions qui contre-indiquaient l'utilisation du NIPE (transplantation cardiaque, absence de rythme cardiaque sinusal, apnée ou fréquence respiratoire  $\leq 9$  /min, stimulateur cardiaque et utilisation d'Atropine et/ou d'Isoprénaline).

### *Réalisation de l'étude*

Après avoir obtenu le consentement des parents, les différentes procédures de soins étaient planifiées avec les infirmières, procédures qui faisaient parties des soins courants normalement donnés à ces patients ou des actes douloureux nécessaires pour la prise en charge médicale des patients. Les procédures de soins définies comprenaient le bain du patient, le changement des draps, le cathétérisme périphérique ou central (cathéters veineux et artériels), le cathétérisme vésical, l'aspiration trachéale, la ponction lombaire, l'installation d'un capteur de pression intracrânienne, la ponction pleurale et la pose de drain pleural, les gaz du sang veineux et capillaires, la glycémie capillaire, les aspirations nasales et buccales et la mesure de la température anale. Un seul patient peut avoir plusieurs procédures stressantes et inconfortables au cours d'une période de soins. Afin de pouvoir effectuer ces procédures, les patients n'étaient pas emmaillotés. Les patients n'ont pas reçu de nourriture et de succion non nutritive.

Les investigateurs et les infirmières étaient présents dans la chambre pendant les procédures ; en outre, les parents étaient autorisés à être présents et pouvaient parler ou toucher leur enfant (massage). D'autre part, les patients n'étaient pas tenus par leurs parents. La surveillance NIPE a commencé 15 minutes avant la période de

soins et s'est poursuivie jusqu'à 10 minutes après la période de soins. L'évaluation de la détresse à l'aide du CBS pour chaque patient a été effectuée pendant 3 périodes : 5 minutes avant la période de soins (T1), qui représentait la valeur de base ; pendant la période de soins (T2) ; et 5 minutes après la période (T3). Les infirmières qui ont calculé le CBS ne connaissaient pas les scores NIPE pendant la procédure (**Figure 5.a**).



**Figure 5.a.** Schéma descriptif de l'étude.

### Collecte de données

Nous avons mesuré l'inconfort ou le stress à l'aide de trois méthodes différentes : 1) en utilisant les scores CBS, 2) en utilisant des mesures physiologiques classiques comme la saturation en oxygène, la pression artérielle, la fréquence cardiaque et la fréquence respiratoire, 3) par l'analyse du système nerveux autonome à l'aide du moniteur NIPE® (MDMS, Loos, France, <http://www.mdoloris.com/>) (109-113). Le CBS

a été mis au point pour évaluer la douleur et la détresse en réanimation pédiatrique (100,101). Il est admis que les valeurs de CBS inférieures à 10 sont liées à une sur-sédation alors que les valeurs de CBS supérieures à 23 sont liées à une sous-sédation (101,103). Cependant, plusieurs auteurs ont considéré une valeur de 17 et plus pour la détection d'une douleur modérée (100). Dans notre pratique clinique, il est admis qu'un score de  $\geq 17$  nécessite un traitement analgésique et/ou sédatif approprié comme adaptation. Nous avons mesuré d'autres paramètres physiologiques (saturation en oxygène, fréquence respiratoire et pression artérielle) 5 minutes avant l'intervention, après des intervalles de 10 minutes pendant l'intervention et 5 minutes après l'intervention. En outre, nous avons recueilli des informations concernant l'âge, les antécédents médicaux, le type de sédation et d'analgésie, l'utilisation de vasopresseurs et la dose de bolus de sédation pendant l'intervention. Par la suite, un chercheur indépendant a extrait et analysé les données du NIPE en se basant sur les temps de procédure indiqués sur le moniteur NIPE. Le moniteur affichait deux valeurs NIPE, à savoir le NIPE moyen (NIPEm), qui a été calculé comme la moyenne du score NIPE sur une période maximale de 20 minutes, et le NIPE instantané (NIPEi), qui a été calculé comme la moyenne du score NIPE sur une période plus courte de 3 minutes.

Comme chaque période de soins comportait de multiples procédures douloureuses et ou inconfortables, le minimum de NIPEm, le minimum de NIPEi et le maximum de CBS ont été reportés pendant les 3 périodes T1, T2 et T3.

### *Analyse statistique*

Les analyses statistiques ont été réalisées sans analyse intermédiaire après avoir inclus tous les patients. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS statistics 20.0 (IBM, Amink, New York, US). Les variables



continues ont été exprimées sous forme de médianes (premier - troisième quartile). Les variables catégorielles ont été exprimées sous forme de fréquences et de pourcentages. Pour les analyses des scores CBS et NIPE, nous avons utilisé des modèles de régression mixte linéaire avec le nombre de procédures comme effet fixe et le patient individuel comme effet aléatoire. Les données étaient exprimées sous forme de moyenne (95% intervalle de confiance). Nous avons utilisé le test de rang de corrélation de Spearman pour déterminer la corrélation graphique entre les scores NIPE et CBS.

Nous avons calculé l'aire sous les courbes ROC (Receiver Operator Characteristics) (AUC, 95% CI) avec un seuil de score CBS de 17. Nous avons utilisé l'indice de Youden pour déterminer les seuils NIPE pertinents (114). La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives et négatives étaient calculées selon une définition standardisée, comme pour l'indice de Youden. L'indice de Youden permet d'établir le seuil qui maximise à la fois la sensibilité et la spécificité (114). L'indice de Youden est calculé comme suit :  $J = \text{sensibilité} + \text{spécificité} - 1$ . Le seuil qui maximise à la fois la sensibilité et la spécificité correspond à la valeur maximale  $J$  (114).

Les tests statistiques ont été considérés comme significatifs avec un taux d'erreur de type 1 de  $< 5\%$ .

## **D. Résultats**

### *Population étudiée*

Pendant la période d'étude, 54 mesures de l'inconfort ont été effectuées chez 32 patients. L'âge médian était de 4 mois (de 23 jours à 31 mois). Le **tableau 5.a** résume les caractéristiques des patients et les caractéristiques médicales. Au total, 26 (81%) et 6 (19%) cas ont été décrits respectivement comme étant de nature médicale

et chirurgicale. La médiane de l'indice pédiatrique de dysfonctionnement des organes PELOD-2 au 1<sup>er</sup> jour était de 5 (fourchette de 3 à 6) tandis que la médiane de l'indice pédiatrique de mortalité PIM 3 était de 0,69 (fourchette de 0,26 à 1,93).

La durée médiane des procédures de soins était de 28 min (de 9 min à 1 heure). Les procédures douloureuses effectuées parmi celles-ci comprenaient 74 traitements hygiéniques pour les patients, 35 aspirations trachéales, 29 mesures de la température anale, 18 aspirations nasales ou buccales, 13 sondages vésicaux, 11 glycémies capillaires et 9 retournements. Il n'y a pas eu pendant la période d'étude, de ponction lombaire ni de pose de voies centrales veineuses et artérielles. Le nombre médian d'interventions pour chaque séance de soins était de 10 (de 7 à 14).

Aucun parent ou enfant n'a refusé de participer à l'étude. Aucun problème technique n'a été signalé.

**Tableau 5.a. Caractéristiques des patients inclus (n=54 procédures).**

<b>Caractéristiques des patients</b>	<b>Nombre</b>
Age (mois)	4 [1 - 14]
Sexe (F/M)	14/18
Poids (Kg)	5.4 [3.7 - 10.7]
Raison de l'admission en réanimation	
Médical, n (%)	26 (81)
Chirurgical, n (%)	6 (19)
PELOD jour 1	5 [3 - 6]
PIM 3	0.69 [0.26 - 1.93]
<b>Caractéristiques lors de l'inclusion</b>	
Paramètres physiologiques	
Fréquence cardiaque (/min)	124 [110 - 138]
Pression artérielle systolique (mmHg)	85 [80 - 98]
Pression artérielle diastolique (mmHg)	50 [44 - 57]
Fréquence respiratoire (/min)	36 [30 - 41]
Saturation en oxygène (%)	98 [96 - 100]
Ventilation invasive mécanique	
Volume courant (ml)	40 [25 - 52]
FiO <sub>2</sub> (%)	30 [25 - 61]
PEEP (cm H <sub>2</sub> O)	5 [5 - 6]
Sédation	
Midazolam, n (%)	44 (81)
Dose (mcg/kg/min)	0.9 [0.5 - 1.5]
Propofol, n (%)	3 (5)
Dose (mg/h)	33 [26.5 - 51.5]
Kétamine, n (%)	2 (3.7)
Dose (mg/kg/h)	1.3 [0.9 - 1.6]
Bolus de sédation durant les soins	
Midazolam, n (%)	17 (44)
Dose (µg)	0.8 [0.5 - 1]
Propofol, n (%)	3 (8)
Dose (mg)	10 [7 - 10]
Analgésie	
Morphine, n (%)	37 (68)
Dose (mg/kg/j)	0.9 [0.5 - 1.2]
Sufentanil, n (%)	12 (24)
Dose (mcg/kg/h)	1.3 [0.5 - 1.6]
Bolus d'analgésique durant les soins	
Morphine, n (%)	13 (33)
Dose (mg)	0.5 [0.4 - 1]
Sufentanil, n (%)	6 (15)
Dose (µg)	2 [2 - 4]
Vasopresseur	
Norépinéphrine, n (%)	7 (13)
Dose (mcg/kg/min)	0.2 [0.1 - 0.3]

Variables continues sont présentées en médiane IQR [25<sup>ème</sup> – 75<sup>ème</sup> percentiles]. PELOD:

PEdiatric Logistic Organ Dysfunction; PIM: Pediatric Index of Mortality.

*Variation des scores CBS (Tableau 5.b)*

La prévalence globale de l'inconfort (CBS  $\geq 17$ ) pendant toutes les procédures était de 48%. Le score CBS moyen a augmenté de manière significative entre les périodes T1 et T2 ( $12 \pm 0$  à  $16 \pm 1$  ( $P < 0,001$ )). À la période T3, le score moyen de CBS était de  $12 \pm 0$ , ce qui était similaire à celui de la période T1 de référence ( $P = 0,7$ ) mais significativement inférieur à celui de la période T2 ( $P < 0,0001$ ).

*Variations des scores NIPEi et NIPEm (Tableau 5.b)*

Il y a eu une baisse significative des scores moyens NIPEi entre les périodes T1 et T2 ( $64 \pm 2$  à  $42 \pm 1$  ( $P < 0,0001$ )). Le score NIPEi moyen à la période T3 ( $62 \pm 2$ ) était similaire à celui de la période T1 ( $P = 0,58$ ) mais supérieur à celui de la période T2 ( $P < 0,0001$ ).

Les scores NIPEm moyens ont diminué de manière significative entre les périodes T1 et T2 ( $64 \pm 1$  à  $59 \pm 1$  ( $P < 0,0001$ )). Le score NIPEm moyen à la période T3 ( $60 \pm 1$ ) était similaire à celui des périodes T2 ( $P = 0,32$ ) et T1 ( $P = 0,07$ ).

*Variations de la fréquence cardiaque et de la fréquence respiratoire (Tableau 5.b)*

Il y a eu une augmentation significative des valeurs de la FC entre les périodes T1 et T2 (de  $125 \pm 3$  à  $141 \pm 3$  bpm ( $P < 0,0001$ )). La valeur de la FC à la période T3 ( $134 \pm 3$  bpm) était similaire à celle de la période T2 ( $P = 0,07$ ) mais supérieure à celle de la période T1 ( $P < 0,02$ ).

La fréquence respiratoire a augmenté significativement entre les périodes T1 et T2 ( $38 \pm 2$  cpm à  $44 \pm 2$  cpm ( $P < 0,005$ )). La fréquence respiratoire à la période T3 ( $38 \pm 2$ ) était inférieure à celle de la période T2 ( $P = 0,03$ ) mais similaire à celle de la période T1 ( $P = 0,7$ ).

**Tableau 5.b.** Evolution des scores CBS, NIPE, des fréquences cardiaque et respiratoire pour chaque période.

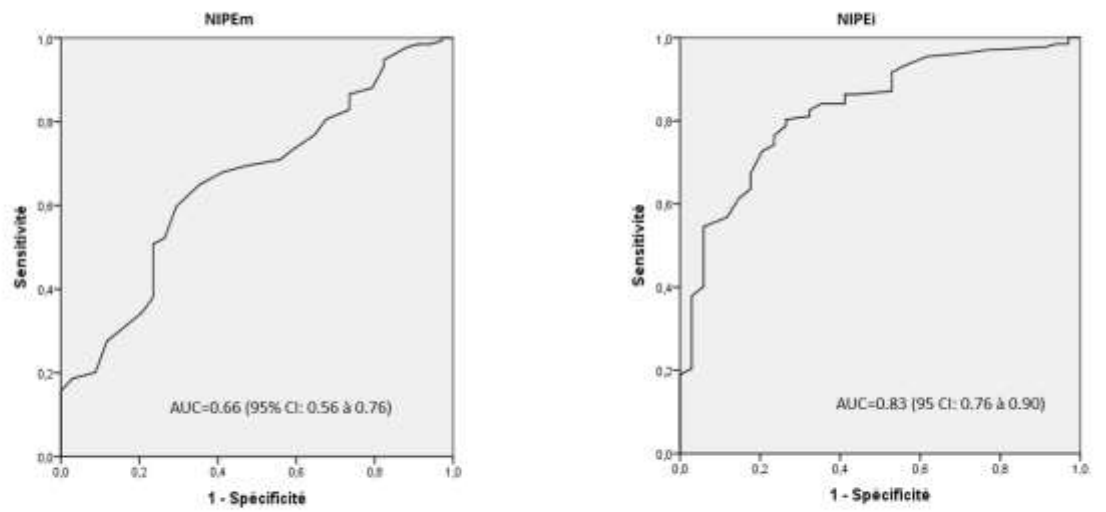
Variable	Avant les soins (T1)	Pendant les soins (T2)	Après les soins (T3)	T1 versus T2	T3 versus T2	T3 versus T1
CSB	12 ± 0	16 ± 1	12 ± 0	<b>P&lt;0.0001</b>	<b>P&lt;0.0001</b>	P=0.71
NIPEi	64 ± 2	42 ± 1	62 ± 2	<b>P&lt;0.0001</b>	<b>P&lt;0.0001</b>	P=0.58
NIPEm	64 ± 1	59 ± 1	60 ± 1	<b>P=0.007</b>	P=0.32	P=0.07
Fréquence cardiaque (bpm)	125 ± 3	141 ± 3	134 ± 3	<b>P&lt;0.0001</b>	P=0.07	<b>P=0.02</b>
Fréquence respiratoire (cpm)	38 ± 2	44 ± 2	38 ± 2	<b>P=0.005</b>	<b>P=0.03</b>	P=0.7

CBS: Comfort Behaviour Scale; NIPEi: Newborn Infant Parasympathetic Evaluation index instantané; NIPEm: Newborn Infant Parasympathetic Evaluation index moyen; bpm : battement par minute ; cpm : cycle par minute. Les variables continues sont exprimées en moyenne ± SD.

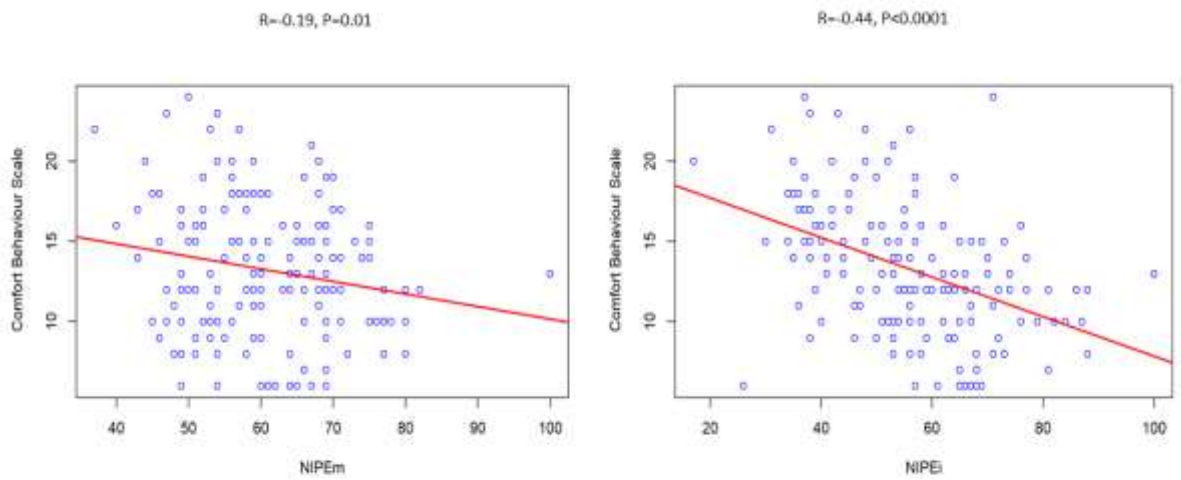
#### *Performance du NIPE*

La **Figure 5.b** montre la courbe ROC pour les scores NIPEi et NIPEm. La courbe ROC pour les scores du NIPEi avait une AUC de 0,83 (IC à 95 % : 0,76 à 0,90) et était supérieure à celle des scores du NIPEm, qui avait une AUC de 0,66 (IC à 95 % : 0,56 à 0,76). La meilleure valeur limite F utilisant l'indice de Youden pour un seuil de score NIPEi était 53, la sensibilité était de 80,0 %, la spécificité de 73,5 % et la valeur prédictive positive et négative de 43,8 % et 93,5 % respectivement. Une sensibilité de 100 % a été obtenue pour un score NIPEi > 72, tandis qu'une spécificité de 100 % a été obtenue pour un score NIPEi < 26.

Il y avait une corrélation inverse entre le score CBS et le score NIPEi ( $r = -0,44$ ,  $P < 0,0001$ ) et entre le score CBS et le score NIPEm ( $r = -0,19$ ,  $P = 0,01$ ). La corrélation entre les scores du CBS et du NIPEi était plus grande que celle entre les scores du CBS et du NIPEm (**Figure 5.c**). En outre, il existait une corrélation entre le score CBS et la FC ( $r = 0,23$ ,  $P = 0,002$ ) et entre le score CBS et la fréquence respiratoire ( $r = 0,21$ ,  $P = 0,007$ ).



**Figure 5.b.** Performance du score NIPe moyen (à gauche) et NIPe instantané (à droite) sur courbes ROC.



**Figure 5.c.** Courbes de corrélation entre les scores CBS et NIPe moyen (à gauche) et NIPe instantané (à droite).

*Variables associées aux scores NIPEi/NIPEm*

Le **Tableau 5.c** présente les résultats de l'analyse univariée pour les variables associées aux NIPE instantané. La FC et respiratoire étaient associées aux scores NIPEi avec les coefficients estimés (CE) respectifs suivants : -0,41 (IC à 95% -0,63 à -0,14) ( $P < 0,0001$ ) et CE = -0,22 (IC à 95% -0,38 à -0,09) ( $P = 0,002$ ).

Le **Tableau 5.d** présente les résultats de l'analyse univariée pour les variables associées au NIPE moyen. La FC et la fréquence respiratoire étaient associées aux scores NIPEm avec les CE respectives suivantes : -0,52 (IC 95% -0,83 à -0,21) ( $P = 0,001$ ) et CE = -0,24 (IC 95% -0,44 à -0,04) ( $P = 0,02$ ).

**Table 5.c.** Analyse des variables associées au score du NIPE instantané.

Variable	Analyse univariée				
	Coefficient de corrélation	Erreur standard	95% CI		Pr >  t
Fréquence cardiaque	-0,41	0,11	-0,63	-0,14	<b>&lt;0,0001</b>
Fréquence respiratoire	-0,22	0,07	-0,38	-0,09	<b>0,002</b>
Pression artérielle systolique	-0,10	0,11	-0,32	0,12	0,37
Pression artérielle diastolique	-0,07	0,09	-0,25	0,11	0,46
Saturation en oxygène	0,07	0,03	0,01	0,13	0,05
FiO <sub>2</sub>	-0,21	0,21	-0,62	0,2	0,33
Volume courant	-0,05	0,31	-0,66	0,56	0,88
PEEP	-0,03	0,02	-0,07	0,01	0,12
Analgésique : NON	Réf				
Analgésique : OUI	0,02	0,02	-0,02	0,06	0,35
Vasopresseur : NON	Réf				
Vasopresseur : OUI	0,01	0,02	-0,03	0,05	0,51
Hypnotique : NON	Réf				
Hypnotique : OUI	0,01	0,02	-0,03	0,05	0,67
<b>BOLUS</b>					
Morphine : NON	Réf				
Morphine : OUI	0,01	0,01	-0,01	0,03	0,68
Sufentanil : NON	Réf				
Sufentanil : OUI	0,01	0,02	-0,03	0,05	0,72
Kétamine : NON	Réf				
Kétamine : OUI	0,00	0,00	0	0	1
Midazolam : NON	Réf				
Midazolam : OUI	0,00	0,01	-0,02	0,02	0,86
Propofol : NON	Réf				
Propofol : OUI	-0,02	0,03	-0,08	0,04	0,41



**Table 5.d.** Analyse des variables associées au score du NIPE moyen.

Variable	Analyse univariée				
	Coefficient de corrélation	Erreur standard	95% CI		Pr >  t
Fréquence cardiaque	-0,52	0,16	-0,83	-0,21	<b>0,001</b>
Fréquence respiratoire	-0,24	0,1	-0,44	-0,04	<b>0,02</b>
Pression artérielle systolique	0,01	0,12	-0,23	0,25	0,93
Pression artérielle diastolique	0	0,1	-0,20	0,20	0,98
Saturation en oxygène	0,04	0,04	-0,04	0,12	0,29
FiO <sub>2</sub>	-0,2	0,24	-0,67	0,27	0,42
Volume courant	0,29	0,35	-0,40	0,98	0,4
PEEP	-0,03	0,02	-0,07	0,01	0,1
Analgésique : NON	Ref				
Analgésique : OUI	0,04	0,03	-0,02	0,10	0,21
Vasopresseur : NON	Ref				
Vasopresseur : OUI	0,02	0,02	-0,02	0,06	0,31
Hypnotique : NON	Ref				
Hypnotique : OUI	-0,01	0,02	-0,05	0,03	0,78
<b>BOLUS</b>					
Morphine : NON	Ref				
Morphine : OUI	0	0,02	-0,04	0,04	0,9
Sufentanil : NON	Ref				
Sufentanil : OUI	-0,02	0,03	-0,08	0,04	0,56
Kétamine : NON	Ref				
Kétamine : OUI	0	0	0,00	0,00	1
Midazolam : NON	Ref				
Midazolam : OUI	-0,02	0,02	-0,06	0,02	0,37
Propofol : NON	Ref				
Propofol : OUI	-0,01	0,04	-0,09	0,07	0,75

Variable	Univariate analysis				
	Estimate	Standard Error	95% CI		Pr >  t
Heart rate	-0,52	0,16	-0,83	-0,21	<b>0,001</b>
Respiratory rate	-0,24	0,1	-0,44	-0,04	<b>0,02</b>
Systolic Arterial Blood Pressure	0,01	0,12	-0,23	0,25	0,93
Diastolic Arterial Blood Pressure	0	0,1	-0,20	0,20	0,98
Oxygen saturation	0,04	0,04	-0,04	0,12	0,29
Inspired oxygen fraction	-0,2	0,24	-0,67	0,27	0,42
Tidal Volume	0,29	0,35	-0,40	0,98	0,4
Positive End Expiratory Pressure	-0,03	0,02	-0,07	0,01	0,1
Analgesics : NO	Ref				
Analgesics : YES	0,04	0,03	-0,02	0,10	0,21
Vasopressor : NO	Ref				
Vasopressor : YES	0,02	0,02	-0,02	0,06	0,31
Hypnotics : NO	Ref				
Hypnotics : YES	-0,01	0,02	-0,05	0,03	0,78
<b>BOLUS</b>					
Morphine : NO	Ref				
Morphine : YES	0	0,02	-0,04	0,04	0,9
Sufentanil : NO	Ref				
Sufentanil : YES	-0,02	0,03	-0,08	0,04	0,56
Ketamine : NO	Ref				
Ketamine : YES	0	0	0,00	0,00	1
Midazolam : NO	Ref				
Midazolam : YES	-0,02	0,02	-0,06	0,02	0,37
Propofol : NO	Ref				
Propofol : YES	-0,01	0,04	-0,09	0,07	0,75

## E. Discussion

Dans cette étude, nous avons évalué l'applicabilité des scores NIPE dans la mesure de l'inconfort lors de procédures stressantes et/ou douloureuses en réanimation pédiatrique. Nous avons constaté que pendant les périodes de soin, il y avait une diminution des scores NIPEi et NIPEm et une augmentation des scores CBS. De plus, il y avait une corrélation significative entre les scores NIPEi et les scores CBS. En outre, nous avons constaté qu'un score NIPEi  $\geq 53$  avait une valeur prédictive négative de 93,5%. À notre connaissance, il s'agit de la première étude à comparer

l'effet des soins inconfortables et/ou douloureux sur les scores NIPE et CBS chez des patients de moins de 3 ans sous sédation en réanimation pédiatrique.

Pendant le séjour en réanimation, l'inconfort et la douleur représentent les événements les plus stressants pour un patient ; cependant, malgré leur fréquence, elles sont souvent sous-estimées et sous-traitées (103). La sédation est nécessaire pour optimiser les soins aux patients gravement malades ; plus précisément, les patients sous ventilation mécanique ont besoin d'une sédation et d'une analgésie adéquate pour assurer leur confort et leur sécurité. Le confort des enfants gravement malades est une partie importante des activités quotidiennes en réanimation, l'évaluation continue de la douleur améliorant la gestion de celle-ci (98,114). Plusieurs études ont fait état d'une corrélation entre une analgésie adéquate et le confort aux soins intensifs pédiatriques (98,115). Cependant, l'amélioration de la gestion de la douleur basée sur une évaluation précise de l'intensité de la douleur chez les patients hospitalisés en réanimation reste un défi. Des études antérieures ont établi une association entre l'évaluation de la douleur et un meilleur pronostic des patients aux soins intensifs pédiatriques et adultes (99,100,116,117). La première étape pour parvenir à une meilleure gestion de la douleur et pour développer un protocole d'analgésie optimal est la mise en place d'un outil d'évaluation de la douleur valide et fiable.

Dans cette étude, nous avons constaté une augmentation significative des scores CBS pendant les procédures, ce qui a confirmé que chaque procédure entraînait un stimulus inconfortable et/ou douloureux. Le CBS est généralement utilisé et s'est avéré utile en réanimation pédiatrique comme outil d'évaluation de l'inconfort (102,118). Toutefois, l'utilisation d'une telle échelle présente de multiples inconvénients (118). Plus précisément, le CBS présente un certain degré de

subjectivité et ne peut pas être utilisé pour un enregistrement continu. Par conséquent, il est nécessaire d'envisager une surveillance électrophysiologique de la douleur afin de permettre une évaluation immédiate et continue de celle-ci.

Le tonus parasympathique est représenté dans les hautes fréquences ( $> 0,15$  Hz) sur l'HRV. Faye et al. ont rapporté qu'une diminution de la variabilité haute fréquence chez les nouveau-nés à terme était associée à une douleur postopératoire, et pouvait être utilisée comme indicateur pour évaluer la douleur prolongée chez les nouveau-nés (112). Rakza et al. ont montré une réduction des scores NIPE chez les nouveau-nés entre la deuxième et la quatrième heure de vie après un accouchement assisté (ventouse, forceps, ou les deux) en comparaison aux naissances spontanées (113). En outre, Buyuktiryaki et al. ont évalué l'effet de la pose d'un drain thoracique pour un pneumothorax sur les scores NIPE et ont indiqué que le score NIPE pouvait fournir une évaluation instantanée de la douleur prolongée chez des enfants prématurés (119). En néonatalogie et chez les enfants de moins de 2 ans anesthésiés par Sévoflurane, Weber et al. ont indiqué que des scores NIPE inférieurs à 50 pourraient indiquer une analgésie insuffisante (120). Dans notre étude, nous avons également démontré qu'un NIPE inférieur à 53 pourrait être l'indication d'une douleur/inconfort significative.

Valencia-Ramos et al. ont évalué 2 systèmes de nébulisation différents sur l'inconfort chez des patients réveillés, et ont rapporté une diminution significative des scores NIPE pendant la nébulisation chez les enfants atteints de bronchiolite. De plus, les scores CBS étaient plus élevés lors de l'utilisation du système de nébulisation à jet que lors de l'utilisation des canules nasales sur oxygénateur à haut débit ; cependant, les scores NIPE lors de l'utilisation des deux systèmes étaient similaires (120). L'absence de différence dans les scores NIPE pourrait être attribuée au fait que la

nébulisation ne peut être considérée comme un stimulus inconfortable ou douloureux (121). Dans notre étude, pendant les périodes de soins comprenant de multiples procédures douloureuses et inconfortables, nous avons constaté une baisse significative des scores NIPE. Cremilleux et al. ont étudié des enfants prématurés non sédatisés (âge gestationnel moyen =  $29,9 \pm 4,2$  semaines) qui avaient subi des interventions douloureuses de courte durée (31 injection sous-cutanée ; 16 glycémie capillaire ; 5 injections intramusculaires ; 4 accès veineux périphérique ; 3 prélèvements artériels ; et 2 succions trachéales) et n'ont pas observé de variations du score NIPE (122). Dans notre étude, nous avons évalué les variations de la NIPE au cours de multiples procédures douloureuses ou inconfortables sur des enfants sous sédation et nous avons constaté que la NIPE permettait de bien prédire la douleur. En comparaison avec l'étude de Cremilleux et al., nos procédures douloureuses présentaient des durées plus longues, ce qui correspondait au fait que nous visions à combiner plusieurs procédures douloureuses en une seule période de soins. Il est difficile de comparer les études étant donné leurs différences évidentes (prématurés vs. nourrissons de moins de 3 ans, respiration ventilée vs. respiration spontanée, nourrissons sous sédation vs. nourrissons non sédatisés). Toutefois, compte tenu d'autres résultats connexes, nous avons émis l'hypothèse que les résultats de Cremillieux et al. démontrent que les scores NIPE ne peuvent pas être utilisés pour évaluer les procédures douloureuses et inconfortables de très courte durée. D'autres études sont nécessaires pour évaluer l'efficacité du NIPE dans l'évaluation de la douleur/inconfort résultant d'interventions de longue durée (> 2 minutes) chez les enfants non sédatisés.

À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui rend compte de l'utilité du NIPE pour mesurer la réponse à la douleur et l'inconfort lors de soins chez les

enfants de moins de 3 ans intubés et sous sédatifs admis en réanimation pédiatrique

Nous avons constaté qu'un seuil de score NIPEi > 53 indiquait une analgésie ou sédation suffisante. Il n'est pas encore clair si cela est cliniquement pertinent, mais nous avons trouvé une corrélation significative entre les scores NIPEi et les scores CBS. Le CBS, qui est la référence pour évaluer la douleur et de l'inconfort, est un outil de mesure discontinu et est inefficace pour détecter les variations de douleur. En revanche, le NIPEi est enregistré en continu et pourrait permettre une évaluation continue de la douleur.

Dans cette étude, nous avons identifié deux facteurs indépendants, à savoir la FC et respiratoire, qui ont été associés au NIPEi ou au NIPEm. Cela a confirmé le principe physiologique du NIPE, qui est basé sur l'évaluation de l'arythmie du sinus respiratoire. Cependant, il reste important d'explorer d'autres facteurs de confusion qui pourraient influencer les scores NIPE lors de l'enregistrement.

La gestion de la douleur procédurale est toujours une question importante pour les enfants hospitalisés en réanimation pédiatrique et le NIPE pourrait être intéressant dans cette population de patients ne pouvant exprimer leur douleur. Cependant, son utilité clinique doit encore être étudiée et des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'impact des protocoles d'analgésie basés sur le suivi NIPE.

Notre étude présente plusieurs limites. Premièrement, le système NIPE dépend de la qualité du signal de l'électrocardiogramme et les mouvements provoqués par les procédures de soin pourraient interférer avec le signal de l'ECG et faire disparaître la valeur pendant plusieurs secondes. De plus, nous n'avons pas normalisé les procédures de soins et avons étudié une période de soins globale. Cependant, cela correspond à la pratique quotidienne et indique en outre la pertinence clinique du NIPE. En outre, nous n'avons pas pu évaluer tous les facteurs susceptibles d'influencer

les scores NIPE, ainsi que les facteurs environnementaux tels que le bruit, qui est courant en réanimation pédiatrique et qui pourrait influencer les scores NIPE. De plus, les patients inclus dans notre étude avaient un score PIM3 faible avec une grande proportion de patients médicaux. Les résultats trouvés peuvent ne pas être transférables aux nourrissons qui subissent une chirurgie complexe. Enfin, nous avons étudié le niveau de réponse aux procédures de soin sans tenir compte du niveau de sédation. D'autres études sont nécessaires pour évaluer la capacité du NIPE à évaluer l'équilibre sédation/douleur, ce qui pourrait justifier son utilisation pour la sédation et la prescription d'analgésiques. L'utilisation d'un nouveau dispositif de surveillance tel que le NIPE pour guider l'analgésie pourrait entraîner une utilisation accrue des opiacés. Cependant, plusieurs études cliniques randomisées utilisant le système de surveillance pour adultes (ANI, MDMS, Loos, France) pendant une intervention sous anesthésie générale tendent à démontrer une diminution de la consommation d'opiacés lorsque le moniteur ANI est utilisé pour titrer l'analgésie (123).

## **F. Conclusion**

Dans cette étude préliminaire, nous avons constaté que le NIPEi détectait efficacement l'inconfort et la douleur lors d'interventions et était significativement corrélé avec les scores de CBS. Nos conclusions ont montré de plus que le NIPEm n'était pas un outil fiable de détection de la douleur. Un seuil de score NIPEi de 53 était associé à une sensibilité de 80,0 %, une spécificité de 73,5 % et une valeur prédictive négative de 93,5 %. Le NIPEi pourrait être utile pour évaluer en continu la douleur et l'inconfort liés aux soins. Des études futures avec des échantillons plus importants sont nécessaires pour confirmer ces résultats. Plus précisément, des essais contrôlés

randomisés sont nécessaires pour mesurer l'impact des protocoles d'analgésie basés sur le NIPE par rapport au CBS.



## **6. Avis des relecteurs lors de la soumission de cet article au journal PCCM**

La première version de cette étude et de l'article était focalisée sur l'évaluation de la douleur en comparant les scores CBS avec les scores du NIPE instantanée et moyenné pendant la réalisation de plusieurs soins douloureux. Nous avons pris comme limite de CBS pour l'évaluation de la douleur un score de 17, avec au-dessous, l'absence de douleur, et au-dessus une douleur. Or, cette limite de 17 est applicable si l'on considère le niveau de sédation et, donc, de confort de l'enfant. Les niveaux recommandés pour établir une douleur sont de 23 pour le CBS (101).

Ce constat a été relevé par un des relecteurs, ce qui modifiait les conclusions de l'article. En conséquent, nous avons dû adapter celles-ci et notre approche de l'article, en se focalisant surtout sur le confort. Parmi tous les soins réalisés, il y avait à chaque patient un soin douloureux au moins, et plusieurs soins inconfortables. La raison de la modification des scores du NIPE est difficile à établir, soit l'enfant était effectivement douloureux, soit l'enfant était inconfortable, le stress modifiant également les valeurs du NIPE. Il nous est, de par la méthodologie de cette étude, impossible de relier les modifications du NIPE aux seuls soins douloureux. Ceci, par contre, reste d'actualité. En effet, si la modification du NIPE est uniquement due à un soin que l'on sait douloureux, l'augmentation des antalgies sera la réponse appropriée. A contrario, si les modifications ne sont liées qu'à un inconfort ou un défaut de sédation, la réponse sera une augmentation des sédatifs, comme les benzodiazépines par exemple. Pour le moment il est impossible de dissocier les 2. Cependant, en pratique clinique, un inconfort et un stress peuvent provoquer une douleur et une douleur un inconfort. De plus, la majorité des soins sont réalisés sur la même période,

diminuant ainsi les stimulations quotidiennes de ces enfants, des soins provoquant soit une augmentation de l'inconfort ou de la douleur. La réponse pourrait être une augmentation des 2 traitements, permettant à la fois une meilleure analgésie et une amélioration de la sédation.

Les remarques des relecteurs ainsi que la réponse apportée sont en Annexe 4.

## 7. Discussion globale des résultats

Les principaux résultats de cette thèse sont les suivants :

### A. Etude de la physiologie fœtale cardiaque lors du travail

Les décélérations observées de la FC du fœtus pendant le travail sont liées à une modification des tonus  $\Sigma$  et  $\text{para}\Sigma$ . La décélération d'une minute de la FC induite par la compression du cordon a été provoquée par une élévation de l'activité parasympathique, non déclenchée par un changement des gaz du sang artériels ou une élévation de la pression artérielle. L'activité des  $\beta$ -adrénergiques du myocarde et les changements dans les gaz du sang n'étaient pas impliqués dans cette réponse. Ces résultats indiquent que le baroréflexe et le chémoréflexe ne sont peut-être pas les seuls réflexes impliqués dans la phase précoce de la décélération induite par l'occlusion du cordon ombilical. En outre, le changement de la FC après la libération du cordon dépend à la fois de l'activation parasympathique et sympathique.

Plusieurs méthodes utilisent la variabilité de la FC, qui reflète le contrôle du SNA sur le nœud sinusal, pour évaluer le bien-être du fœtus, comme la variabilité à court et long terme. D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre comment le SNA du fœtus s'adapte au fil du temps à une diminution de la  $\text{PaO}_2$  ou à l'hypoxie après une compression du cordon ombilical, permettant de mieux comprendre les variations de la FC. Notre équipe, qui développe le FSI dans le cadre d'une détection plus précoce de l'hypoxie fœtale par l'étude de la variabilité de la FC du fœtus, doit se baser sur ces données pour optimiser la lecture du FSI à la vue de l'évolution du SNA lors d'une décélération fœtale.

## **B. Etude des thérapeutiques maternelles sur le SNA fœtal**

Dans cette étude, nous avons montré que l'utilisation d'opioïdes peut complètement diminuer l'activité du SNA du fœtus et modifier l'équilibre entre les activités para  $\Sigma$  et  $\Sigma$  avec une prédominance du tonus para  $\Sigma$ . Nous avons utilisé pour cela l'évolution du FSI reflétant le tonus para  $\Sigma$  et l'étude des HFn.u reflétant l'importance du tonus para  $\Sigma$  comparativement au tonus global du SNA. Notre équipe a précédemment démontré que l'activité para  $\Sigma$  relative augmentait en cas d'acidose fœtale, avec une augmentation du FSI. Nous avons donc montré qu'en cas de perfusion d'opioïdes à la mère, les fluctuations de l'activité du SNA fœtal sont directement causées par l'effet de l'opioïde sur le SNA et ne reflètent pas l'acidose fœtale. Cette constatation est une information importante pour les obstétriciens afin de surveiller le bien-être du fœtus pendant le travail et permet de délimiter l'utilisation du FSI en cas d'utilisation de certaines thérapeutiques importantes pendant le travail maternel.

## **C. Etude de la variabilité de la fréquence cardiaque chez les enfants comme reflet du bien-être**

Pour cette étude, nous avons utilisé le NIPE, qui est un indice reflétant le tonus parasympathique. Cet indice est donc basé sur les variations de la fréquence cardiaque. L'étude de ces variations est basée sur la méthode des ondelettes comme précédemment décrit.

Dans cette étude préliminaire, nous avons constaté que le NIPE instantané, calculé sur une période de temps de 3 minutes, détectait efficacement l'inconfort lors d'interventions douloureuses et inconfortable. Cet indice NIPE instantané était significativement corrélé avec les scores de CBS. Nos conclusions ont montré de plus

que le NIPE moyen, calculé sur une période de temps de 20 minutes, n'était pas un outil fiable de détection de la douleur et ou de l'inconfort. Un seuil de score NIPE instantané de 53 était associé à une sensibilité de 80,0 %, une spécificité de 73,5 % et une valeur prédictive négative de 93,5 %. Le NIPE instantané pourrait être utile pour évaluer en continu la douleur et l'inconfort liés à une période douloureuse et ou inconfortable. Cet indice semble sensible pour des périodes de soin inconfortable et/ou douloureux. Comme discuté dans le chapitre 5, l'étude de la variabilité de la fréquence cardiaque afin de déterminer le tonus parasympathique ne semble pas adaptée sur de courtes périodes de soins. De plus, comme pour les adultes, l'utilisation du NIPE comme révélateur de la douleur ou de l'inconfort est d'utilisation clinique pratique lorsque les patients sont sédatisés, et non communiquant.

## 8. Suite du programme de recherche, perspectives

### A. Réponse du SNA fœtal à l'occlusion cordonale

Comme indiqué ci-dessus, la réponse du SNA lors d'une occlusion brève du cordon ombilical a permis de mettre en évidence le rôle des branches  $\Sigma$  et para  $\Sigma$  au cours du temps. Les réflexes impliqués sont encore débattus. Le but final de ce travail est de pouvoir utiliser le FSI comme marqueur précoce de souffrance fœtale, afin d'anticiper l'apparition de la souffrance neurologique secondaire à l'hypoxie et de déclencher rapidement l'accouchement. Nous avons montré que l'analyse de la variabilité du rythme cardiaque était intéressante pour détecter l'acidose fœtale pendant le travail, car il reflétait les modulations du SNA et permettait, ainsi, une approche plus physiologique pour la surveillance du fœtus. De plus, le nouvel indice développé par notre équipe, le FSI, a été le seul indice d'HRV discriminatoire pour détecter l'acidose fœtale. Ces résultats suggèrent fortement que les changements dans le système nerveux para  $\Sigma$  peuvent refléter l'asphyxie fœtale progressive. Nous avons de plus montré que sur un modèle d'occlusions répétées du cordon d'1 minute toutes les 2,5 minutes pendant 3 heures, l'activité para  $\Sigma$  augmentait bien lors de l'apparition de l'acidose, mesuré par l'augmentation du FSI. Pouvoir comprendre l'évolution et le rôle de chaque branche du SNA, notamment la branche para  $\Sigma$  lors de l'acidose, permettrait de comprendre l'évolution du FSI lors de phénomènes menant à l'acidose fœtale, et d'affiner son interprétation lors de phénomènes divers et variés.

Nous utiliserons le même modèle que celui décrit précédemment mais avec des occlusions répétées menant à l'acidose fœtale, et de mesurer les variations du FSI en cas de blocage des branches  $\Sigma$  et/ou para  $\Sigma$ .

## **B. Etude de l'HRV par le NIPE en pédiatrie**

Nous avons donc montré que le score NIPE était corrélé à l'inconfort et la douleur chez des enfants de 1 mois à 3 ans, hospitalisés en réanimation pédiatrique, intubés et ventilés donc sédatisés. Comme décrit dans la partie traitant de cette étude, l'utilisation du NIPE a déjà montré son efficacité chez des enfants prématurés anesthésiés pour une intervention chirurgicale. Il a, de plus, permis de montrer l'importance du cocooning pour les enfants prématurés en montrant une activation du système para  $\Sigma$  lors des séances de cocooning parentaux.

La seconde étape de cette étude sera d'évaluer, sur un modèle d'étude similaire à ce que nous avons déjà réalisé, la pertinence du NIPE comme score de douleur et d'inconfort chez des enfants prématurés de moins de 32 semaines d'aménorrhée, intubés et ventilés, sédatisés en réanimation néonatale. Pour cela, nous allons comparer les scores de NIPE avant, pendant et après une période de plusieurs soins consécutifs, à une échelle d'hétéro-évaluation NEO COMFORT, utilisé et validé pour cette population. En se basant sur les études antérieures réalisées avec le NIPE dans cette population, sur notre étude en réanimation pédiatrique chez des enfants de 1 mois à 3 ans, nous espérons montrer que même pour une population de prématurés intubés ventilés, le score NIPE diminuera lors des soins douloureux.

La troisième étape sera de tester l'efficacité de l'HRV pour détecter l'inconfort et la douleur chez des enfants pré pubères, c'est-à-dire des filles de 3 ans à 10 ans et des garçons de 3 ans à de 12 ans (124), hospitalisés en réanimation pédiatrique, intubés, ventilés et sédatisés. Pour cela, nous utiliserons l'ANI, dont la preuve de l'efficacité a été démontrée chez les patients adultes en anesthésie, et en réanimation, comme marqueur de la douleur. De plus son utilisation en anesthésie a permis de diminuer les doses d'antalgiques donnés en peropératoire, diminuant de ce fait les

douleurs postopératoires paradoxales. Nous utiliserons ce moniteur chez ces enfants selon un protocole similaire à celui décrit dans cette thèse, en espérant montrer que la douleur provoque une diminution des scores ANI, comme démontré chez les adultes.

La sur utilisation des opiacés chez les enfants sédatisés et intubés provoque un état de dépendance et un syndrome de sevrage à la diminution ou à l'arrêt de ceux-ci, avec des conséquences neurologiques et psychologiques non négligeables (101). Le but final sera l'écriture d'un protocole de recherche prospectif d'adaptation des drogues analgésiques et sédatives, en comparant l'utilisation des scores de l'ANI ou du NIPE (en fonction de l'âge) pour adapter les doses d'antalgies et de sédatifs aux protocoles habituels utilisés dans les services. Ainsi, nous espérons pouvoir diminuer les doses d'opioïdes chez nos patients et de réduire les syndromes de sevrage secondaires.



## 9. Conclusion

L'étude de la variabilité du rythme cardiaque se révèle un puissant outil d'évaluation de la réponse du SNA dans de nombreuses situations pathologiques. Elle offre une fenêtre sur les mécanismes d'adaptation de l'organisme devant des phénomènes de stress intenses. En effet, la réponse du SNA permet de maintenir l'homéostasie corporelle et cellulaire. Nous avons en premier lieu montré dans ce mémoire que le fœtus utilisait de façon séquentielle les branches de son SNA lors des décélérations observées au moment du travail. Ceci confirme le rôle central du SNA chez le fœtus comme gardien de l'homéostasie. Comprendre ce rôle lors de phénomènes hypoxique fœtaux ou lors de l'administration de thérapeutiques spécifiques à la mère permettra d'affiner le développement de notre index d'HRV fœtal, le FSI. Nous avons, dans un second temps, montré que l'étude de l'HRV chez des enfants sédatisés de moins de 3 ans permet également d'ouvrir une fenêtre sur les modifications du SNA, via l'étude du NIPE, lors de phénomènes stressants.

Utiliser la variabilité du rythme cardiaque comme reflet de l'adaptation des organismes à leur environnement permettra de développer de nouveaux marqueurs d'évaluation et de suivi des patients, du fœtus à l'adulte, ouvrant la voie à un suivi basé sur la physiologie adaptative de chaque patient. Cette nouvelle approche aidera à la justification puis à la construction de nouveaux projets de recherche.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Booth LC, Malpas SC, Barrett CJ, Guild SJ, Gunn AJ, Bennet L. Is baroreflex control of sympathetic activity and heart rate active in the preterm fetal sheep? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296:R603-9.
2. Charkoudian N, Wallin BG. Sympathetic neural activity to the cardiovascular system: integrator of systemic physiology and interindividual characteristics. *Compr Physiol.* 2014;4(:825-50.
3. Kleiger RE, Stein PK, Bigger JT Jr. Heart rate variability: measurement and clinical utility. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2005;10:88-101.
4. Somers VK, Mark AL, Abboud FM. Interaction of baroreceptor and chemoreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in normal humans. *J Clin Invest.* 1991;87:1953-7.
5. Yu Z-Y, Lumbers ER. Effects of birth on baroreceptor-mediated changes in heart rate variability in lambs and fetal sheep. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29:455-63.
6. Galinsky R, Lear CA, Yamaguchi K, Wassink G, Westgate JA, Bennet L, Gunn AJ. Cholinergic and  $\beta$ -adrenergic control of cardiovascular reflex responses to brief repeated asphyxia in term-equivalent fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016;311:R949-R956.
7. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur. Heart J.* 1996;17:354-81.
8. Dexter F, Levy MN, Rudy Y. Mathematical model of the changes in heart rate elicited by vagal stimulation. *Circ Res.* 1989;65:1330-9.
9. Moser M, Lehofer M, Sedminek A, Lux M, Zapotoczky HG, Kenner T, Noordergraaf A. Heart rate variability as a prognostic tool in cardiology. A contribution to the problem from a theoretical point of view. *Circulation.* 1994;90:1078-82.
10. Altimiras J. Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 1999;124:447-60.

11. Cerutti C, Gustin MP, Paultre CZ, Lo M, Julien C, Vincent M, Sassard J. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am J Physiol.* 1991;261:H1292-9.
12. Axelsson M. The importance of nervous and humoral mechanisms in the control of cardiac performance in the Atlantic cod *Gadus morhua* at rest and during non-exhaustive exercise. *J Exp Biol.* 1988;137:287-301.
13. De Vera L, González J. Power spectral analysis of short-term RR interval and arterial blood pressure oscillations in the lizard, *Gallotia galloti*: effects of sympathetic blockade. *J Exp Zool.* 1999;283:113-20.
14. Sands KE, Appel ML, Lilly LS, Schoen FJ, Mudge GH Jr, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate variability in human cardiac transplant recipients. *Circulation.* 1989;79:76-82.
15. Lehrer PM, Vaschillo E, Vaschillo B. Resonant frequency biofeedback training to increase cardiac variability: rationale and manual for training. *Appl Psychophysiol Biofeedback.* 2000;25:177-91.
16. Berntson GG, Bigger JT Jr, Eckberg DL, Grossman P, Kaufmann PG, Malik M, Nagaraja HN, Porges SW, Saul JP, Stone PH, van der Molen MW. Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats. *Psychophysiology.* 1997;34:623-48.
17. Bernardi L, Leuzzi S, Radaelli A, Passino C, Johnston JA, Sleight P. Low-frequency spontaneous fluctuations of R-R interval and blood pressure in conscious humans: a baroreceptor or central phenomenon? *Clin Sci (Lond).* 1994;87:649-54.
18. Lacroix D, Logier R, Kacet S, Hazard JR, Dagano J, Lekieffre J. Effects of consecutive administration of central and peripheral anticholinergic agents on respiratory sinus arrhythmia in normal subjects. *J Auton Nerv Syst.* 1992;39:211-7.
19. Hon EH, Lee ST. Electronic evaluations of the fetal heart rate. VIII. Patterns preceding fetal death, further observations. *Am J Obstet Gynecol.* 1963 Nov 15;87:814-26.
20. Ewing DJ, Martyn CN, Young RJ, Clarke BF. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care.* 1985;8:491-8.

21. Wolf MM, Varigos GA, Hunt D, Sloman JG. Sinus arrhythmia in acute myocardial infarction. *Med J Aust.* 1978;2:52-3.
22. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science.* 1981;213:220-2.
23. Koh J, Brown TE, Beightol LA, Eckberg DL. Contributions of tidal lung inflation to human R-R interval and arterial pressure fluctuations. *J Auton Nerv Syst.* 1998;68:89-95.
24. Kamath MV, fallen EL. Correction of the heart rate variability signal for ectopics and missing beats p75-85. Armonk; 1995.
25. Friesen GM, Jannett TC, Jadallah MA, Yates SL, Quint SR, Nagle HT. A comparison of the noise sensitivity of nine QRS detection algorithms. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1990;37:85-98.
26. Van Ravenswaaij-Arts CMA, Kollee LAA, Hopman JCW, Stoeltinga GBA, van Geijn HP. Heart Rate Variability. *Ann Intern Med.* 1993;118:436–47.
27. Cesarelli M, Romano M, Bifulco P. Comparison of short term variability indexes in cardiotocographic foetal monitoring. *Comput Biol Med.* 2009;39:106–18.
28. Serra V, Moulden M, Bellver J, Redman CWG. The value of the short-term fetal heart rate variation for timing the delivery of growth-retarded fetuses. *BJOG.* 2008;115:1101–7.
29. Mallat S. Une exploration des signaux en ondelettes. Ecole polytechnique de Palaiseau, France ; 2000. 637p.
30. Jeanne M, Logier R, De Jonckheere J, Tavernier B. Validation of a graphic measurement of heart rate variability to assess analgesia/nociception balance during general anesthesia. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009:1840-3.
31. Funcke S, Sauerlaender S, Pinnschmidt HO, Saugel B, Bremer K, Reuter DA, Nitzschke R. Validation of Innovative Techniques for Monitoring Nociception during General Anesthesia: A Clinical Study Using Tetanic and Intracutaneous Electrical Stimulation. *Anesthesiology.* 2017;127:272-283.
32. Daccache G, Caspersen E, Pegoix M, Monthé-Sagan K, Berger L, Fletcher D, Hanouz JL. A targeted remifentanil administration protocol based on the

- analgesia nociception index during vascular surgery. *Anaesth Crit Care Pain Med.* 2017;36:229-232.
33. Jeanne M, Clément C, De Jonckheere J, Logier R, Tavernier B. Variations of the analgesia nociception index during general anaesthesia for laparoscopic abdominal surgery. *J Clin Monit Comput.* 2012;26:289-94.
  34. Migeon A, Desgranges FP, Chassard D, Blaise BJ, De Queiroz M, Stewart A, Cejka JC, Combet S, Rhondali O. Pupillary reflex dilatation and analgesia nociception index monitoring to assess the effectiveness of regional anesthesia in children anesthetised with sevoflurane. *Paediatr Anaesth.* 2013;23:1160-5.
  35. Sabourdin N, Arnaout M, Louvet N, Guye ML, Piana F, Constant I. Pain monitoring in anesthetized children: first assessment of skin conductance and analgesia-nociception index at different infusion rates of remifentanyl. *Paediatr Anaesth.* 2013;23:149-55.
  36. Faye PM, De Jonckheere J, Logier R, Kuissi E, Jeanne M, Rakza T, et al. Newborn infant pain assessment using heart rate variability analysis. *Clin J Pain.* 2010;26:777–82.
  37. Carbonne B, Dreyfus M, Schaal J-P, Groupe d'experts des RPC sur la surveillance foetale au cours du travail. [CNGOF classification of fetal heart rate: color code for obstetricians and midwives]. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* 2013;42:509-10.
  38. Choserot M, Lamy C, Perdriolle-Galet E, Behm-Gauchotte E, Coevet V, Morel O. [Correlation between fetal scalp samples and umbilical cord samples]. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* 2014;43:300-6.
  39. Rosén KG, Luzietti R. The fetal electrocardiogram: ST waveform analysis during labour. *J. Perinat. Med.* 1994;22:501-12.
  40. Carbonne B, Gougeul V, Fekih K-M. [Intrapartum fetal monitoring: old or new techniques?]. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* 2003;32:1S79-84.
  41. Siira SM, Ojala TH, Vahlberg TJ, Jalonen JO, Välimäki IA, Rosén KG, et al. Marked fetal acidosis and specific changes in power spectrum analysis of fetal heart rate variability recorded during the last hour of labour. *BJOG.* 2005;112:418–23.

42. Siira SM, Ojala TH, Vahlberg TJ, Rosén KG, Ekholm EM. Do spectral bands of fetal heart rate variability associate with concomitant fetal scalp pH? *Early Hum Dev.* 2013;89:739–42.
43. Van Laar JOEH, Peters CHL, Vullings R, Houterman S, Bergmans JWM, Oei SG. Fetal autonomic response to severe acidaemia during labour. *BJOG.* 2010;117:429–37.
44. Garabedian C, Champion C, Servan-Schreiber E, Butruille L, Aubry E, Sharma D, Logier R, Deruelle P, Storme L, Houfflin-Debarge V, De Jonckheere J. A new analysis of heart rate variability in the assessment of fetal parasympathetic activity: An experimental study in a fetal sheep model. *PLoS One.* 2017;12:e0180653.
45. Ghesquière L, De Jonckheere J, Drumez E, Sharma D, Aubry E, Deruelle P, Storme L, Houfflin-Debarge V, Garabedian C. Parasympathetic nervous system response to acidosis: Evaluation in an experimental fetal sheep model. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2019;98:433-439.
46. Chung DY, Sim YB, Park KT, Yi SH, Shin JC, Kim SP. Spectral analysis of fetal heart rate variability as a predictor of intrapartum fetal distress. *Int J Gynaecol Obstet.* 2001;73:109–16.
47. De Jonckheere J, Logier R, Dassonneville A, Delmar G, Vasseur C. PhysioTrace: An efficient toolkit for biomedical signal processing. *Conf Proc Annu Int Conf IEEE.* 2005;7:6739–41.
48. Ugwumadu A. Are we (mis)guided by current guidelines on intrapartum fetal heart rate monitoring? Case for a more physiological approach to interpretation. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 2014;121: 1063-1070.
49. Pinas A, Chandraharan E. Continuous cardiotocography during labour: Analysis, classification and management. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016;30: 33-47.
50. Lear CA, Galinsky R, Wassink G, Yamaguchi K, Davidson JO, Westgate JA, et al. The myths and physiology surrounding intrapartum decelerations: the critical role of the peripheral chemoreflex. *J Physiol.* 2016;594: 4711-4725.
51. Garabedian C, De Jonckheere J, Butruille L, Deruelle P, Storme L, Houfflin-Debarge V. Understanding fetal physiology and second line monitoring during labor. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2017;46: 113-117.

52. Galinsky R, Jensen EC, Bennet L, Mitchell CJ, Gunn ER, Wassink G, et al. Sustained sympathetic nervous system support of arterial blood pressure during repeated brief umbilical cord occlusions in near-term fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014;306: R787-R795.
53. Sholapurkar SL. Is the hypothesis that the commonest fetal heart rate decelerations are caused by peripheral chemoreflex due to fetal hypoxaemia correct? *J Physiol*. 2017;595: 6077-6080.
54. Sholapurkar SL. Critical imperative for the reform of British interpretation of fetal heart rate decelerations: Analysis of FIGO and NICE guidelines, post-truth foundations, cognitive fallacies, myths and Occam's razor. *J Clin Med Res*. 2017;9: 253-265.
55. Sunderström A, Rosén D, Rosén KG. EFM physiology. *Fetal Surveillance*. Neoventa Medical: Mölndal, Sweden; 2000
56. Lear CA, Galinsky R, Wassink G, Mitchell CJ, Davidson JO, Westgate JA, et al. Sympathetic neural activation does not mediate heart rate variability during repeated brief umbilical cord occlusions in near-term fetal sheep. *J Physiol*. 2016;594: 1265-1277.
57. Garabedian C, Aubry E, Sharma D, Bleu G, Clermont-Hama Y, Ghesquière L, et al. Exploring fetal response to acidosis in ewes: Choosing an adequate experimental model. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2018;47: 397-403.
58. Lear CA, Wassink G, Westgate JA, Nijhuis JG, Ugwumadu A, Galinsky R, et al. The peripheral chemoreflex: indefatigable guardian of fetal physiological adaptation to labour. *J. Physiol* 2018;596: 5611-5623.
59. Kumar P, Prabhakar NR. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol*. 2012;2:141-219.
60. Bennet L, Rossenrode S, Gunning MI, Gluckman PD, Gunn AJ. The cardiovascular and cerebrovascular responses of the immature fetal sheep to acute umbilical cord occlusion. *J Physiol*. 1999;517(Pt 1): 247-257.
61. Bennet L, Westgate JA, Liu Y-CJ, Wassink G, Gunn AJ. Fetal acidosis and hypotension during repeated umbilical cord occlusions are associated with enhanced chemoreflex responses in near-term fetal sheep. *J Appl Physiol*. 2005;99: 1477-1482.

62. Kara T, Narkiewicz K, Somers VK. Chemoreflexes--physiology and clinical implications. *Acta Physiol Scand.* 2003;177: 377-384.
63. Künzel W, Mann LI, Bhakthavathsalan A, Aiomlooi J. Cardiovascular, metabolic and fetal brain function observation following total cord occlusion. *J Perinat Med.* 1980;8:73-84.
64. Lear CA, Kasai M, Booth LC, et al. Peripheral chemoreflex control of fetal heart rate decelerations overwhelms the baroreflex during brief umbilical cord occlusions in fetal sheep [published online ahead of print, 2020 Jul 23]. *J Physiol.* 2020;10.1113/JP279573.
65. Lear CA, Beacom MJ, Kasai M, et al. Circulating catecholamines partially regulate T wave morphology but not heart rate variability during repeated umbilical cord occlusions in fetal sheep [published online ahead of print, 2020 Jun 3]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*
66. Nageotte MP. Fetal heart rate monitoring. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2015;20: 144-148.
67. Gaillot T, Beuchée A, Jaillard S, Storme L, Nuyt AM, Carré F, et al. Influence of sympathetic tone on heart rate during vagal stimulation and nitroprusside induced hypotension in ovine fetus. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2005;123: 19-25.
68. Parer JT. Obstetrics and gynecology-epitomes of progress: two mechanisms of late decelerations: reflex and myocardial hypoxia. *West J Med.* 1981;1346:530-531.
69. Lear CA, Galinsky R, Wassink G, et al. Reply from Christopher A. Lear, Robert Galinsky, Guido Wassink, Kyohei Yamaguchi, Joanne O. Davidson, Jenny A. Westgate, Laura Bennet and Alistair J. Gunn. *J Physiol.* 2017;595:6081-6083.
70. Ross MG, Jessie M, Amaya K, et al. Correlation of arterial fetal base deficit and lactate changes with severity of variable heart rate decelerations in the near-term ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;208:285.e1-285.e2856.
71. Collins JA, Rudenski A, Gibson J, Howard L, O'Driscoll R. Relating oxygen partial pressure, saturation and content: the haemoglobin-oxygen dissociation curve. *Breathe (Sheff).* 2015;11:194-201.
73. Romano M, Iuppariello L, Ponsiglione AM, Improta G, Bifulco P, Cesarelli M. Frequency and time domain analysis of foetal heart rate variability with



- traditional indexes: A critical survey. *Comput Math Methods Med.* 2016;2016: 9585431.
74. Shaw CJ, Allison BJ, Itani N, Botting KJ, Niu Y, Lees CC, et al. Altered autonomic control of heart rate variability in the chronically hypoxic fetus. *J Physiol.* 2018;596: 6105-6119. doi: 10.1113/JP275659. Epub 2018 Apr 29.
75. Anderson D. A review of systemic opioids commonly used for labor pain relief [published correction appears in *J Midwifery Womens Health.* 2011 Jul-Aug;56:411-8]. *J Midwifery Womens Health.* 2011;56:222–39.
76. Jansson LM, Velez M, McConnell K, et al. Maternal buprenorphine treatment and fetal neurobehavioral development. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;216:529.e1-529.e8.
77. Romano M, Iuppariello L, Ponsiglione AM, Improta G, Bifulco P, Cesarelli M. Frequency and Time Domain Analysis of Foetal Heart Rate Variability with Traditional Indexes: A Critical Survey. *Comput Math Methods Med.* 2016: 9585431.
78. Chaffin DG, Goldberg CC, Reed KL. The dimension of chaos in the fetal heart rate. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165:1425-9.
79. Shaw CJ, Allison BJ, Itani N, et al. Altered autonomic control of heart rate variability in the chronically hypoxic fetus. *J Physiol.* 2018;596:6105-19.
80. Van Laar JOEH, Porath MM, Peters CHL, Oei SG. Spectral analysis of fetal heart rate variability for fetal surveillance: review of the literature. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87:300-6.
81. Ghesquière L, De Jonckheere J, Drumez E, et al. Parasympathetic nervous system response to acidosis: Evaluation in an experimental fetal sheep model. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2019;98:433-9.
82. Jeanne M, Logier R, De Jonckheere J, Tavernier B. Heart rate variability during total intravenous anesthesia: effects of nociception and analgesia. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2009;147:91-6.
83. Giannina G, Guzman ER, Lai YL, Lake MF, Cernadas M, Vintzileos AM. Comparison of the effects of meperidine and nalbuphine on intrapartum fetal heart rate tracings. *Obstet Gynecol.* 1995;86:441-5.

84. Nicolle E, Devillier P, Delanoy B, Durand C, Bessard G. Therapeutic monitoring of nalbuphine: transplacental transfer and estimated pharmacokinetics in the neonate. *Eur J Clin Pharmacol.* 1996;49:485-9.
85. Martin LV, Jurand A. The absence of teratogenic effects of some analgesics used in anaesthesia. Additional evidence from a mouse model. *Anaesthesia.* 1992;47:473-6.
86. Nezvalová-Henriksen K, Spigset O, Nordeng H. Effects of codeine on pregnancy outcome: results from a large population-based cohort study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2011;67:1253-61.
87. Wilson SJ, Errick JK, Balkon J. Pharmacokinetics of nalbuphine during parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1986;155:340-4.
88. Wilson CM, McClean E, Moore J, Dundee JW. A double-blind comparison of intramuscular pethidine and nalbuphine in labour. *Anaesthesia.* 1986;41:1207-13.
89. Holsey YS, Wu D, Soong Y, Omoniyi AT, Szeto HH. Cardiovascular effects of a mu-selective opioid agonist (tyrosine-D-arginine-phenylalanine-lysine-NH<sub>2</sub>) in fetal sheep: sites and mechanisms of action. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180:1127-30.
90. Sherer DM, Cooper EM, Spoor C, Serletti BL, Woods JR. Resolution of marked intrapartum fetal tachycardia following intravenous nalbuphine hydrochloride. *Am J Perinatol.* 1994;11:367-8.
91. Guillonneau M, Jacqz-Aigrain E, de Crepy A, Zeggout H. Perinatal adverse effects of nalbuphine given during parturition. *Lancet Lond Engl.* 1990;335:1588.
92. Szeto HH, Wu D, Cheng PY, Soong Y, Taylor CC, Yee J. Cardiovascular and respiratory actions of U50,488H in the unanaesthetized ovine foetus. *Eur J Pharmacol.* 1996;297:77-82.
93. Cohen S, Parvizi N, Mulder EJ, et al. Effects of morphine and naloxone on fetal heart rate and movement in the pig. *J Appl Physiol.* 2001;90:1577-1583.
94. Kopecky EA, Ryan ML, Barrett JF, et al. Fetal response to maternally administered morphine. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:424-30.

95. Garabedian C, Clermont-Hama Y, Sharma D, et al. Correlation of a new index reflecting the fluctuation of parasympathetic tone and fetal acidosis in an experimental study in a sheep model. *PloS One*. 2018;13:e0190463.
96. Chanques G, Tarri T, Ride A, et al. Analgesia nociception index for the assessment of pain in critically ill patients: a diagnostic accuracy study. *Br J Anaesth*. 2017;119:812–20.
97. Daccache G, Jeanne M, Fletcher D. The Analgesia Nociception Index: Tailoring Opioid Administration. *Anesth Analg*. 2017;125:15–7.
98. Voepel-Lewis T, Zanotti J, Dammeyer JA, et al. Reliability and validity of the face, legs, activity, cry, consolability behavioral tool in assessing acute pain in critically ill patients. *Am J Crit Care*. 2010;19:55–61.
99. Chou R, Gordon DB, de Leon-Casasola OA, et al. Management of Postoperative Pain: A Clinical Practice Guideline from the American Pain Society, the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, and the American Society of Anesthesiologists' Committee on Regional Anesthesia, Executive Committee, and Administrative Council. *J Pain*. 2016;17:131–57.
100. Dorfman TL, Sumamo Schellenberg E, Rempel GR, et al. An evaluation of instruments for scoring physiological and behavioral cues of pain, non-pain related distress, and adequacy of analgesia and sedation in pediatric mechanically ventilated patients: A systematic review. *Int J Nurs Stud*. 2014; 51:654–76.
101. Harris J, Ramelet AS, van Dijk M, et al. Clinical recommendations for pain, sedation, withdrawal and delirium assessment in critically ill infants and children: an ESPNIC position statement for healthcare professionals. *Intensive Care Med*. 2016;42:972–86.
102. van Dijk M, de Boer JB, Koot HM, et al. The reliability and validity of the COMFORT scale as a postoperative pain instrument in 0 to 3-year-old infants. *Pain*. 2000;84:367–77.
103. Ista E, van Dijk M, Tibboel D, et al. Assessment of sedation levels in pediatric *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6:58–63.
104. Carnevale FA, Razack S. An item analysis of the COMFORT scale in a pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med*. 2002;3:177–80.

105. Brand K, Al-Rais A. Pain assessment in children. *Anaesth Intensive Care Med*. 2019;20:314–7.
106. Morton NS. Pain assessment in children. *Paediatr Anaesth* .1997;7:267–72.
107. De Jonckheere J, Bonhomme V, Jeanne M, et al. Physiological Signal Processing for Individualized Anti-nociception Management During General Anesthesia: a Review. *Yearb Med Inform*. 2015;10:95–101.
108. Broucqsault-Dédrie C, De Jonckheere J, Jeanne M, et al. Measurement of Heart Rate Variability to Assess Pain in Sedated Critically Ill Patients: A Prospective Observational Study. *PloS One*. 2016;11:e0147720.
109. Ledowski T. Analgesia-nociception index. *Br J Anaesth*. 2014;112:937.
110. Ledowski T. Objective monitoring of nociception: a review of current commercial solutions. *Br J Anaesth*. 2019;123:312–21.
111. Butruille L, De jonckheere J, Marcilly R, et al. Development of a pain monitoring device focused on newborn infant applications: The NeoDoloris project. *IRBM*. 2015;36:80–5.
112. Faye PM, De Jonckheere J, Logier R, et al. Newborn infant pain assessment using heart rate variability analysis. *Clin J Pain*. 2010;26:777–82.
113. Rakza T, Butruille L, Thirel L, et al. Short-term Impact of Assisted Deliveries: Evaluation Based on Behavioral Pain Scoring and Heart Rate Variability. *Clin J Pain*. 2018; 4:445–9.
114. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 13: receiver operating characteristic curves. *Crit Care Lond Engl*. 2004;8:508–12.
115. Valencia-Ramos J, Arnaez J, Calvo S, et al. Observational study of newborn infant parasympathetic evaluation as a comfort system in awake patients admitted to a pediatric intensive care unit. *J Clin Monit Comput*. 2019;33:749–55.
116. Kudchadkar SR, Yaster M, Punjabi NM. Sedation, sleep promotion, and delirium screening practices in the care of mechanically ventilated children: a wake-up call for the pediatric critical care community. *Crit Care Med*. 2014;42:1592–600.
117. Barr J, Pandharipande PP. The pain, agitation, and delirium care bundle: synergistic benefits of implementing the 2013 Pain, Agitation, and Delirium Guidelines in an integrated and interdisciplinary fashion. *Crit Care Med*. 2013;41:S99-115.

118. Bosch-Alcaraz A, Falcó-Pegueroles A, Jordan I. A literature review of comfort in the paediatric critical care patient. *J Clin Nurs*. 2018;27:2546–57.
119. Buyuktiryaki M, Uras N, Okur N, et al. Evaluation of prolonged pain in preterm infants with pneumothorax using heart rate variability analysis and EDIN (Échelle Douleur Inconfort Nouveau-Né, neonatal pain and discomfort scale) scores. *Korean J Pediatr*. 2018;61:322–6.
120. Weber F, Roeleveld HG, Geerts NJE, et al. The heart rate variability-derived Newborn Infant Parasympathetic Evaluation (NIPE™) Index in pediatric surgical patients from 0 to 2 years under sevoflurane anesthesia-A prospective observational pilot study. *Paediatr Anaesth*. 2019; 9:377–84.
121. De Jonckheere J, Storme L. NIPE is related to parasympathetic activity. Is it also related to comfort? *J Clin Monit Comput*. 2019;33:747–8.
122. Cremillieux C, Makhoulouf A, Pichot V, et al. Objective assessment of induced acute pain in neonatology with the Newborn Infant Parasympathetic Evaluation index. *Eur J Pain Lond Engl*. 2018;22:1071–9.
123. Dundar N, Kus A, Gurkan Y, et al. Analgesia nociception index (ani) monitoring in patients with thoracic paravertebral block: a randomized controlled study. *J Clin Monit Comput*. 2018;32:481–486.
124. Semiz S, Kurt F, Kurt DT, Zencir M, Sevinç O. Pubertal development of Turkish children. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2008;21:951-

## **ANNEXE 1**

May 15, 2020

Joerg Heber

Editor-in-Chief

*PLOS ONE*

Dear Editor:

I wish to submit an original article for publication in *PLOS ONE* titled “Roles of parasympathetic outflow and sympathetic outflow in the hemodynamic response to brief umbilical cord occlusion in fetal sheep.” The paper was coauthored by Arthur Lauriot Dit Prevost, Dyuti Sharma, Julien De Jonckheere, Charles Garabedian, and Laurent Storme.

The role of the autonomic nervous system in regulating the fetal heart rate and mean arterial pressure during uterine contractions to maintain optimal organ perfusion has been well-established. This study determined the role of the parasympathetic and sympathetic system during fetal heart rate deceleration in the case of brief and complete umbilical cord occlusion. Our study identified that acute activation of the parasympathetic system is mainly responsible for compression-induced deceleration, as seen by Galinsky et al [1] and Lear's [2] research articles. Our data confirmed the key role of parasympathetic tone in controlling the FHR during complete UCO, consistent with previous studies of brief and repeated 1-minute, 2-minute, or 5-minute UCO [1,2]. Myocardial  $\beta$ -adrenoceptor activity was not involved in this response; therefore, several different reflexes could contribute to fetal heart rate deceleration.

We believe that our study makes a significant contribution to the literature because it furthers our understanding of the physiological controls that underlie fetal autonomic adaptation during labor.

Further, we believe that this paper will be of interest to the readership of your journal because we describe how autonomic nervous system activity may help decipher the reflexes that trigger fetal heart deceleration. It is especially important because heart rate decelerations are associated with uterine contractions during labor. The interdisciplinary nature of the journal will help readers, such as physicians, midwives, and scientists interested in fetal well-being, access our research to improve their understanding of fetal heart rate recordings and the mechanisms underlying decelerations.

Please consider, as potential academic editors, Katariina Laine and Daniel W. Skupski.

This manuscript has not been published or presented elsewhere in part or in entirety and is not under consideration by another journal. We have read and understood your journal's policies, and we believe that neither the manuscript nor the study violates any of these. There are no conflicts of interest to declare.

Thank you for your consideration. I look forward to hearing from you.

Sincerely,

Morgan Recher

Department of Pediatric Intensive Care Unit

Jeanne de Flandre Hospital

CHU de Lille (Lille University Hospital)

Avenue Eugène Avinée

Phone: +33 320445982

Fax: +33 320444719

Email: [morgan.recher@chru-lille.fr](mailto:morgan.recher@chru-lille.fr)

References:

1. Galinsky R, Lear CA, Yamaguchi K, Wassink G, Westgate JA, Bennet L, et al. Cholinergic and  $\beta$ -adrenergic control of cardiovascular reflex responses to brief repeated asphyxia in term-equivalent fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016;311:R949-R956. doi: 10.1152/ajpregu.00340.2016. Epub 2016 Sep 21.
2. Lear CA, Galinsky R, Wassink G, Yamaguchi K, Davidson JO, Westgate JA, et al. The myths and physiology surrounding intrapartum decelerations: the critical role of the peripheral chemoreflex. *J Physiol*. 2016;594: 4711-4725.



## Roles of parasympathetic outflow and sympathetic outflow in the hemodynamic response to brief umbilical cord occlusion in fetal sheep

Morgan Recher <sup>1,2\*</sup>, Arthur Lauriot Dit Prevost <sup>1,3</sup>, Dyuti Sharma <sup>1,3</sup>, Julien De Jonckheere <sup>1,4</sup>, Charles Garabedian<sup>1,5</sup>, Laurent Storme<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lille, ULR 2694 – METRICS: Evaluation des technologies de santé et des pratiques médicales, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup>CHU Lille, Department of Pediatric Intensive Care Unit, Jeanne de Flandre Hospital, F-59000 Lille, France

<sup>3</sup>CHU Lille, Department of Pediatric surgery, Jeanne de Flandre Hospital, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup>CHU Lille, Centre d'Innovation Technologique, F-59000 Lille, France

<sup>5</sup>CHU Lille, Department of Obstetrics, Jeanne de Flandre Hospital, F-59000 Lille, France

<sup>6</sup>CHU Lille, Department of Neonatology, Jeanne de Flandre Hospital, F-59000 Lille, France

\* Corresponding author

E-mail: [morgan.recher@chru-lille.fr](mailto:morgan.recher@chru-lille.fr) (MR)

Short title: Autonomic nervous system and hemodynamic response to umbilical occlusion

## Authors Contributions

**Conceptualization:** M. Recher, A. Lauriot Dit Prevost, D Sharma, L. Storme.

**Data Curation:** M. Recher, A. Lauriot Dit Prevost.

**Formal analysis:** M. Recher, A. Lauriot Dit Prevost, J. De Jonckheere.

**Investigation:** M. Recher, A. Lauriot Dit Prevost, D. Sharma.

**Methodology:** M. Recher, J. De Jonckheere, C. Garabedian, L. Storme.

**Project administration:** C. Garabedian, L. Storme.

**Software:** J. De Jonckheere.

**Supervision:** J. De Jonckheere, L. Storme.

**Validation:** C. Garabedian, J. De Jonckheere, L. Storme.

**Writing - original draft:** M. Recher, L. Storme.

**Writing - review & editing:** M. Recher, C. Garabedian, D. Sharma, J. De Jonckheere,  
L. Storme.

## Abstract

Fetal heart rate (FHR) deceleration is the most common change seen during labor. The role of the autonomic nervous system in regulating the fetal cardiovascular response during multiple uterine contractions has been well-established. However, the mechanism underlying the hemodynamic response remains unclear and the specific reflex that mediates the cardiovascular modifications is still controversial. This study aimed to determine the role of the sympathetic and parasympathetic systems on fetal hemodynamics in complete cord occlusion. Chronically instrumented fetal sheep were randomized to receive an intravenous injection of atropine 2.5 mg (n=8), propranolol 5 mg (n=7), atropine and propranolol (n=7), or a control protocol (n=9), followed by three applications of 1-minute umbilical cord occlusion repeated every 5 minutes. At 30 seconds of occlusion, FHR decreased from baseline by 53% ( $p<0.0001$ ) with the control protocol, by 55% ( $p<0.001$ ) with the propranolol protocol, and by 7% ( $p<0.001$ ) with the atropine-propranolol protocol. At 60 seconds of occlusion, FHR decreased from baseline by 49% ( $p<0.0001$ ) with the control protocol, by 51% ( $p<0.001$ ) with the propranolol protocol, and by 27% ( $p<0.0001$ ) with the atropine-propranolol protocol. FHR did not change with the atropine protocol. Mean arterial pressure (MAP) increased during occlusion, except for the propranolol protocol. At 300 seconds after occlusion, FHR and MAP returned to baseline with all protocols. Blood gases (pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>) and plasma lactate concentrations did not change significantly at 30 seconds of umbilical cord occlusion with the control protocol. Complete cord compression-induced deceleration is likely due to acute activation of parasympathetic output.  $\beta$ -adrenoceptor activity is involved in the increase in MAP. Understanding the reflexes involved in FHR

deceleration may help us understand the mechanisms underlying fetal autonomic adaptation during cord occlusion.

## Introduction

During labor, fetal heart rate (FHR) recordings are the only non-invasive tool that can continuously monitor intrapartum fetal well-being. Knowledge and understanding of fetal physiology are required to interpret FHR recordings, [1,2]. Decelerations associated with uterine contractions are the most common and distinctive component of intrapartum FHR [3,4]. The role of the autonomic nervous system (ANS) in regulating FHR and mean arterial pressure (MAP) during uterine contractions to maintain optimal organ perfusion is well-established [3,5,6]. Heart rate (HR) is controlled by parasympathetic activity through M2 muscarinic receptors on cardiac cells and by sympathetic activity mediated by  $\beta$ 1-adrenergic receptors on cardiac pacemaker cells [5]. However, the parasympathetic output and sympathetic output at different time points during and after FHR deceleration remain controversial [3,7,8]. A better understanding of the sequence of ANS activity during FHR may help decipher which reflexes trigger FHR decelerations[9].

Experimental models have shown that brief umbilical cord occlusion (UCO) induces acute FHR deceleration and increased MAP, followed by an increase in FHR when the occlusion has been released [5,10]. This can occur during labor in cases of cord prolapse. It is still unclear how parasympathetic and sympathetic tone supports fetal adaptation. Therefore, we hypothesized that changes in FHR during and after brief UCO depend on sequential activation of both branches of the ANS.

Using cholinergic blockade and  $\beta$ 1-adrenergic blockade drugs, we aimed to determine the roles of the parasympathetic and sympathetic nervous systems in

changes in FHR and MAP during UCO in chronically instrumented near-term fetal sheep.

## **Materials and methods**

### **Ethics**

The anesthesia, surgery, and experimentation protocols were in agreement with the recommendations of the Ministry of Higher Education and Research of France. The study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (CEEA #2016121312148878). All efforts were made to minimize suffering.

### **Surgery and instrumentation**

This study was conducted between November 2018 and June 2019. Fifteen pregnant “Ile de France” sheep (National Institute for Agronomic Research, INRA, France) underwent hysterotomy at  $125\pm 3$  days of gestation (term = 140-145 days) under general anesthesia. Anesthetic and surgical procedures have been described previously [11,12]. Before surgery, sheep were placed in the supine position, anesthetized with inhaled isoflurane and oxygen, and intramuscular xylazine 0.1 mL/10 kg (Sedaxylan®; CEVA Santé Animale, Liboune, France, half-life 30 minutes), intubated, and maintained with isoflurane 2% (IsoFlo®; Zoetis, Torce, France) and oxygen. After an abdominal incision, hysterotomy was performed as previously described. The fetus underwent *in utero* surgery. The fetus received an intramuscular injection of buprenorphine 0.3 mL (Buprénodale®; Dechra Veterinary Products,

Montigny-le-Bretonneux, France, half-life 6 hours) and a subcutaneous injection of lidocaine hydrochloride 1 mL (Xylocaïne®; Astra Zeneca, Courbevoie, France, half-life 2 hours) after hysterotomy. The fetal right and left upper limbs were successively brought out of the uterus for catheter insertion after a bilateral axillary incision (Vygon, Ecouen, France). Two aortic catheters were inserted via the right and left axillary arteries, with one positioned in the ascending aorta, for blood sampling and arterial pressure measurements, respectively. To confirm accurate placement of the catheter, we moved the catheter back 1 cm until extrasystoles ceased. The arterial pressure was then checked to ensure that the catheter correspond with the aortic pressure rather than the ventricular pressure. Furthermore, arterial pressure is measured during surgery to ensure that the tip of the catheter is inside the aorta and not in the left ventricle. The position of the catheter is also checked during autopsy. A venous catheter was inserted into the superior vena cava for drug infusion via the right axillary vein. Four subcutaneous electrodes (two electrodes per axillary incision) were sutured to the intercostal muscles for electrocardiographic monitoring (Mywire 10; MACQUET, Rastatt, Germany). An inflatable occluder was placed around the umbilical cord (OC16; In Vivo Metric, Healdsburg, California, USA). A 5-Fr catheter was placed inside the amniotic cavity to monitor intra-amniotic pressure (IAP). The catheters, electrodes, and occluder were exteriorized to the ewe's flank and secured in a protective bag. Fetuses were then reintegrated into the uterine cavity. During closure of the hysterotomy, an amniotic infusion of 250 mL of isotonic saline serum containing 500 mg of amoxicillin + clavulanic acid (Augmentin Intravenous, 1 g/200 mg, GlaxoSmithKline, Barnard Castle, United Kingdom) was administered through the 5-Fr catheter left in the intra-amniotic cavity to obtain a reference pressure. Postoperative analgesia of ewes was administered by an intravenous injection of 20 mg of nalbuphine, repeated 6 h after

the first injection, and then daily until the third day after surgery. Similarly, fetal antibiotic prophylaxis with 500 mg of amoxicillin + clavulanic acid, and fetal analgesia with 10 mg of nalbuphine were administered daily through the intra-amniotic catheter until the third day after surgery. Catheters were maintained by daily injections of 2 mL of heparinized (10 IU/mL) normal saline. Fetuses were continually connected to the ewes during experiments and during the recovery periods between each experiment. Fetuses and ewes were monitored to check hemodynamic parameters until the end of the experimental period. Ewes were monitored and evaluated by a veterinarian. If the ewes showed any sign of pain, distress, or infection (modification of clinical signs, behavior changes), analgesics and antibiotics were rapidly prescribed and administered by a veterinarian. If the analgesic or antibiotic therapy was ineffective, the ewes were euthanized. If the fetus died or showed signs of suffering during the stability period, ewes were euthanized. At the end of the experimental procedures, animals were euthanized using T61® (Tanax1, Intervet, Beaucouzé, France) IV infusion (3 mL for 10 kg body weight for the ewe and 0.3 mL/kg for the fetus).

No ewes died before or during experiments. Fifteen fetuses were operated upon, two died just after surgery, and one fetus was euthanized because the inflatable occluder was non-functional.

## **Experimental procedure**

Experiments began four days after surgery. One protocol was tested per day to allow for fetal recovery. Four protocols were designed to assess the mechanisms involved in FHR deceleration: UCO without any injected drugs (control protocol, n=9); UCO after parasympathetic blockade by an injection of atropine (n=8); UCO after  $\beta$ -adrenergic blockade by an injection of propranolol (n=7); and UCO after both

parasympathetic and  $\beta$ -adrenergic blockade with atropine and propranolol (atropine-propranolol; n=7). The control protocol was performed first, and the order of the other protocols was randomized (Package "Blockrand" for R software). Drug concentrations were established according to previous work as 2.5 mg atropine sulfate (2.5 mg/2.5 mL; Atropine; Aguettant, Lyon, France) and 5 mg propranolol hydrochloride (5 mg/5 mL propranolol; Karnodyl; Primius Lab Ltd, London, United Kingdom) [5,11]. Both were administered as a bolus 5 minutes before the first UCO. To consider the intra-individual variability in the hemodynamic response to UCO, each experiment consisted of three applications of UCO for 1 minute with a recovery period of 4 minutes between each UCO, as described previously [5,11,13]. Prior to injection, an initial 30-minute period, called the stability period, was recorded. Total UCO was performed by rapid and complete inflation of the occluder using saline. If the ewe or fetus died or if problems occurred during the experiments, then additional ewes were included to guarantee a minimum of seven experiments per protocol. At the end of the study, the ewes were euthanized by an injection of embutramide (T61®; Intervet, Beaucouze, France) and the fetuses were weighed.

## **Fetal hemodynamic parameters and blood samples**

The FHR, MAP, and IAP (IntelliVue MX700; Philips, Eindhoven, Netherlands) were continuously monitored and recorded using a data acquisition board (Physiotrace®; Estaris Monitoring, Lille, France) during the study period [14]. MAP refers to the amniotic cavity pressure (MAP = observed MAP - observed IAP). We defined six time points, averaged over 10 seconds, to compare FHR and MAP to baseline: just before UCO (baseline); then at 10, 30, 60, 120, and 300 seconds after



starting UCO. Note that UCO was only stopped after 60 seconds, meaning that the 120 and 300 second measurements were made at 60 and 240 seconds, respectively, after ending the UCO. The percentage changes in FHR and MAP from baseline were calculated as  $(\text{time point value} - \text{baseline value}) \times 100 / \text{baseline value}$  and were described as “change in FHR” and “change in MAP”, respectively. FHR, MAP, change in FHR, and change in MAP during UCO were then averaged to account for intraindividual variability in the hemodynamic response to UCO. In the case of outliers due to technical problems, these values were not taken into account during the analysis. Blood gases (pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>) and plasma lactate concentrations were measured from blood samples taken from the ascending aorta at baseline before drug infusion and then adjusted to the ewe's physiological temperature of 39°C (i-Stat Handheld©; Abbott Laboratories, Washington, DC, USA). In addition, to obtain the blood gases (pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>) and plasma lactate concentrations just before occlusion and at 30s without modifying the hemodynamics, we performed five occlusions of 1 minute on five other ewes before they were used on another research protocol. Therefore, blood gas analyses and measurement of plasma lactate concentration were performed in these five other ewes.

## Statistical analysis

Results are presented as the median and interquartile range (IQR; first quartile to third quartile). To compare the values at different time points for each protocol, a non-parametric Friedman test was performed for repeated measures. When statistical significance was found, post hoc comparisons were performed using a Wilcoxon signed-rank non-parametric test with Bonferroni correction. To compare protocols at each time point, a Kruskal-Wallis test was performed. When statistical significance was

found, a Dunn's test was performed to compare each protocol. A value of  $p < 0.05$  was considered significantly different. In each experiment,  $n$  represents the number of studied protocols. Statistical analyses were performed using R software version 3.4.1 (available online).

## **Results**

### **Hemodynamics parameters**

#### **Before cord occlusion**

Before drug infusion, baseline fetal arterial blood gases (pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>), plasma lactate concentrations, and fetal hemodynamic parameters (FHR, MAP) did not differ between protocols (Table 1). Fetal weights were similar with each protocol. After drug injections and before UCO, FHR was higher with the atropine protocol than with the control protocol, and lower with the propranolol protocol than with the control protocol ( $p < 0.001$ ).

**Table 1. Fetal arterial blood gases and fetal hemodynamic variables before occlusion**

	Control	Atropine	Propranolol	Atropine-propranolol	p-value
<b>No. of protocols</b>	9	8	7	7	
<b>Blood gases</b>					
pH	7.39 (7.37-7.40)	7.39 (7.39-7.40)	7.38 (7.37-7.40)	7.39 (7.37-7.41)	0.83
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	46 (43-47)	47 (42-48)	47 (42-48)	45 (41-46)	0.99
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	18 (17-20)	18 (17-21)	18 (15-20)	21 (18-21)	0.93
Lactates (mmol/L)	1.6 (1.6-1.9)	1.6 (1.2-2.1)	1.7 (1.3-2.9)	1.5 (1.1-1.8)	0.40
<b>Fetus variables</b>					
Weight (kg)	3.5 (3.1-4.0)	3.2 (3.1-3.9)	3.4 (3.1-3.9)	3.2 (3.1-3.8)	0.60
Heart rate before injection	164 (159-169)	171.00 (168-178)	153 (150-164)	165 (158-174)	0.11
Heart rate before occlusion	162 (153-173)	209 (192-236)*	130 (119-148)*	172 (161-179)	<b>&lt;0.001</b>

Data are expressed as median interquartile range (IQR; first–third interquartile). p-value: Kruskal-Wallis test. \*p<0.05: Dunn's test with Bonferroni correction (compared to control).

## During cord occlusion (Figs 1 and 2)

**Fig 1. Change in fetal hemodynamics during and after cord occlusion.** Fetal heart rate (A) and mean arterial pressure (B) in treated fetuses exposed to three applications of 1-minute umbilical cord occlusion (grey zone) every 5 minutes. Data are expressed as mean ± standard error. \*p < 0.05 vs. baseline.

**Fig 2. Sample tracings of fetal hemodynamics during and after cord occlusion.**

Fetal heart rate and arterial pressure (red: systolic pressure, green: mean pressure,

blue: diastolic pressure) in treated fetuses exposed to three applications of 1-minute umbilical cord occlusion (pink zone) every 5 minutes.

*Control protocol*

UCO was associated with rapid bradycardia and hypertension ( $p < 0.0001$ ).

*Atropine protocol*

FHR slowly decreased during UCO ( $p < 0.01$ ), while MAP was higher than that at baseline ( $p < 0.0001$ ). The change in FHR was significantly lower with the atropine protocol than with the control protocol ( $p < 0.0001$ ). The change in MAP was similar between the atropine and control protocols.

*Propranolol protocol*

Bradycardia occurred compared to the baseline ( $p < 0.0001$ ), while MAP was similar to baseline. The change in FHR was similar between the propranolol and control protocols. The change in MAP was lower after 30 seconds of UCO with the propranolol protocol than with the control protocol ( $p < 0.05$ ).

*Atropine-propranolol protocol*

FHR decreased progressively during UCO ( $p < 0.0001$ ), whereas MAP increased ( $p < 0.001$ ). The change in FHR was similar between the atropine-propranolol and atropine protocols but was significantly smaller with the atropine-propranolol protocol than with the control protocol ( $p < 0.0001$ ). The change in FHR was smaller with the atropine-propranolol protocol than with the propranolol protocol ( $p < 0.0001$ ). The change in MAP was similar between the atropine-propranolol and control protocols, and with the propranolol protocol.

**After cord release (Fig 1 and Fig 2)**

*Control protocol*

FHR gradually returned to near-baseline levels; MAP remained elevated during the first part of recovery.

*Atropine protocol*

FHR progressively returned to baseline after an overshoot. MAP remained elevated and progressively returned to baseline. Immediately after UCO release, the change in MAP was greater with the atropine protocol than with the control protocol ( $p < 0.01$ ).

*Propranolol protocol*

FHR progressively returned to baseline, while MAP was always similar to baseline. Immediately after UCO release, the change in FHR was smaller with the propranolol protocol than with the control protocol ( $p < 0.05$ ).

*Atropine-propranolol protocol*

FHR progressively returned to baseline. MAP remained elevated and gradually returned to baseline. The change in MAP was similar between the atropine-propranolol and control protocols.

Changes in FHR and MAP during and after cord occlusion are described in Tables 2 and 3. Changes in FHR and MAP according to the occlusion number are described in S1 and S2 Tables.

**Table 2. Change in fetal heart rate from baseline (percentage) during (A) and after occlusion (B)**

<b>A</b>	<b>OCCLUSION (seconds from the onset of the occlusion)</b>		
<b>PROTOCOL</b>	<b>10s</b>	<b>30s</b>	<b>60s</b>
<b>Control</b>	-18 [(-34) - (-12)]	-53 [(-42) - (-81)]	-49 [(-38) - (-79)]
<b>Atropine</b>	-2 [(-3) - 1]*	7 [(-16) - 18]*	-11 [(-53) - 4]*
<b>Propranolol</b>	-21 [(-23) - (-9)]	-55 [(-50) - (-74)]	-51 [(-35) - (-79)]
<b>Atropine-propranolol</b>	-1 [(-1) - 0]*	-7 [(-2) - (-32)]*	-27 [(-53) - 4]*
<b>p-value (Kruskal-Wallis)</b>	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>B</b>	<b>POST OCCLUSION (seconds from the onset of the occlusion)</b>		
<b>PROTOCOL</b>	<b>70s</b>	<b>120s</b>	<b>300s</b>
<b>Control</b>	-30 [(-39) - (-23)]	-11 [(-27) - (-2)]	2 [(-7) - 6]
<b>Atropine</b>	25 [14 - 35]*	32 [25 - 39]*	5 [(-12) - 8]
<b>Propranolol</b>	-47 [(-54) - (-38)]*	-19 [(-49) - (-15)]	0 [(-12) - 10]
<b>Atropine-propranolol</b>	-33 [(-43) - (-10)]	8 [0 - 13]*	8 [(-1) - 11]
<b>p-value (Kruskal-Wallis)</b>	<0.001	<0.0001	>0.05

Data (%) are expressed as median (interquartile range (IQR); first–third interquartile).

\*p<0.05: compared to control.

**Table 3. Change in mean arterial pressure from baseline (percentage) during (A) and after occlusion (B)**

<b>A</b>	<b>OCCLUSION (seconds from the onset of the occlusion)</b>		
<b>PROTOCOL</b>	<b>10s</b>	<b>30s</b>	<b>60s</b>
<b>Control</b>	7 [1 - 11]	20 [(-5) - 28]	26 [(-3) - 30]
<b>Atropine</b>	12 [6 - 21]	27 [0 - 38]	28 [(-32) - 42]
<b>Propranolol</b>	0 [(-2) - 4]	4 [(-19) - 16]*	1 [(-33) - 15]*
<b>Atropine-propranolol</b>	7 [5 - 13]	10 [(-31) - 27]	10 [(-37) - 17]
<b>p-value (Kruskal-Wallis)</b>	<0.0001	<0.01	<0.0001
<b>B</b>	<b>POST OCCLUSION (seconds from the onset of the occlusion)</b>		
<b>PROTOCOL</b>	<b>70s</b>	<b>120s</b>	<b>300s</b>
<b>Control</b>	18 [8 - 27]	19 [(-13) - 33]	4 [(-6) - 8]
<b>Atropine</b>	50 [38 - 61]*	33 [(-9) - 48]	1 [(-6) - 8]
<b>Propranolol</b>	-3 [(-9) - 1]*	8 [(-20) - 16]*	0 [(-13) - 20]
<b>Atropine-propranolol</b>	9 [0 - 24]	31 [(-11) - 41]	1 [(-17) - 25]
<b>p-value (Kruskal-Wallis)</b>	<0.0001	<0.0001	>0.05

Data (%) are expressed as median (interquartile range (IQR); first–third interquartile).

\*p<0.05: compared to control.

## Fetal biological parameters

Blood gases (pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>) and plasma lactate concentrations did not change significantly between baseline and after 30 seconds of UCO with the protocol control (Table 4). Fetuses in the control group demonstrated deceleration and hypertension during cord occlusion (at 10 seconds: changes in FHR, -18 [(-18) – (-17)] % and changes in MAP, 9 [6 – 12] %; at 30 seconds: changes in FHR, -46 [(-55) – (-17)] % and changes in MAP, 27 [17-27] %).

**Table 4. Comparison of the concentrations of fetal arterial blood gases and lactate measured in the ascending aorta at baseline and at 30 seconds of cord occlusion (n=5).**

Blood gases	Baseline	30s during occlusion	p-value
pH	7.36 (7.36-7.37)	7.37 (7.37-7.37)	0.38
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	47.4 (44.5-48.1)	42.8 (42.4-44.1)	0.06
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	21 (21-23)	21 (20-22)	0.85
Lactates (mmol/L)	1.46 (1.43-1.49)	1.32 (1.29-1.34)	0.13

Data are expressed as median interquartile range (IQR) (first–third interquartile). p-value: Wilcoxon signed-rank non-parametric test.

## Discussion

Deceleration of FHR is common during labor and reflects fetal compensation in response to hypoxia during uterine contractions [2]. The present study examined our understanding of fetal cardiovascular adaptation and the role of the ANS during 1-minute complete UCO and during the recovery period.

Our results describe the respective role of the parasympathetic and sympathetic systems during and after brief but complete UCO. Cord compression induces a rapid decrease in the FHR and a rapid increase in MAP. The decrease in FHR is caused by

an increase in parasympathetic activity, because we have shown that atropine abolishes the FHR response to UCO. Myocardial  $\beta$ -adrenoceptor activity is not involved in the decrease in FHR during the occlusion period because propranolol does not change the FHR response to UCO. This is further supported by similar FHR values obtained with the atropine and atropine-propranolol protocols.

After releasing UCO, the FHR was still lower than that at baseline due to a sustained parasympathetic tone. Suppression of the parasympathetic output to the cardiovascular system unmasks an increase in the FHR above baseline values. The lower HR with the propranolol-atropine protocol than with the atropine alone protocol further supports an increase in myocardial  $\beta$ -adrenoceptor stimulation after cord release. Four minutes after UCO release, the FHR returned to baseline irrespective of the drugs that were infused, thereby showing recovery of ANS control.

Taken together, these results indicate that the brief and complete UCO-induced hemodynamic response results mainly from acute activation of the parasympathetic and sympathetic output. The early hemodynamic response to UCO is not related to changes in PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, or arterial pH. After releasing UCO, parasympathetic output was elevated and myocardial  $\beta$ -adrenoceptors were stimulated within the first 60 seconds. Therefore, our data confirm that during complete UCO, the key role of parasympathetic tone is in controlling the FHR, and the key role of sympathetic tone is in controlling MAP. However, during the 1-minute UCO, we found no effect due to the sympathetic tone in controlling the FHR and no changes in fetal blood gases.

Lear et al. have discussed the physiology of heart rate decelerations and the involvement of several reflexes [3]. Activation of the chemoreflex can lead to FHR deceleration and increase in MAP via peripheral (carotid body) and central chemoreceptors, which increase both sympathetic and parasympathetic activities [15].



The chemoreflex is triggered by the decrease of PaO<sub>2</sub> or pH, or an increase in PaCO<sub>2</sub> [15,16]. However, experimental studies of brief repeated asphyxia in fetal sheep have never shown a significant immediate decrease in PaO<sub>2</sub> or pH, or an increase in PaCO<sub>2</sub> at the beginning of the first occlusion; it has only occurred after a few minutes of asphyxia [5,6,17,18]. Our results do not support the activation of the chemoreflex as the cause of FHR deceleration and MAP increase, at least during the early phase of the 1-minute UCO-induced HR deceleration. This is because blood was sampled from the catheter placed in the ascending aorta, i.e., upstream of the carotid body or central chemoreceptors, and we did not observe any changes in the arterial blood gases and plasma lactate concentration at 30 seconds of UCO. Previous studies have highlighted that chemoreflex activation is delayed by 6 seconds after the carotid body or central chemoreceptors have sensed a change in pH, PaO<sub>2</sub>, or PaCO<sub>2</sub> [16,20]. This further delays the possible activation of the chemoreflex when chemoreceptors have sensed a change in blood gases. In Künzel's study, fetal saturation decreased during complete cord occlusion [21]. However, contrary to our study, the arterial catheters were placed into the descending aorta, which is located after the ductus arteriosus. Lear et al. has shown that the cerebral oxygenation, measured as the difference between oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin, fell in parallel with FHR until the FHR nadir [22]. Moreover, previous studies reported that the main stimulus of peripheral chemoreceptors at the carotid body is the fall in PaO<sub>2</sub> rather than O<sub>2</sub> content (which is determined by the hemoglobin concentration and its saturation) [19,20]. PaO<sub>2</sub> did not change during the first 30 seconds of UCO. It is likely then that the decrease in oxygenation results mainly from UCO-induced drop in cardiac preload. Indeed, oxygenation may decrease despite no change in preductal PaO<sub>2</sub> through a drop in cardiac output. Furthermore, we cannot exclude that the postductal PaO<sub>2</sub> may

decrease earlier than the preductal PaO<sub>2</sub>, as the right ventricular blood flow is less dependent on the umbilical blood flow than the left ventricle. During 1 minute of UCO, we saw no evidence of a change in myocardial  $\beta$ -adrenoceptor activity on the FHR. Lear et al. also found that the FHR was significantly lower in the propranolol group during all three UCOs and inter-occlusion periods [23]. Moreover, Galinsky et al showed a difference in deceleration between the control and propranolol groups [5]. However, the experimental procedure was different, as the umbilical cord was occluded for 2 min. In the Galinsky study, the difference in FHR between the two groups occur mainly after the first min of UCO or after successive UCO. However, in both studies, FHR baselines were different between the control and propranolol protocols. In our study, FHR was expressed as % of change from baseline to compare the FHR changes between groups, rather than absolute values of FHR. Our data provide evidence that FHR change during the 1-min UCO is not influenced by  $\beta$ 1-adrenoceptors activity at least at 10, 30, and 60 seconds. Lear et al. highlighted that sympathetic activation has limited effects on FHR during repeated episodes of brief UCO, indicating that the regulation of FHR may be due to other stimuli, such as adrenal catecholamines [10]. This finding is in accordance with our results, showing similar FHR responses during 1-min UCO with or without  $\beta$ 1-adrenoceptor blockade. We did not measure blood catecholamines. There is evidence that adrenal catecholamine plasma concentrations increase after a 2 min-UCO [6]. However, the kinetics of the catecholamines release from the adrenals during UCO is unknown. Therefore, the role of the adrenal catecholamines on the FHR is presently unclear, at least during the first min of the UCO. Chemoreflex activation is usually associated with an increase in sympathetic output to increase the MAP [6,15]. Galinsky et al. have concluded, in a model of sympathectomy using 6-hydroxydopamine (6-OHDA) with 2 minutes of UCO,

that the sympathetic nervous system supports arterial blood pressure during prolonged exposure to brief repeated UCO with metabolic acidosis. They found that in the 6-OHDA group, only the first UCO was associated with an initial fall in MAP that was recorded over the remainder of the occlusion period. Thereafter, sympathectomy was associated with an initial rapid increase in MAP during occlusion [6]. We did not study the role of the sympathetic nervous system on the peripheral vasoconstriction during UCO. In the Galinsky and the Lear studies, during 2 minutes of UCO,  $\beta$ -adrenoceptor blockade did not modify the MAP response during the first minute of UCO, but only during the second minute [5,23]. These results are inconsistent with our findings. The increase in arterial pressure during UCO may be mediated by peripheral vasoconstriction, suggesting an increase in sympathetic tone or in adrenal catecholamines release, as  $\alpha$ -adrenergic peripheral agonist. We may speculate that the adaptive response to UCOs during  $\beta$ -adrenoceptor blockade by  $\alpha$ -adrenergic peripheral vasoconstriction could be inconsistent, and a reason why MAP remained stable during the 1 minute of UCO in our study. However, we did not evaluate  $\alpha$ -adrenergic blockade in our study. Alternatively, as described by Künzel et al., the initial rise in arterial pressure may be explained by the sudden redistribution of the placental fraction of the cardiac output following UCO to the blood flow that perfused high resistive fetal tissue [21]. Inotropic effects of  $\beta$ 1-adrenoceptor activation may be required to support the increase in fetal arterial pressure during brief UCO. In that condition, peripheral chemoreflex activation and sympathetic activation-mediated peripheral vasoconstriction may not be required to explain the initial rise in arterial pressure during UCO. Conversely, our data suggest that basal  $\beta$ -adrenoceptor activity is involved in sustaining the elevation of arterial pressure during cord occlusion. The inotropic role of myocardial  $\beta$ -adrenergic activity associated with  $\alpha$ -adrenergic

peripheral activities could explain the rise in MAP observed during 1-minute of UCO. Moreover, during UCO with the atropine protocol, Galinsky et al. observed a rise in MAP [5]. We similarly observed that MAP increased with both atropine and control protocols. They concluded that the rise of MAP in the atropine group reflects maintenance of the FHR and combined ventricular output. Indeed, immediately after UCO release, we found a higher rise in MAP with the atropine protocol than with the control protocol, which could be explained by the rise in FHR and combined ventricular output.

Other studies have suggested that rapid deceleration could result from baroreflex activation [2,24]. In the present study, UCO induced a rapid and sustained elevation in arterial pressure, which triggered the baroreflex. Cord clamping at birth is considered one of the main causes of immediate elevation in blood pressure. Placental vascular resistance is low compared to other tissues; therefore, suppression of placental circulation elevates systemic vascular resistance and leads to an increase in blood pressure [24]. However, increased blood pressure is not required to trigger deceleration during UCO, as demonstrated by Lear et al. [3]. Moreover, the baroreflex is sympatho-inhibitory [3]. Therefore, our results, as well as previous studies, do not support the hypothesis that FHR deceleration during 1 minute of UCO results from baroreflex activation alone [22].

After releasing cord compression, both sympathetic activity and parasympathetic activity increased. Sixty seconds after cord release, MAP was still higher than that at baseline due to sustained stimulation of myocardial  $\beta$ -adrenoceptors, which propranolol prevented. Moreover, an increase in the parasympathetic tone was still present at that time because arterial pressure was higher after atropine injection than it was in control fetal lambs. At 4 minutes after

occlusion, no difference in blood pressure was found among the protocols when observing for change in FHR, suggesting that ANS activity returned to baseline. Sympathetic activation may indicate chemoreflex activation during this period, as suggested by previous studies [5,6]. An increase in sympathetic activity may explain the sustained increase in blood pressure despite cord release and restoration of the low-resistance placental circulation [5,6,25]. Activation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors may increase peripheral vasoconstriction and ventricular output [5,6].

Our results provide additional insight regarding the role of the ANS during labor and delivery. Variable decelerations in the FHR are commonly seen on the cardiotocogram, which is used to monitor fetal well-being [1,2]. Labor is characterized by intermittent and brief episodes of hypoxia (no more than 1 to 2 minutes) during uterine contractions [1,2]. These decelerations may result, at least in part, from umbilical cord compression, such as during cord prolapse. However, cord compression is unlikely to be the main cause of FHR decelerations in the majority of labors [7,8,9]. Indeed, fetal head compression has been reported, by Parer et al., to be responsible for early FHR decelerations, due to a transient change in cerebral blood flow resulting in vagal discharge [26]. They theorize that cord occlusion is likely the cause of many variable FHR decelerations in the first stage of active labor, and that head compression is responsible for decelerations in the second stage of labor [25]. However, Lear et al concluded that fetal head compression was unlikely to be a major contributor to intrapartum decelerations during the majority of labors [3,27]. However, as described by Parer and Lear, vagal reflex is involved in FHR deceleration whatever the etiology (umbilical cord compression or head compression or both) (26, 27). Understanding the nature of the reflexes involved in deceleration may help us understand what causes changes in fetal homeostasis and the response of the fetus. Sympathetic activity is

essential for maintaining peripheral vasoconstriction and arterial pressure during repeated cord compression [5,10]. Parasympathetic activity is involved in the decrease in FHR, as observed in daily clinical practice. Understanding the physiological control of adaptation is of fundamental importance to recognizing when fetal autonomic adaptation is no longer efficient for the fetus.

Our study had several limits. First, despite many similarities existing between sheep and human gestation, the reproducibility of our observations and the extrapolation to the human fetus must be considered with caution. Second, although our model did not use or accurately represent a specific insult during labor, we evaluated FHR deceleration in UCO using methods described by others [5,6,10,17]. Even if UCO is one of the causes of fetal bradycardia, the conclusion may be interpreted only in the case of complete and brief UCO during labor, particularly during cord prolapse. Other mechanisms have been described, such as placenta or head compression, but the conclusions cannot be extrapolated to this present study [7,8]. Moreover, we did not evaluate the effect of uterine contractions on the onset of FHR decelerations, as observed in human fetuses, or the role of uterine contractions on sympathetic or parasympathetic stimulation during labor. Indeed, uterine contractions could induce a sympathetic response in fetuses to prevent heart rate decelerations, as manifested by an acceleration during the contraction. The sheep fetus has no forewarning of the occlusion, no premonitory increase in intrauterine pressure or option for anticipatory sympathetic output. It would be important to illustrate these responses in the experimental animals as well. Moreover, we did not study the vasomotor component, which would provide greater insight of reflexes. In addition, before occlusion, lactate levels were between 1 and 2 mmol/l. However, other parameters were normal, and the literature reported the same lactate levels [28]. In addition, we

did not study the vasomotor component. We did not perform protocol with  $\alpha$ -blockade. Moreover, we did not attempt to distinguish between the reflexes, the aim was to examine the role of the parasympathetic and sympathetic activity in changes in FHR and in arterial pressure during UCO. Furthermore, we performed blood gas analysis for the control protocol in another group of ewes, in order not to change the hemodynamic during blood sampling. However, this separate cohort had FHR deceleration and hypertension during cord occlusion. We found no modification in blood gases, especially in PaO<sub>2</sub>. Unfortunately, we did not measure hemoglobin saturation and oxygen content in this study. However, it is likely that neither hemoglobin saturation nor oxygen content change at 30 seconds of the occlusion as none of the main factors involved in the equation of Severinghaus changed (pH, PCO<sub>2</sub>) [29]. Finally, we did not perform blood gases in the other protocols, but blood gases are not modified by atropine and propranolol injection, as demonstrated by others [5,11].

## Conclusion

This study investigated the role of parasympathetic activity and sympathetic activity in FHR and arterial pressure during and after UCO. One minute of UCO-induced FHR deceleration was caused by an elevation in parasympathetic activity, which was not triggered by a change in arterial blood gas concentrations or an elevation in blood pressure. Furthermore, we showed that myocardial  $\beta$ -adrenoceptor activity and changes in blood gases were not involved in this response, while  $\beta$ -adrenoceptor activity is involved in the increase in MAP. These results indicate that it is possible that the baroreflex and chemoreflex are not the only reflexes involved during

the early phase of UCO-induced FHR deceleration. Several methods use FHR variability, which reflects ANS control of the sinus node, to assess fetal well-being [30,31]. Further studies are required to gain a better understanding of how the fetal autonomic system adapts over time to decreases in PaO<sub>2</sub> and to hypoxia after repeated UCO.

## Acknowledgments

Pregnant ewes were hosted and cared for in the Experimental Research Department of Lille University Hospital under the direction of Prof. T. Hubert (agreement D59-35010). We would like to thank Editage ([www.editage.com](http://www.editage.com)) for English language editing.

## References

1. Ugwumadu A. Are we (mis)guided by current guidelines on intrapartum fetal heart rate monitoring? Case for a more physiological approach to interpretation. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 2014;121: 1063-1070.
2. Pinas A, Chandraharan E. Continuous cardiotocography during labour: Analysis, classification and management. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016;30: 33-47.
3. Lear CA, Galinsky R, Wassink G, Yamaguchi K, Davidson JO, Westgate JA, et al. The myths and physiology surrounding intrapartum decelerations: the critical role of the peripheral chemoreflex. *J Physiol.* 2016;594: 4711-4725.
4. Garabedian C, De Jonckheere J, Butruille L, Deruelle P, Storme L, Houfflin-Debauge V. Understanding fetal physiology and second line monitoring during labor. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2017;46: 113-117.
5. Galinsky R, Lear CA, Yamaguchi K, Wassink G, Westgate JA, Bennet L, et al. Cholinergic and  $\beta$ -adrenergic control of cardiovascular reflex responses to brief repeated asphyxia in term-equivalent fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016;311:R949-R956. doi: 10.1152/ajpregu.00340.2016. Epub 2016 Sep 21.



6. Galinsky R, Jensen EC, Bennet L, Mitchell CJ, Gunn ER, Wassink G, et al. Sustained sympathetic nervous system support of arterial blood pressure during repeated brief umbilical cord occlusions in near-term fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014;306: R787-R795.
7. Sholapurkar SL. Is the hypothesis that the commonest fetal heart rate decelerations are caused by peripheral chemoreflex due to fetal hypoxaemia correct? *J Physiol.* 2017;595: 6077-6080.
8. Sholapurkar SL. Critical imperative for the reform of British interpretation of fetal heart rate decelerations: Analysis of FIGO and NICE guidelines, post-truth foundations, cognitive fallacies, myths and Occam's razor. *J Clin Med Res.* 2017;9: 253-265.
9. Sunderström A, Rosén D, Rosén KG. EFM physiology. *Fetal Surveillance.* Neoventa Medical: Mölndal, Sweden; 2000
10. Lear CA, Galinsky R, Wassink G, Mitchell CJ, Davidson JO, Westgate JA, et al. Sympathetic neural activation does not mediate heart rate variability during repeated brief umbilical cord occlusions in near-term fetal sheep. *J Physiol.* 2016;594: 1265-1277.
11. Garabedian C, Champion C, Servan-Schreiber E, Butruille L, Aubry E, Sharma D, et al. A new analysis of heart rate variability in the assessment of fetal parasympathetic activity: An experimental study in a fetal sheep model. *PloS One.* 2017;12: e0180653.
12. Sharma D, Coridon H, Aubry E, Houeijeh A, Houfflin-Debarge V, Besson R, et al. Vasodilator effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on fetal pulmonary circulation: An experimental study in pregnant sheep. *PloS One.* 2018;13: e0198778.
13. Garabedian C, Aubry E, Sharma D, Bleu G, Clermont-Hama Y, Ghesquière L, et al. Exploring fetal response to acidosis in ewes: Choosing an adequate experimental model. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2018;47: 397-403. doi: 10.1016/j.jogoh.2018.04.007. Epub 2018 Apr 11.
14. De Jonckheere J, Logier R, Dassonneville A, Delmar G, Vasseur C. PhysioTrace: An efficient toolkit for biomedical signal processing. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2005;2005: 6739-6741.
15. Lear CA, Wassink G, Westgate JA, Nijhuis JG, Ugwumadu A, Galinsky R, et al. The peripheral chemoreflex: indefatigable guardian of fetal physiological adaptation to labour. *J. Physiol* 2018;596: 5611-5623.
16. Kumar P, Prabhakar NR. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol.* 2012;2:141-219.
17. Bennet L, Rossenrode S, Gunning MI, Gluckman PD, Gunn AJ. The cardiovascular and cerebrovascular responses of the immature fetal sheep to acute umbilical cord occlusion. *J Physiol.* 1999;517(Pt 1): 247-257.

18. Bennet L, Westgate JA, Liu Y-CJ, Wassink G, Gunn AJ. Fetal acidosis and hypotension during repeated umbilical cord occlusions are associated with enhanced chemoreflex responses in near-term fetal sheep. *J Appl Physiol*. 2005;99: 1477-1482.
20. Kara T, Narkiewicz K, Somers VK. Chemoreflexes--physiology and clinical implications. *Acta Physiol Scand*. 2003;177: 377-384.
21. Künzel W, Mann LI, Bhakthavathsalan A, Airomlooi J. Cardiovascular, metabolic and fetal brain function observation following total cord occlusion. *J Perinat Med*. 1980;8:73-84.
22. Lear CA, Kasai M, Booth LC, et al. Peripheral chemoreflex control of fetal heart rate decelerations overwhelms the baroreflex during brief umbilical cord occlusions in fetal sheep [published online ahead of print, 2020 Jul 23]. *J Physiol*. 2020;10.1113/JP279573.
23. Lear CA, Beacom MJ, Kasai M, et al. Circulating catecholamines partially regulate T wave morphology but not heart rate variability during repeated umbilical cord occlusions in fetal sheep [published online ahead of print, 2020 Jun 3]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
24. Nageotte MP. Fetal heart rate monitoring. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2015;20: 144-148.
25. Gaillot T, Beuchée A, Jaillard S, Storme L, Nuyt AM, Carré F, et al. Influence of sympathetic tone on heart rate during vagal stimulation and nitroprusside induced hypotension in ovine fetus. *Auton Neurosci Basic Clin*. 2005;123: 19-25.
26. Parer JT. Obstetrics and gynecology-epitomes of progress: two mechanisms of late decelerations: reflex and myocardial hypoxia. *West J Med*. 1981;1346:530-531.
27. Lear CA, Galinsky R, Wassink G, et al. Reply from Christopher A. Lear, Robert Galinsky, Guido Wassink, Kyohei Yamaguchi, Joanne O. Davidson, Jenny A. Westgate, Laura Bennet and Alistair J. Gunn. *J Physiol*. 2017;595:6081-6083.
28. Ross MG, Jessie M, Amaya K, et al. Correlation of arterial fetal base deficit and lactate changes with severity of variable heart rate decelerations in the near-term ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208:285.e1-285.e2856.
29. Collins JA, Rudenski A, Gibson J, Howard L, O'Driscoll R. Relating oxygen partial pressure, saturation and content: the haemoglobin-oxygen dissociation curve. *Breathe (Sheff)*. 2015;11:194-201.
30. Romano M, Iuppriello L, Ponsiglione AM, Improta G, Bifulco P, Cesarelli M. Frequency and time domain analysis of foetal heart rate variability with traditional indexes: A critical survey. *Comput Math Methods Med*. 2016;2016: 9585431.
31. Shaw CJ, Allison BJ, Itani N, Botting KJ, Niu Y, Lees CC, et al. Altered autonomic control of heart rate variability in the chronically hypoxic fetus. *J Physiol*. 2018;596: 6105-6119. doi: 10.1113/JP275659. Epub 2018 Apr 29.



## **ANNEXE 2**

05 May 2020

O. Ortmann

Editor-in-Chief

*Archives of Gynecology and Obstetrics*

Dear Editor:

I wish to submit an original article for publication in the *Archives of Gynecology and Obstetrics*, titled "Opioid Effect on the Autonomic Nervous System in a Fetal Sheep Model." The paper was coauthored by Charles Garabedian, Estelle Aubry, Dyuti Sharma, Laura Butruille, Laurent Storme, and Julien De jonckheere.

This experimental study aimed to evaluate the effect of administration of nalbuphine on the gasometric, cardiovascular, and autonomic nervous systems' responses in fetal lamb. We believe that our study makes a significant contribution to the literature because the effect of nalbuphine on different HRV markers and on fetal hemodynamic and gasometric status has not been taken up in previous studies.

Further, we believe that this paper will be of interest to the readership of your journal because our findings provide important clinical guidelines for obstetricians to avoid unnecessary interventions. Maternal injection of nalbuphine leads to fetal heart fluctuations directly caused by the effect of opioid on the autonomic nervous system, and does not reflect acidosis.

This manuscript has not been published or presented elsewhere in part or in entirety and is not under consideration by another journal. The study design was approved by the appropriate ethics review board. We have read and understood your journal's policies, and we believe that neither the manuscript nor the study violates any of these. There are no conflicts of interest to declare.

Thank you for your consideration. I look forward to hearing from you.

Sincerely,

Morgan Recher

Jeanne de Flandre Hospital, University of Lille Nord de France

1 rue Eugène Avinée, 59037 Lille Cedex, France

Tel: +33 3 20 44 66 26

Fax: +33 3 20 44 63 11

Mail: [morgan.recher@chru-lille.fr](mailto:morgan.recher@chru-lille.fr)

## **Opioid Effect on the Autonomic Nervous System in a Fetal Sheep Model**

Morgan Recher<sup>1,2</sup>. Charles Garabedian<sup>1,3</sup>. Estelle Aubry<sup>1,4</sup>. Dyuti Sharma<sup>1,4</sup>. Laura Butruille<sup>1</sup>. Laurent Storme<sup>1,5</sup>. Julien De jonckheere<sup>1,6</sup>

Study conducted in University of Medicine, Lille, Haut-de-France, France,

1. Univ. Lille, ULR 2694 – METRICS : Evaluation des technologies de santé et des pratiques médicales, F-59000 Lille, France
2. CHU Lille, Department of Paediatric Intensive Care Unit, Jeanne de Flandre Hospital, F-59000, Lille, France
3. CHU Lille, Department of obstetrics, Jeanne de Flandre Hospital, F-59000, Lille, France
4. CHU Lille, Department of Pediatric surgery, Jeanne de Flandre Hospital, F-59000, Lille, France
5. CHU Lille, Department of Neonatology, Jeanne de Flandre Hospital, F-59000, Lille, France
6. CHU Lille, CIC-IT 1403-biosensor and e-health, F-59000, Lille, France

### **Corresponding author:**

Morgan Recher, MD, MS

Jeanne de Flandre Hospital, University of Lille Nord de France, 1 rue Eugène Avinée, 59037 Lille Cedex, France

Tel: +33 3 20 44 66 26

Fax: +33 3 20 44 63 11

Mail: [morgan.recher@chru-lille.fr](mailto:morgan.recher@chru-lille.fr)

[ORCID](https://orcid.org/0000-0002-6513-5083) : 0000-0002-6513-5083

## **ABSTRACT**

*Purpose:* Opioid use during labour can interfere with cardiotocography patterns. Heart rate variability indirectly reflects a fluctuation in the autonomic nervous system and can be monitored through time and spectral analyses. This experimental study aimed to evaluate the impact of nalbuphine administration on the gasometric, cardiovascular, and autonomic nervous system responses in fetal sheep.

*Methods:* This was an experimental study on chronically instrumented sheep fetuses (surgery at 128 +/- 2 days of gestational age, term = 145 days). The model was based on a maternal intravenous bolus injection of nalbuphine, a semisynthetic opioid used as an analgesic during pregnancy. Fetal gasometric parameters (pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, and lactates), hemodynamic parameters (fetal heart rate and mean arterial pressure), and autonomic nervous system tone (short-term and long-term variation, low-frequency domain, high-frequency domain, and fetal stress index) were recorded. Data obtained at 30 and 60 min after nalbuphine injection were compared to those recorded at baseline.

*Results:* Eleven experiments were performed. Fetal heart rate, mean arterial pressure, and activities at low and high frequencies were stable after injection. Short-term variation decreased at T30 min (P = 0.02), and long-term variation decreased at T60 min (P = 0.02). Fetal stress index gradually increased and reached significance at T60 min (P = 0.02). Fetal gasometric parameters and lactate levels remained stable.

*Conclusion:* Maternal nalbuphine use during labour may lead to fetal heart changes that are caused by the effect of opioid on the autonomic nervous system; these fluctuations do not reflect acidosis.



**Keywords:** autonomic nervous system; fetal heart rate; fetal sheep; labour; nalbuphine; opioid

## **Declarations**

**Funding:** Not applicable

**Conflict of interest/Competing interests:** Not applicable

**Ethics approval:** All animal procedures and protocols used in this study were reviewed and approved by an Institutional Ethical Committee for Experimental Research (CEEA # 2016121312148878).

**Consent to participate:** Not applicable

**Consent for publication:** Not applicable

**Availability or data and material:** Not applicable

**Code availability:** Not applicable

**Author contributions:** M Recher: Protocol/project development, Data collection or management, Data analysis, Manuscript writing/editing. C Garabedian Protocol/project development, Manuscript writing/editing. E Aubry: Protocol/project development, Data collection or management. D Sharma: Protocol/project development, Data collection or management. L Butruille: Data analysis. L Storme: Protocol/project development, Data analysis, Manuscript writing/editing. J De jonckheere: Protocol/project development, Data analysis, Manuscript writing/editing.

**Acknowledgments:**

We would like to thank Editage (<http://www.editage.cn>) for English language editing of the manuscript.

## Introduction

Parenteral opioids for pain relief during labour or Braxton Hicks contractions are widely used for providing analgesia, as an alternative to epidural analgesia. In such cases, nalbuphine, a mixed agonist-antagonist opioid, is commonly used [1].

The effect of opioids on fetal heart rate (FHR) has been studied, with reduction of variability, using drugs such as buprenorphine [2]. Opioids exert their action on the autonomic nervous system (ANS). Analysis of the heart rate variability (HRV) reveals activities of the sympathetic and parasympathetic nervous systems on the sinus node. There are several methods of HRV analysis, such as time domain and spectral analyses [3]. The time domain analysis includes indices used in clinical practice such as long-term variation (LTV) and Short-term variation (STV), especially in cases of intrauterine growth restriction (IUGR) [3-5]. HRV spectral analysis focuses on the following two main frequency domains: a low-frequency (LF) domain ranging from 0.04 to 0.15 Hz, which is affected by both sympathetic and parasympathetic activities, and a high-frequency (HF) domain, up to 0.15 Hz, which is mainly affected by parasympathetic activity [6]. Several authors have demonstrated the ability of HRV spectral analysis to predict fetal acidosis [7,8]. We developed the fetal stress index (FSI), based on an original method for HRV analysis [9]. In previous experimental studies, we have showed that this index is more specific for parasympathetic fluctuations than commonly used HRV markers and is associated with fetal acidosis [9,10].

Jeanne et al. showed that injection of opioids directly caused changes in adult HRV [11]. Giannina et al. observed that maternal injections of nalbuphine decreased the number of FHR accelerations, STV, and LTV [12]. However, no study has reported

the effect of nalbuphine on various HRV markers and on the fetal hemodynamic and gasometric statuses.

Hence, this experimental study aimed to investigate the impact of maternal nalbuphine injections on i) fetal HRV (both time and spectral analyses), ii) fetal blood parameters, and iii) fetal hemodynamic status in a fetal sheep model.

## **Materials and Methods**

### *Ethical statement*

All animal procedures and protocols used in this study were reviewed and approved by an Institutional Ethical Committee for Experimental Research (CEEA # 2016121312148878). The anaesthesia, surgery and experimentation protocols were performed in accordance with the guidelines for animal use specified by the European Union Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) and the French Ministry of Higher Education and Research.

### *Surgery and instrumentation*

We conducted an experiment on a fetal sheep model (Pré-Alpes Sud sheep, INRA, Leudeville, France). Anaesthetic and surgical technique protocols previously described by our team and in the literature were followed [9,13-17]. Sheep underwent surgical procedure at  $125\pm 3$  days of gestation (term = 140-145 days), under general anesthesia. Before surgery, the sheep were placed in a supine position, anesthetized with xylazine (IM Sedaxylan®, CEVA Santé Animale, France, half-life 30 minutes), intubated, and maintained with isoflurane 2% (IsoFlo®, Zoetis, France). Buprenorphine was used for analgesia (Buprénodale®, RechraVeterinary Products, France, half-life 6 hours). After abdominal incision, a hysterotomy was performed. The fetus received Buprenorphine (IM Buprénodale®, RechraVeterinary Products, France, half-life 6 hours) and subcutaneous lidocaine hydrochloride (Xylocaïne® Astrazeneca, France, half-life 2 hours). Fetal left posterior limb was delivered through a hysterotomy. Two 4Fr diameter catheters (Arrow, USA) were advanced into the descending aorta and the inferior vena cava after insertion into the femoral artery and vein, respectively. A Doppler probe was placed around the common umbilical artery to measure the heart

rate. One 5Fr diameter catheter (Arrow, USA) was placed into the amniotic cavity to measure baseline pressure (intra-amniotic pressure, IAP). The catheters were exteriorized through a subcutaneous tunnel to an external flank pouch. Experiments were performed after a minimum recovery time of 48 h.

### *Study Design*

The experiments were carried out in the afternoon. We planned to perform 3 experiments in each fetus with a recovery period of 24 hours. In the event of death of the ewe, fetus, or problems during the experiments, other ewes were included to complete the protocol in order to guaranty a minimum of 10 experiments. To ensure fetal well-being (hemodynamic and blood gas analysis) before beginning the experiment, a first 60-min period (stability period) was recorded. Maternal sheep received intravenous bolus injection of 20 mg nalbuphine (Nalbuphine Mylan, Mylan, Pittsburgh, USA). To investigate the effects of 20 mg nalbuphine on FHR variability and cardiovascular response, we recorded the MAP, IAP, FHR, and FSI throughout the study period. The duration of each experiment was 60 min. We defined 4 periods: the baseline at 30 min before injection (T-30), 10 min after injection (T10), 30 min after injection (T30), and 60 min after injection (T60). Fetal blood gases were measured before and at 60 and 90 min after nalbuphine injection (adjusted on ewe's physiological temperature of 39°C; i-Stat Handheld ©, Abbot, USA).

### *Physiologic measurements*

Mean arterial pressure (MAP) was referenced to the amniotic cavity pressure (calculated  $MAP = observed\ MAP - observed\ IAP$ ). Heart rate was determined from the phasic umbilical blood flow signal. Blood samples from the femoral artery catheters

were used for blood gas analysis. All hemodynamic data were recorded using the software Physiotrace (Estaris monitoring, Lille, France) [18].

### *Heart rate variability*

The fetal ECG signal was recorded using the Physiotrace data acquisition board (Estaris monitoring, Lille, France), and ECG analysis was performed off-line using an automatic R wave detection algorithm. First, the electrocardiogram signal was digitized at 250 Hz. HRV was measured using the time interval between two heartbeats detected on the ECG signal. R-R series were then filtered to obtain an R-R series without artefacts. The result was then re-sampled at 8 Hz through a linear interpolation algorithm, as recommended by the task force of the European Society of Pacing and Electrophysiology [6]. The signal was then isolated on a 64-s moving window for HRV computation.

HRV spectral analysis was performed by evaluating the HF, LF, and normalized HFnu =  $HF/(HF + LF)$ . STV and LTV indexes were computed using the algorithm published by Dawes [19]. STV was defined as the mean FHR difference between successive 3.75 s R-R intervals epochs over 1 min. LTV or mean minute range referred to fluctuations in the FHR over seconds, and the difference between the minimum and maximal values of mean FHR of the different epochs was analysed over 1 min.

FSI computation was previously described [9,10]. The resampled R-R series was normalized and automatically high-pass filtered over 0.15 Hz, corresponding to high frequencies reflecting the parasympathetic activity. Local minimum and maximum values were detected to plot minimum and maximum envelopes. The 64-s window was divided into four 16-s sub windows, and the areas under the lowest and highest envelopes were computed in each sub-window (A1, A2, A3, and A4). The lowest area



was computed as  $AUC_{min} = \min (A1, A2, A3, A4)$  and  $FSI = 100 \times (5.1 \times AUC_{min} + 1.2) / 12.8$ .

### *Data analysis*

Non-parametric Friedman test was performed for repeated measures. Pre-injection and post-injection periods for each experiment were compared by a Wilcoxon non-parametrical test with Bonferroni correction. Hemodynamic parameters are presented as median IQR [first–third interquartile]. Results are presented as median IQR [first–third interquartile] for STV, LTV, LF, HF, HFnu, and FSI measurements. Values of  $P < 0.05$  were considered to denote significant differences. In each experiment,  $n$  represents the number of studied fetuses. Data were managed with the R software version 3.4.1 that is available online.

## Results

Four sheep underwent operation, and 11 experiments were performed. The FHR was 153 [147-161] bpm before the injection of nalbuphine. It changed to 159 [148-170] bpm at T30 min and to 161 [156-171] bpm at T60 min (**Fig. 1**); however, the change was not significant. Moreover, fetal MAP also remained largely constant, changing from 41 [40-45] mm Hg before injection to 40 [37-44] mm Hg at T30 min and to 38 [36-43] mm Hg at T60 min.

However, for fetal STV, Friedman test was statistically significant ( $P=0.04$ ). Fetal STV showed a significant decrease from 4.4 [2.9-4.9] ms before nalbuphine injection to 2.0 [1.5-3.5] ms at T30 min after injection ( $P=0.02$ ) and to 1.9 [1.5-2.7] ms at T60 min ( $P=0.04$ ). Similarly, for fetal LTV, Friedman test was statistically significant ( $P=0.02$ ). Fetal LTV also showed a significant decrease from 27.2 [18.2-34.7] ms before injection to 16.2 [8.9-19.6] ms at T60 min ( $P=0.02$ ) (**Fig. 2**).

The LF after injection remained largely similar to that at baseline, only changing from 0.034 [0.025-0.062] before injection to 0.034 [0.022-0.053] at T30 min, and 0.052 [0.020-0.056] at T60 min ( $P=0.51$ ). Similarly, HF also remained largely similar, only changing from 0.019 [0.015-0.064] before injection to 0.018 [0.012-0.037] at T30 min and 0.026 [0.011-0.055] at T60 min ( $P=0.62$ ) (**Fig. 3**). However, for HFnu, Friedman test was statistically significant ( $P=0.005$ ). HFnu increased from 0.31 [0.17-0.39] at baseline to 0.42 [0.32-0.45] at T30 min ( $P=0.32$ ) and to 0.45 [0.36-0.51] at T60 min ( $P=0.004$ ). For FSI, Friedman test was statistically significant ( $P=0.02$ ). The FSI gradually increased from 52.0 [48.5-53.8] at baseline to 61 [58-64.5] at T30 min ( $P=0.09$ ) and to 63.5 [60.5-65.8] at T60 min ( $P=0.02$ ) (**Fig. 4**).

No changes in fetal blood gas levels were observed during the experiment (**Table 1**).



## Discussion

Opioid use has become a major public health issue and its impact on FHR, fetal hemodynamic, and gasometric status remains unclear.

### *Principle finding:*

In this study, nalbuphine injection did not influence hemodynamic and gasometric fetal parameters. However, it modified several fetal HRV indexes: STV and LTV decreased after nalbuphine injection, while HFnu and FSI increased. The modifications to HRV indexes were not linked to acidosis but to the fluctuations in ANS activity caused by opioids.

In human, Nicolle et al. showed a feto-maternal transfer of nalbuphine with a flattening of the fetal heart rate in 54% of fetuses, 5 min after intravenous injection or 15 min after intramuscular injection [20]. Nalbuphine is a common therapeutic drug used in pregnant women during early labour or in case of Brixton Hicks contractions. It is an agonist-antagonist morphinic that acts on a  $\mu$ -selective opioid receptor, without teratogen effects [21,22]. The measurement of nalbuphine concentrations in umbilical cord blood demonstrated that nalbuphine can cross the placental barrier and enter the fetal circulation [23,24]. The cardiovascular effects of a  $\mu$ -selective opioid have also been studied in fetal sheep. Holsey et al. have studied fetal effects of administering Tyrosine-D-arginine-phenylalanine-lysine-NH<sub>2</sub>, a  $\mu$ -selective opioid agonist. Intravenous bolus doses of 0.1 to 0.5 mg/kg administered directly to the fetus showed an increase in FHR to reach a peak between 50 and 70 minutes and lasting at least 120 minutes, but no change in fetal blood pressure. The increase in FHR was blocked by naloxone and beta-blocker, suggesting that the tachycardia response may be regulated via sympathetic activation [25]. Sherer et al. have described a case of a

resolution of a fetal tachycardia 2 hours after maternal intravenous injection of nalbuphine, throughout 40 minutes, where the fetus transitioned from an awake state to a quiet state after injection [26]. Guillonneau et al. described a rapid fetal bradycardia at 60 bpm after maternal injection of 10 mg of nalbuphine and a reduction of FHR variability [27]. Administration of the opiate agonist U-50,488H to the fetal lamb increased the FHR immediately for a period of 15 min [28]. This increase was subsequently followed by a prolonged decrease in FHR variability for up to 3 h. Pretreatment with naloxone blocked the tachycardia but not the decrease in FHR variation. Cohen et al. showed, in pig, that injection of opioid significantly decreased FHR and naloxone administration resulted in a significant increase in FHR [29]. These results are not in accordance with the present study, but nalbuphine is an agonist-antagonist morphinic and nalbuphine injection was given to the mother. The hemodynamic effect of nalbuphine may be variable considering the varied results published in the literature. However, in the fetal pig, the  $\delta$ -receptor is virtually absent until a few days after birth, whereas the  $\delta$ -receptor is the major opioid receptor in the fetal sheep [29]. In the case of maternal injection, a trend of a decrease in FHR can be observed. In our study, FHR was not modified despite administration of 20 mg of nalbuphine dose, which is double than that used by Guillonneau et al. Kopecky et al. have shown the ability of opiates to cause vasoconstriction of the placenta and umbilical vasculature, with changes in the Doppler velocity of the umbilical artery [30]. Moreover, according to Holsey et al., a direct injection of an opioid agonist to the fetus does not modify fetal blood pressure [25]. In contrast, we did not assess umbilical artery flow velocity, although we have shown that maternal injection of nalbuphine did not change fetal arterial blood pressure; this result concurs to that observed by Hosley et al. Additionally, we did not observe alterations in placental gas exchange.

Evaluation of fetal wellbeing is currently based on the analysis of the FHR. Cohen et al. showed, in pig, that injection of opioid significantly increased LTV and STV and naloxone administration resulted in a significant decrease in both [29]. However, a decrease in STV and LTV after opioid injection was also demonstrated in previous studies in human fetus [12,26], which was confirmed by our findings in fetal sheep model. With LTV representing a part of the absolute amount of low frequency variations and STV representing a part of the absolute amount of parasympathetic activity, opioid use reduces the global activity of ANS [11,12]. Furthermore, we demonstrated an increase of FSI and HFnu, which represents the relative amount of parasympathetic activity regarding the whole variability. These changes suggest a relatively higher proportion of parasympathetic activity after opioid treatment.

#### *Clinical implications*

According to those results, opioid use modify the balance between parasympathetic and sympathetic activities with a predominance of the former, explaining the increase of FSI and HFnu. We have previously demonstrated that relative parasympathetic activity increased in the case of fetal acidosis in a fetal sheep model [10,31]. Those fluctuations of autonomic activity are directly caused by the effect of the opioid on the ANS and do not reflect fetal acidosis. This finding is an important guiding information for obstetricians to monitor fetal well-being during labour.

#### *Research implications*

HRV index are modified by a large number of parameters that must be considered in evaluating fetal well-being. Future research should be focused on identifying the factors that influence fetal HRV to avoid misinterpretation.

#### *Strengths and limitations*

Although we studied on an animal model that has been used for several years and has been validated by some previous studies, this animal model has a limited population. Despite several similarities between sheep and human gestation, the reproducibility of our physiopathological observations and therefore their extrapolation to the human fetus must be considered with caution. In contrast to human clinical reality, the absence of uterine contractions, and the potential for an interaction between contractions and nalbuphine on fetal heart rate could not be studied and taken into consideration.

## **Conclusions**

The use of opioids such as nalbuphine to the mother during labour leads to a modification of fetal HRV. Those fluctuations are directly caused by the effect of the opioid on the ANS and do not reflect fetal acidosis. This finding is an important guiding information for obstetricians to avoid unnecessary interventions.



**Author contributions:**

M Recher: Protocol/project development, Data collection or management, Data analysis, Manuscript writing/editing.

C Garabedian Protocol/project development, Manuscript writing/editing.

E Aubry: Protocol/project development, Data collection or management.

D Sharma: Protocol/project development, Data collection or management.

L Butruille: Data analysis.

L Storme: Protocol/project development, Data analysis, Manuscript writing/editing.

J De jonckheere: Protocol/project development, Data analysis, Manuscript writing/editing.

**Conflict of interests:** The authors do not have any conflicts of interest to disclose.

**Funding:** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## References

1. Anderson D. A review of systemic opioids commonly used for labor pain relief [published correction appears in *J Midwifery Womens Health*. 2011 Jul-Aug;56:411-8]. *J Midwifery Womens Health* 2011;56:222–39.
2. Jansson LM, Velez M, McConnell K, et al. Maternal buprenorphine treatment and fetal neurobehavioral development. *Am J Obstet Gynecol* 2017;216:529.e1-529.e8.
3. Romano M, Iuppriello L, Ponsiglione AM, Improta G, Bifulco P, Cesarelli M. Frequency and Time Domain Analysis of Foetal Heart Rate Variability with Traditional Indexes: A Critical Survey. *Comput Math Methods Med* 2016: 9585431.
4. Chaffin DG, Goldberg CC, Reed KL. The dimension of chaos in the fetal heart rate. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1425-9.
5. Shaw CJ, Allison BJ, Itani N, et al. Altered autonomic control of heart rate variability in the chronically hypoxic fetus. *J Physiol* 2018;596:6105-19.
6. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J* 1996;17:354-81.
7. Van Laar JOEH, Porath MM, Peters CHL, Oei SG. Spectral analysis of fetal heart rate variability for fetal surveillance: review of the literature. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008;87:300-6.
8. Van Laar JOEH, Peters CHL, Vullings R, Houterman S, Bergmans JWM, Oei SG. Fetal autonomic response to severe acidemia during labour. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 2010;117:429-37.
9. Garabedian C, Champion C, Servan-Schreiber E, et al. A new analysis of heart rate variability in the assessment of fetal parasympathetic activity: An experimental study in a fetal sheep model. *PLoS One* 2017;12:e0180653.
10. Ghesquière L, De Jonckheere J, Drumez E, et al. Parasympathetic nervous system response to acidosis: Evaluation in an experimental fetal sheep model. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2019;98:433-9.
11. Jeanne M, Logier R, De Jonckheere J, Tavernier B. Heart rate variability during total intravenous anesthesia: effects of nociception and analgesia. *Auton Neurosci Basic Clin* 2009;147:91-6.
12. Giannina G, Guzman ER, Lai YL, Lake MF, Cernadas M, Vintzileos AM. Comparison of the effects of meperidine and nalbuphine on intrapartum fetal heart rate tracings. *Obstet Gynecol* 1995;86:441-5.
13. Frasch MG, Grasch MG, Frasch MG, et al. Measures of acidosis with repetitive umbilical cord occlusions leading to fetal asphyxia in the near-term ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:200.e1-7.

14. Houfflin Debarge V, Bresson S, Jaillard S, et al. Development of a new model to investigate the fetal nociceptive pathways. *Fetal Diagn Ther* 2005;20:415-9.
15. Wassink G, Bennet L, Booth LC, et al. The ontogeny of hemodynamic responses to prolonged umbilical cord occlusion in fetal sheep. *J Appl Physiol* 2007;103:1311-7.
16. Bennet L, Westgate JA, Liu Y-CJ, Wassink G, Gunn AJ. Fetal acidosis and hypotension during repeated umbilical cord occlusions are associated with enhanced chemoreflex responses in near-term fetal sheep. *J Appl Physiol* 2005;99:1477-82.
17. Garabedian C, Aubry E, Sharma D, et al. Exploring fetal response to acidosis in ewes: Choosing an adequate experimental model. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* 2018;47:397-403.
18. De Jonckheere J, Logier R, Dassonneville A, Delmar G, Vasseur C. PhysioTrace: An efficient toolkit for biomedical signal processing. *Conf Proc Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc IEEE Eng Med Biol Soc Annu Conf* 2005;7:6739-41.
19. Dawes GS, Moulden M, Redman CW. System 8000: computerized antenatal FHR analysis. *J Perinat Med* 1991;19:47-51.
20. Nicolle E, Devillier P, Delanoy B, Durand C, Bessard G. Therapeutic monitoring of nalbuphine: transplacental transfer and estimated pharmacokinetics in the neonate. *Eur J Clin Pharmacol* 1996;49:485-9.
21. Martin LV, Jurand A. The absence of teratogenic effects of some analgesics used in anaesthesia. Additional evidence from a mouse model. *Anaesthesia* 1992;47:473-6.
22. Nezvalová-Henriksen K, Spigset O, Nordeng H. Effects of codeine on pregnancy outcome: results from a large population-based cohort study. *Eur J Clin Pharmacol* 2011;67:1253-61.
23. Wilson SJ, Errick JK, Balkon J. Pharmacokinetics of nalbuphine during parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1986;155:340-4.
24. Wilson CM, McClean E, Moore J, Dundee JW. A double-blind comparison of intramuscular pethidine and nalbuphine in labour. *Anaesthesia* 1986;41:1207-13.
25. Holsey YS, Wu D, Soong Y, Omoniyi AT, Szeto HH. Cardiovascular effects of a mu-selective opioid agonist (tyrosine-D-arginine-phenylalanine-lysine-NH<sub>2</sub>) in fetal sheep: sites and mechanisms of action. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1127-30.
26. Sherer DM, Cooper EM, Spoor C, Serletti BL, Woods JR. Resolution of marked intrapartum fetal tachycardia following intravenous nalbuphine hydrochloride. *Am J Perinatol* 1994;11:367-8.
27. Guillonneau M, Jacqz-Aigrain E, de Crepy A, Zeggout H. Perinatal adverse effects of nalbuphine given during parturition. *Lancet Lond Engl* 1990;335:1588.

28. Szeto HH, Wu D, Cheng PY, Soong Y, Taylor CC, Yee J. Cardiovascular and respiratory actions of U50,488H in the unanaesthetized ovine foetus. *Eur J Pharmacol* 1996;297:77-82.
29. Cohen S, Parvizi N, Mulder EJ, et al. Effects of morphine and naloxone on fetal heart rate and movement in the pig. *J Appl Physiol* 2001;90:1577-1583.
30. Kopecky EA, Ryan ML, Barrett JF, et al. Fetal response to maternally administered morphine. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:424-30.
31. Garabedian C, Clermont-Hama Y, Sharma D, et al. Correlation of a new index reflecting the fluctuation of parasympathetic tone and fetal acidosis in an experimental study in a sheep model. *PloS One* 2018;13:e0190463.

Table 1. Blood gases evolution.

<b>Blood gas</b>	<b>Before injection</b>	<b>60 min after injection</b>	<b>90 min after injection</b>	<b>P-value</b>
<b>pH</b>	7.34±0.01	7.34±0.01	7.34±0.01	<b>0.11</b>
<b>pCO<sub>2</sub> (mm Hg)</b>	32.2±2.6	36±1.7	28.3±3.3	<b>0.70</b>
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mmol/L)</b>	18.8±1.4	19.6±1.0	17±1.8	<b>0.15</b>
<b>Lactates (mmol/L)</b>	0.9±0.2	0.8±0.2	0.7±0.2	<b>0.72</b>

P-value: Friedman test.

## Figure Legends

**Fig. 1.** Evolution of hemodynamic parameters after nalbuphine injection. \*  $P < 0.05$ .  
FHR: fetal heart rate; MAP: mean arterial pressure.

**Fig. 2.** Evolution of Short-term variation (STV) and long-term variation (LTV) after nalbuphine injection. \*  $P < 0.05$ .

**Fig. 3.** Evolution of Low-Frequency (LF), High-frequency (HF) after nalbuphine injection. \*  $P < 0.05$ .

**Fig. 4.** Evolution of HFnu and mean fetal stress index (FSIm) after nalbuphine injection. \*  $P < 0.05$ .

## Highlights

- Opioid use during pregnancy interferes with cardiotocography outcomes.
- After nalbuphine injection, fetal hemodynamic parameters remained stable. Short- and long-term variability decreased after injection, respectively. Fetal stress index gradually increased at T30 min, with statistical significance achieved at T60 min. Fetal pH and lactate levels remained stable.
- Maternal nalbuphine use may cause fetal heart fluctuations due to the opioid's effect on the autonomic nervous system; these fluctuations do not reflect acidosis.
- This finding is an important guiding information for obstetricians to avoid unnecessary interventions



## **ANNEXE 3**

**Assessment of procedural distress in sedated/intubated children under 3 years old using the Newborn Infant Parasympathetic Evaluation (NIPE): A Diagnostic Accuracy Pilot Study.**

Morgan Recher, MD<sup>1,2</sup>; Jérémie Rousseaux, MD<sup>1</sup>; Mathilde Flocteil, MSc<sup>3</sup>; Mylène Jouanastay, MD<sup>1</sup>; Alice Potisek, Ms<sup>1</sup>; Marie-Emilie Lampin, PhD<sup>1,4</sup>; Stéphane Leteurtre, PhD<sup>1,4</sup>; Julien De jonckheere, PhD<sup>2,3</sup>

Author affiliations

1. CHU Lille, Pediatric Intensive Care Unit, F-59000 Lille, France
2. Univ. Lille, EA 4489 – Perinatal Environment and Health, F-59000 Lille, France
3. CHU Lille, CIC-IT 1403, F-59000, Lille, France
4. Univ. Lille, EA 2694 - Santé publique : épidémiologie et qualité des soins, F-59000 Lille, France

**Corresponding author:** Morgan RECHER ; Réanimation et Surveillance Continue Pédiatriques, Hôpital Jeanne de Flandre ; CHRU de Lille, 59037 Lille Cedex, France. Phone number: +33 320446884; Fax number: +33 320444719; Email address: morgan.recher@chru-lille.fr

**Conflicts of Interest and Source of Funding:** Julien De jonckheere is a shareholder and scientific consultant for Mdoloris Medical Systems (which commercializes NIPE monitor). For the remaining authors, none were declared.

**Key words:** Newborn Infant Parasympathetic Evaluation, NIPE, sedation, analgesia, pain, pediatric critical care.

**Copyright form disclosure:** Dr. De jonckheere received funding from MDoloris Medical Systems (shareholder and scientific adviser). The remaining authors have disclosed that they do not have any potential conflicts of interest.

## ABSTRACT

**Objectives:** Newborn Infant Parasympathetic Evaluation (NIPE) index is based on heart rate variability and is related to the autonomic response to pain or stress. The Comfort behaviour scale is used to assess distress intensity in sedated intubated children. The objective of this study was to assess the validity and performance of NIPE as a distress indicator during procedural distress.

**Design:** Monocentric, prospective, noninterventional pilot study of diagnostic accuracy between 01 October 2017 and 30 April 2019.

**Setting:** Paediatric intensive care unit in a tertiary-care university hospital.

**Patients:** Sedated intubated children under 3 years old.

**Interventions:** We continuously obtained mean-NIPE (NIPE<sub>m</sub>) and instantaneous-NIPE (NIPE<sub>i</sub>) scores and compared them to Comfort Behaviour scores obtained before (T1 period), during (T2 period), and after (T3 period) care procedures.

**Measurements and Main Results:** We obtained 54 measurements from 32 patients. The median age was 4 months [23 days to 31 months]. Between T1 and T2, there was a significant decrease in the NIPE<sub>i</sub> and NIPE<sub>m</sub> scores ( $64 \pm 2$  to  $42 \pm 1$  ( $P < 0.0001$ ) and  $64 \pm 1$  to  $59 \pm 1$  ( $P = 0.007$ ) respectively) and a significant increase in the Comfort Behaviour scores (from  $12 \pm 0$  to  $16 \pm 1$  ( $P < 0.0001$ )). Comfort Behaviour scores and NIPE<sub>i</sub> and NIPE<sub>m</sub> scores were significantly inversely correlated ( $r = -0.44$ ,  $P < 0.0001$  and  $r = -0.19$ ,  $P = 0.01$ , respectively). With a NIPE<sub>i</sub> score threshold of 53, the sensitivity, specificity, positive predictive, and negative predictive values to predict a Comfort Behaviour scale up to 17 were 80.0%, 73.5%, 43.8%, and 93.5%, respectively.

**Conclusions:** NIPE<sub>i</sub> is valid for assessing distress in sedated/intubated children in the paediatric intensive care unit. Further studies are needed to confirm these results and for NIPE-based comparisons of sedation-analgesia protocols.

**Trial Registration:** ClinicalTrials.gov identifier: NCT04195672.

## INTRODUCTION

Pain or discomfort assessment in patients hospitalized in intensive care remains challenging, especially in patients unable to communicate their distress intensity (1). The imbalance between distress and sedation in sedated paediatric patients is often assessed using physiological parameters (heart rate and blood pressure), which have low sensitivity and specificity (2). Therefore, self-reported or clinical behavioural scales are used to standardize discomfort and/or pain assessment and to adapt therapeutic doses (3,4).

Self-reported scales are widely used for pain and stress assessment in children. As an example, the FACES scale consists of a series of line diagrams of faces with expressions of increasing distress and has been developed to allow children to self-evaluate their distress level. However, self-reported scales cannot be used in sedated or non-communicable patients (5,6). The gold standard for distress evaluation in sedated ventilated patients in paediatric intensive care unit (PICU) was initially the COMFORT Scale which included both behavioural and physiological (heart rate and blood pressure) items (4-8). However, heart rate and blood pressure items demonstrated very limited reliability and validity as determinants of the total score (8,9). Thus, Carnevale *et al.* developed the COMFORT Behaviour Scale (CBS) (9), which excludes physiological items and is now recommended to assess distress in PICU (8,9). However, this method is not continuous and depends on the examiner's training and ability to use this clinical tool (6,10,11). Currently, there are several available physiological monitoring devices, mostly based on the analysis of the autonomic nervous system, for continuous discomfort/pain evaluation (12). However, the use of such devices remains low in clinical practice.

The Newborn Infant Parasympathetic Evaluation (NIPE, MDMS, Loos, France) is an improvement of the Analgesia Nociception Index (ANI, MDMS, Loos, France), which has been validated as a tool for assessing pain and discomfort in sedated adult patients by multiple studies (1,13-15). Especially dedicated to children under 3 years old, NIPE is a non-invasive system based on high frequency-domain heart rate variability (HRV) analysis ( $> 0.15$  Hz), which reflects parasympathetic activity (16). Continuous measuring of NIPE values, which range from 0 to 100, has shown great promise in newborn infants as a tool for assessing postoperative pain or after instrumental assisted delivery (17,18). The use of NIPE to assess distress in sedated ventilated patients in PICU has not been previously evaluated. Though heart rate and R-R intervals values didn't demonstrated abilities for distress evaluation (9), we hypothesized that its high frequency variability estimated by the NIPE index could be used to assess procedural distress in sedated ventilated children in PICU.

We aimed to evaluate whether the NIPE system could be a useful tool for continuous distress monitoring, compared to the gold-standard CBS, in sedated children under 3 years old during procedural cares. Further, we aimed to determine hemodynamic variables and treatments received that could influence NIPE scores.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Ethics approval*

The study protocol was approved by the Ethics committee: Comité éthique de recherche de la Société Française de Pédiatrie, France (CER-SFP 2016-030-2) on 02 November 2016 (Chairperson Dr H. Chappuy).

### *Study design*

The prospective, unicentric study was conducted in the medical-surgical PICU of the University of Lille Jeanne de Flandre Hospital, France between 01 October 2017 and 30 April 2019. All patients from 1 month to 3-year-old invasively ventilated were eligible for enrolment. Exclusion criteria were as follows: decision to withdraw life support or unstable condition preventing planned routine procedures of care, conditions that contraindicated the use of NIPE (cardiac transplant, absence of sinus cardiac rhythm, apnea or respiratory rate  $\leq 9$ /min, pacemaker, and use of atropine and/or isoprenaline).

*Conduct of the study (Supplementary file)*

After obtaining consent and enrolling the patients, the investigators planned different procedures of care with the bedside nurses. Defined care procedures included bathing the patient, turning the patient on both sides, changing bed sheets, peripheral or central catheterization (venous and arterial catheters), bladder catheterization, tracheal suctioning, lumbar puncture, intracranial pressure sensor installation, pleural catheterization, venous and capillary blood gas, capillary blood glucose, nasal and buccal suction, and anal temperature measurement. A single patient could have undergone multiple distressful and uncomfortable procedures during a period of care. In order to be able to carry out these procedures, patients were not swaddled. Patients did not receive nutrition and non-nutritive sucking.

Investigators and nurses were present in the room during procedures; further, parents were allowed to be present, and could talk or touch their child (massage). On the other hand, patients were not held by their parents. NIPE monitoring was started 15 minutes before the period of care and continued until 10 minutes after the care period. Distress assessment using CBS for each patient was conducted during 3

periods: 5 minutes before the period of care (T1), which represented the baseline value; during the period of care (T2); and 5 minutes after the period (T3). The investigators who performed the CBS were blinded to the NIPE scores during the procedure recording.

### *Data collection*

We measured distress using three different methods: 1) using CBS scores, 2) using classical physiological measurements through oxygen saturation, blood pressure, heart rate and respiratory rate, 3) through autonomic nervous system analysis using the NIPE® monitor (MDMS, Loos, France, <http://www.mdoloris.com/>). CBS was developed to assess pain and distress in PICU (5,6). It is admitted that CBS values lower than 10 are related to over-sedation whereas CBS over 23 are related to under-sedation (6,8). However, several authors considered value of 17 and over for moderate pain detection (5). In our clinical practice, it is accepted that a score of  $\geq 17$  necessitates appropriate analgesic and/or sedation treatment as adaptation. We measured other physiological parameters (oxygen saturation, respiratory rate, and blood pressure) 5 min before the procedure, after 10-min intervals during the procedure, and 5 minutes after the procedure. Further, we collected information regarding age, medical history, sedation and analgesia type, vasopressor use, and sedation bolus dose during the procedure.

Subsequently, an independent research investigator extracted and analyzed NIPE data based on procedure timings reported on the NIPE bedside monitor. The monitor displayed two NIPE values; namely, mean-NIPE (NIPE<sub>m</sub>), which was calculated as the NIPE score average over a maximum of 20 min, and instant-NIPE



(NIPE<sub>i</sub>), which was calculated as the NIPE score average over a shorter period of 3 minutes.

As every period of care contains multiple painful/distressful procedures, the minimum of NIPE<sub>m</sub>, the minimum of NIPE<sub>i</sub> and the maximum of CBS were reported during T1, T2 and T3.

### *Statistical analysis*

We performed statistical analyses without intermediate analysis after inclusion of all patients. All statistical analyses were performed using the SPSS statistics 20.0 (IBM, Amink, New York, US) software. Continuous variables were expressed as medians (range first to third quartiles). Categorical variables were expressed as frequencies and percentages. For analyses of CBS and NIPE scores, we used linear mixed-regression models with the number of procedures as the fixed effect and the individual patient as the random effect. Data are expressed as mean (lower – upper 95% confidence interval). We used the Spearman correlation rank test to determine the graphic correlation between NIPE and CBS scores.

We calculated the area under the receiver operator characteristics curves (AUC, 95% CI) with a CBS score threshold of 17. We used the Youden index to determine the relevant NIPE thresholds (19). We calculated the sensitivity, specificity, positive predictive, and negative predictive values according to a standardized definition, as with the Youden's index. Youden's index enables to establish the threshold which maximize both sensitivity and specificity (19). The Youden's index is calculated as follows:  $J = \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$ . The threshold which maximize both sensitivity and specificity corresponds to the maximum value  $J$  (19).

Statistical tests were considered significant with a type 1 error rate of < 5%.

## RESULTS

### *Population*

During the study period, we performed 54 pain measurements in 32 patients. The median age was 4 months (range 23 days to 31 months). **Table 1** summarises the patients' and medical characteristics. A total of 26 (81%) and 6 (19%) cases were described as medical and surgical, respectively. The median of Paediatric Logistic Organ Dysfunction-2 at Day 1 was 5 (range 3 to 6) while the median of Paediatric Index of Mortality 3 was 0.69 (range 0.26 to 1.93).

The median duration of procedures for care was 28 min (range 9 min to 1 hour). The painful procedures conducted among them included 74 patient hygienic treatments, 35 tracheal suction, 29 anal temperature measurements, 18 nasal or buccal suction, 13 bladder catheter treatments, 11 capillary blood glucose, and 9 turnings. No lumbar puncture, no peripheral or central catheterization (venous and arterial catheters) were performed in the recorded care periods. The median number of procedures for each care session was 10 (range 7 to 14).

### *Feasibility*

No parents or children refused to take part in the study. No technical issues were reported.

### *CBS score variations (Table 2)*

The overall distress prevalence (CBS  $\geq$  17) during all procedures was 48%. The mean CBS score significantly increased between the T1 and T2 periods ( $12 \pm 0$  to  $16 \pm 1$  ( $P < 0.001$ )). At T3, the mean CBS score was  $12 \pm 0$ , which was similar to that of

the baseline T1 period ( $P = 0.7$ ) but significantly lower than that of the T2 period ( $P < 0.0001$ ).

*NIPEi and NIPEm score variations (Table 2)*

There was a significant decrease in the mean NIPEi scores between the T1 and T2 periods ( $64 \pm 2$  to  $42 \pm 1$  ( $P < 0.0001$ )). The mean NIPEi score at the T3 period ( $62 \pm 2$ ) was similar to that of the T1 period ( $P = 0.58$ ) but higher than that in the T2 period ( $P < 0.0001$ ).

The mean NIPEm scores significantly decreased between the T1 and T2 periods ( $64 \pm 1$  to  $59 \pm 1$  ( $P < 0.0001$ )). The mean NIPEm score at the T3 period ( $60 \pm 1$ ) was similar to that of the T2 ( $P = 0.32$ ) and T1 periods ( $P = 0.07$ ).

*Heart rate and respiratory rate variations (Table 2)*

There was a significant increase in the heart rate values between the T1 and T2 periods ( $125 \pm 3$  to  $141 \pm 3$  ( $P < 0.0001$ )). The heart rate value at the T3 period ( $134 \pm 3$ ) was similar to that of the T2 period ( $P = 0.07$ ) but higher than that of the T1 period ( $P < 0.02$ ).

There was a significant increase in the respiratory rate values between the T1 and T2 periods ( $38 \pm 2$  to  $44 \pm 2$  ( $P < 0.005$ )). The respiratory rate at the T3 period ( $38 \pm 2$ ) was lower than that of the T2 period ( $P = 0.03$ ) but similar to that of the T1 period ( $P = 0.7$ ).

*NIPE performance*

**Fig. 1** shows the ROC curve for the NIPEi and NIPEm scores. The ROC curve for the NIPEi scores had an AUC of 0.83 (95% CI 0.76 to 0.90) and was higher than that of the NIPEm scores, which had an AUC of 0.66 (95% CI 0.56 to 0.76). The best cut-off value for a NIPEi score threshold using Youden's index was 53. The sensitivity

was 80.0%, specificity 73.5%, and positive and negative predictive value were 43.8% and 93.5% respectively. A sensitivity of 100% was obtained at a NIPEi score > 72 while 100% specificity was obtained at a NIPEi score < 26.

There was an inverse correlation between the CBS and NIPEi score ( $r = -0.44$ ,  $P < 0.0001$ ) and between the CBS and NIPEm score ( $r = -0.19$ ,  $P = 0.01$ ). There was a greater correlation between CBS and NIPEi scores than that between CBS and NIPEm scores (**Fig. 2**). Further, we found a correlation between the CBS score and heart rate ( $r = 0.23$ ,  $P = 0.002$ ) and between the CBS score and respiratory rate ( $r = 0.21$ ,  $P = 0.007$ ).

#### *Variables associated with NIPEi/NIPEm*

**Table 3** presents findings of univariate analysis for NIPEi-associated variables. We found that heart rate and respiratory rate were associated with NIPEi scores with the following respective estimated coefficients (EC):  $-0.41$  (95% CI  $-0.63$  to  $-0.14$ ) ( $P < 0.0001$ ) and  $EC = -0.22$  (95% CI  $-0.38$  to  $-0.09$ ) ( $P = 0.002$ ).

**Table 4** presents findings of univariate analysis for NIPEm-associated variables. We found that heart and respiratory rate were associated with NIPEm scores with the following respective EC:  $-0.52$  (95% CI  $-0.83$  to  $-0.21$ ) ( $P = 0.001$ ) and  $EC = -0.24$  (95% CI  $-0.44$  to  $-0.04$ ) ( $P = 0.02$ ).

## DISCUSSION

In this study, we assessed the applicability of NIPE scores during procedural distress setting in PICU. We found that during procedural distress, there was a decrease in the NIPEi and NIPEm scores and an increase in the CBS scores. Further, there was a significant correlation between NIPEi scores and CBS scores. Moreover, we found that a NIPEi score  $\geq 53$  had a negative predictive value of 93.5%. To our knowledge, this is the first study to compare the effect of procedural distress on NIPE and CBS scores in sedated ventilated patients under 3 years-old in PICU.

During PICU stay, pain and /or discomfort are among the most stressful events experienced by a patient; however, despite its frequency, it is often underestimated and undertreated (10). Sedation is necessary for optimizing care of critically ill patients; specifically, patients under mechanical ventilation require adequate sedation and analgesia to ensure comfort and safety. Providing comfort to critically ill children is an important part of the daily activities in PICU with continuous distress assessment improving pain and discomfort management (3,20). Several studies have reported a correlation between adequate analgesia/sedation and comfort in paediatric critical care (3,21). However, improved comfort management based on accurate distress intensity assessment in patients hospitalized in PICU remains challenging. Previous studies have established an association of pain assessment with better outcomes in patients in the paediatric and adult intensive care unit (3,4,22). The first step towards achieving the best pain and discomfort management in PICU and developing an optimal analgesia protocol is the implementation of a valid and reliable distress assessment tool.

In this study, we found a significant increase in the CBS scores during the procedures, which confirmed that each procedure resulted in a stressful stimulus. The

CBS is usually used and has been proven useful in the critical care of the paediatric population as a tool for comfort assessment (6,23). However, there are multiple disadvantages of using such a scale (23). Specifically, the CBS cannot be used for continuous recording. Therefore, there is a need to consider electrophysiological distress monitoring to allow immediate and continuous assessment.

The parasympathetic tone is represented in the high-frequency ( $> 0.15$  Hz) on HRV. Faye *et al.* reported that decreased high-frequency HRV in full-term newborn infants was associated with postoperative pain and could be used as an indicator for assessing prolonged pain (17). Rakza *et al.* reported reduced NIPE scores in newborns between the second and fourth hours of life after assisted deliveries in comparison to spontaneous deliveries (18). Moreover, Buyuktiryaki *et al.* evaluated the effect of chest tube installation for pneumothorax on NIPE scores and reported that the NIPE score could provide instantaneous assessment of prolonged pain in preterm infants (24). In neonates and infants under 2 years-old anaesthetized with sevoflurane, Weber *et al.* reported that NIPE scores lower than 50 might be indicative of insufficient analgesia (25). In our study, we also demonstrated that a NIPE lower than 53 might be indicative of significant distress.

Valencia-Ramos *et al.* assessed 2 different nebulization systems on comfort in awake patients and reported significantly decreased NIPE scores during nebulization in children with bronchiolitis. Further, the CBS scores were greater when using the jet nebulizer system than when using the high flow nasal cannulas; however, NIPE scores when using both systems were similar (20). The lack of difference in the NIPE scores might be attributed to the fact that nebulization cannot be considered as an important distressful stimulus (26). In our study, during periods of care including multiple painful and uncomfortable procedures, we found a significant decreased of the NIPE scores.

Cremilleux *et al.* studied unsedated preterm infants (mean gestational age =  $29.9 \pm 4.2$  weeks) who had undergone short duration painful and distressful procedures and didn't observe any NIPE variations (27). In our study, we assessed NIPE variations during a period of care including multiple procedures on sedated children. In comparison to Cremilleux *et al.* study, in our study care procedures presented longer durations, which corresponded to the fact that we aimed to combine the multiple uncomfortable/painful procedures to a single care period. It is difficult to compare the studies given their obvious differences (premature infants vs. infant < 3 years old, ventilated vs. spontaneous breathing, sedated vs. non-sedated infants). However, given other related findings, we hypothesized that the results of Cremilleux *et al.* demonstrate that NIPE scores cannot be used to evaluate very short duration procedures (17,25). Further studies are required to assess the efficiency of NIPE in evaluating distress resulting from long-duration procedures (> 2 minutes) in unsedated children.

To our knowledge, this is the first study that report on the usefulness of NIPE in measuring procedural distress response in intubated and sedated children under 3 years old admitted in PICU. We found that a NIPEi score threshold > 53 indicated sufficient sedation. It remains unclear whether this is clinically relevant but we found a significant correlation between NIPEi and CBS scores. CBS, which is the gold standard for assessing distress in the PICU, is a discontinuous measurement tool and is inefficient in detecting variations in pain or discomfort sensation. Contrastingly, NIPEi is recorded continuously and could allow a continuous assessment of distress.

Procedural distress management is still an important issue for hospitalized children in PICU and NIPE could be of interest in this population of non-verbal patients. However, its clinical usefulness still need to be investigated and further studies are

needed to assess the impact of sedation and analgesia protocols based on NIPE monitoring.

Our study has several limitations. First, the NIPE system depends on the quality of the electrocardiogram signal and movements caused by procedures could interfere with the ECG signal and make the value disappear for several seconds. Moreover, we did not standardize the care procedures and studied a global period of care. However, this corresponds with daily practice and further indicates the clinical relevance of NIPE. Further, we could not assess all factors that could influence the NIPE scores, as well as environmental factors such as noise, which is common in PICU and could influence the NIPE scores. Moreover, patients included in our study had a low PIM3 score with a large proportion of medical patients. These results ratings may not be transferable to infants undergoing complex surgery. Finally, we studied the level of response to distress procedures without taking into account the sedation level. Further studies are required to assess the ability of NIPE to evaluate the sedation/distress balance, which could justify its use for sedation and analgesic prescription. The use of new distress monitoring device such as NIPE to guide analgesia could result in greater use of opiates. However, several randomized clinical studies using the adult monitoring system (ANI, MDMS, Loos, France) during surgery under general anesthesia tend to demonstrate a decrease in opioids consumption when using the ANI monitor to titrate analgesia (28).



## **CONCLUSION**

In this preliminary study, we found that NIPEi effectively detected discomfort during painful and distressful procedures in PICU and was significantly correlated with CBS scores. Our findings indicated that NIPEm was not a reliable distress detection tool. A NIPEi score threshold of 53 was associated with a sensitivity of 80.0%, specificity of 73.5%, and negative predictive value of 93.5% to predict CBS over 17. Therefore, NIPEi could be used to detect significant discomfort. NIPE might be helpful to continuously assess procedural cares. Future studies with larger samples are required to confirm these findings. Specifically, randomized controlled trials are required to measure the impact of analgesia and sedation protocols based on NIPE compared with CBS, particularly regarding total amount of opioid administered.

## **ACKNOWLEDGE**

We would like to acknowledge the large multidisciplinary team who helped create and implement this protocol, including the nursing staff of the PICU at Jeanne de Flandre Hospital, Lille, France.

## REFERENCES

1. Chanques G, Tarri T, Ride A, et al. Analgesia nociception index for the assessment of pain in critically ill patients: a diagnostic accuracy study. *Br J Anaesth* 2017; 119:812–20.
2. Daccache G, Jeanne M, Fletcher D. The Analgesia Nociception Index: Tailoring Opioid Administration. *Anesth Analg* 2017; 125:15–7.
3. Voepel-Lewis T, Zanotti J, Dammeyer JA, et al. Reliability and validity of the face, legs, activity, cry, consolability behavioral tool in assessing acute pain in critically ill patients. *Am J Crit Care* 2010; 19:55–61.
4. Chou R, Gordon DB, de Leon-Casasola OA, et al. Management of Postoperative Pain: A Clinical Practice Guideline from the American Pain Society, the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, and the American Society of Anesthesiologists' Committee on Regional Anesthesia, Executive Committee, and Administrative Council. *J Pain* 2016; 17:131–57.
5. Dorfman TL, Sumamo Schellenberg E, Rempel GR, et al. An evaluation of instruments for scoring physiological and behavioral cues of pain, non-pain related distress, and adequacy of analgesia and sedation in pediatric mechanically ventilated patients: A systematic review. *Int J Nurs Stud* 2014; 51:654–76.
6. Harris J, Ramelet AS, van Dijk M, et al. Clinical recommendations for pain, sedation, withdrawal and delirium assessment in critically ill infants and children: an ESPNIC position statement for healthcare professionals. *Intensive Care Med* 2016; 42:972–86.
7. van Dijk M, de Boer JB, Koot HM, et al. The reliability and validity of the COMFORT scale as a postoperative pain instrument in 0 to 3-year-old infants. *Pain* 2000; 84:367–77. 8 Ista E, van Dijk M, Tibboel D, et al. Assessment of sedation levels in pediatric *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6:58–63. 9. Carnevale FA, Razack S. An item analysis of the COMFORT scale in a pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 2002; 3:177–80.
10. Brand K, Al-Rais A. Pain assessment in children. *Anaesth Intensive Care Med* 2019; 20:314–7.
11. Morton NS. Pain assessment in children. *Paediatr Anaesth* 1997; 7:267–72.
12. De Jonckheere J, Bonhomme V, Jeanne M, et al. Physiological Signal Processing for Individualized Anti-nociception Management During General Anesthesia: a Review. *Yearb Med Inform* 2015; 10:95–101.
13. Broucqsault-Dédrie C, De Jonckheere J, Jeanne M, et al. Measurement of Heart Rate Variability to Assess Pain in Sedated Critically Ill Patients: A Prospective Observational Study. *PLoS One* 2016; 11:e0147720.

14. Ledowski T. Analgesia-nociception index. *Br J Anaesth* 2014; 112:937.
15. Ledowski T. Objective monitoring of nociception: a review of current commercial solutions. *Br J Anaesth* 2019; 123:312–21.
16. Butruille L, De jonckheere J, Marcilly R, et al. Development of a pain monitoring device focused on newborn infant applications: The NeoDoloris project. *IRBM* 2015; 36:80–5.
17. Faye PM, De Jonckheere J, Logier R, et al. Newborn infant pain assessment using heart rate variability analysis. *Clin J Pain* 2010; 26:777–82.
18. Rakza T, Butruille L, Thirel L, et al. Short-term Impact of Assisted Deliveries: Evaluation Based on Behavioral Pain Scoring and Heart Rate Variability. *Clin J Pain* 2018; 34:445–9.
19. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 13: receiver operating characteristic curves. *Crit Care Lond Engl* 2004; 8:508–12.
20. Valencia-Ramos J, Arnaez J, Calvo S, et al. Observational study of newborn infant parasympathetic evaluation as a comfort system in awake patients admitted to a pediatric intensive care unit. *J Clin Monit Comput* 2019; 33:749–55.
21. Kudchadkar SR, Yaster M, Punjabi NM. Sedation, sleep promotion, and delirium screening practices in the care of mechanically ventilated children: a wake-up call for the pediatric critical care community. *Crit Care Med* 2014; 42:1592–600.
22. Barr J, Pandharipande PP. The pain, agitation, and delirium care bundle: synergistic benefits of implementing the 2013 Pain, Agitation, and Delirium Guidelines in an integrated and interdisciplinary fashion. *Crit Care Med* 2013; 41:S99-115.
23. Bosch-Alcaraz A, Falcó-Pegueroles A, Jordan I. A literature review of comfort in the paediatric critical care patient. *J Clin Nurs* 2018; 27:2546–57.
24. Buyuktiryaki M, Uras N, Okur N, et al. Evaluation of prolonged pain in preterm infants with pneumothorax using heart rate variability analysis and EDIN (Échelle Douleur Inconfort Nouveau-Né, neonatal pain and discomfort scale) scores. *Korean J Pediatr* 2018; 61:322–6.
25. Weber F, Roeleveld HG, Geerts NJE, et al. The heart rate variability-derived Newborn Infant Parasympathetic Evaluation (NIPE™) Index in pediatric surgical patients from 0 to 2 years under sevoflurane anesthesia-A prospective observational pilot study. *Paediatr Anaesth* 2019; 29:377–84.
26. De Jonckheere J, Storme L. NIPE is related to parasympathetic activity. Is it also related to comfort? *J Clin Monit Comput* 2019; 33:747–8.
27. Cremillieux C, Makhlouf A, Pichot V, et al. Objective assessment of induced acute pain in neonatology with the Newborn Infant Parasympathetic Evaluation index. *Eur J Pain Lond Engl* 2018; 22:1071–9.

28. Dunder N, Kus A, Gurkan Y, et al. Analgesia nociception index (ani) monitoring in patients with thoracic paravertebral block: a randomized controlled study. *J Clin Monit Comput.* 2018;32:481–486.

## Figure legends

Figure 1. Receiving Operating Characteristics (ROC) curves for NIPE associated with pain defined by a CBS  $\geq 17$ .

Figure 2. Correlation between NIPE and CBS. Left panel shows the correlation graph between NIPEm and CBS and right panel the correlation graph between NIPEi and CBS.

## Formulaire d'information pour les parents

### **Utilisation du moniteur d'analgésie ANI chez les enfants de réanimation pédiatrique en ventilation mécanique**

Coordonateur - Responsable scientifique de l'étude : Pr Stéphane Leteurtre

Service de réanimation pédiatrique, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille

Madame, Monsieur,

**Le présent document décrit l'étude à laquelle il est proposé à votre enfant de participer. Il résume les informations actuellement disponibles en répondant aux différentes questions que vous pouvez vous poser dans le cadre de votre participation à cette recherche.**

#### **1) Contexte/ justification de l'étude :**

Votre enfant est actuellement hospitalisé en réanimation. Dans le cadre de la surveillance systématique, son rythme cardiaque sera surveillé en continu. Nos travaux préliminaires ont mis en évidence que le rythme cardiaque contient une information sur la mesure du niveau de douleur en anesthésie générale. Nous souhaitons montrer que ces résultats sont aussi applicables chez l'enfant sédaté en réanimation.

#### **2) Quel est l'objectif de la recherche ?**

La recherche que nous vous proposons a pour objectif de vérifier que l'utilisation de l'information contenu dans le rythme cardiaque peut guider les traitements nécessaires contre la douleur et permettre ainsi d'améliorer le confort du patient en réanimation.

#### **3) Comment va se dérouler la recherche ?**

**Dans le cadre de votre prise en charge habituelle, son rythme cardiaque est surveillé pendant toute la durée de sa présence en service de réanimation. Pour mener cette étude, ces données seront enregistrées à l'aide d'un moniteur fournissant un indice significatif de son niveau d'analgésie. Ce moniteur est relié au moniteur utilisé habituellement. Il ne subira donc aucun acte supplémentaire à ceux effectué habituellement.**

L'étude n'utilise que les données contenues dans le dossier médical de l'enfant et n'implique aucune intervention supplémentaire (aucun examen, aucun traitement supplémentaire). L'utilisation de ces données est ensuite anonyme.

#### **4) Quels sont les risques et effets indésirables de l'étude ?**

Il n'existe aucun effet indésirable et aucun risque spécifique à la réalisation de l'étude.

#### **5) Quels sont les bénéfices potentiels de votre participation à la recherche?**

**Dans le cadre de cette étude, une attention toute particulière sera apportée à l'évaluation de la douleur et du confort.**

**6) Quels sont vos droits ?**

Après anonymisation, les informations enregistrées feront l'objet d'un traitement informatique.

Conformément aux articles 39 et suivants de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, toute personne peut obtenir communication et, le cas échéant, rectification ou suppression des informations la concernant, en s'adressant au médecin responsable de l'étude.

Toute personne peut également s'opposer au traitement des données la concernant (ou son enfant).

Vous êtes libre de refuser de faire participer votre enfant à cette étude sans en donner la justification. Votre refus ne modifiera pas vos rapports avec les médecins et la qualité de la prise en charge de votre enfant. Vous restez libre d'arrêter la participation à tout moment.

Si vous refusez que votre enfant participe à l'étude, il suffit de l'indiquer oralement à l'un des membres de l'équipe prenant en charge votre enfant.

Le Dr....., responsable local de l'étude, est à votre disposition pour tout renseignement sur ce sujet. Vous pouvez demander à le rencontrer. Vous pourrez lui demander d'être informés des résultats globaux à l'issue de l'étude si vous le souhaitez (loi du 04 mars 2002).

Pr Stéphane LETEURTRE



## **ANNEXE 4**

## **Reviewer Comments:**

**Reviewer #1:** The authors are to be commended for trying find an alternate way of assessing pain in infants and toddlers. However, the manuscript raises several questions which I have listed below.

### 1) **Introduction:**

a) Focus on heart rate variability may not be an accurate assessment of pain since Carnevale and Razack found that heart rate and mean arterial pressure components of COMFORT scale were the least reliable component, which is acknowledged by the authors.

Indeed, the COMFORT Behaviour Scale (CBS) has been developed from the COMFORT Scale without physiological components (heart rate and mean arterial pressure). Carnevale et al. showed that heart rate and blood pressure had a very limited validity as determinants of the total COMFORT Scale. They have demonstrated a smallest correlation of heart rate and blood pressure with the total score. However, the Comfort Scale took into account the absolute values of heart rate and blood pressure and not the study of the variability of heart rate (as low-frequency, high-frequency variability) which is related to the autonomous system activity. That's why we have chosen to study variability of heart rate to assess comfort and distress by means of NIPE. So, we have modified on the revised manuscript the paragraph "INTRODUCTION":

*"Thought heart rate and R-R intervals values didn't demonstrated abilities for distress evaluation (9), we hypothesized that its high frequency variability estimated by the NIPE index could be used to assess procedural distress in sedated ventilated children in PICU."*

We have added 2 references 6 and 9:

6. Harris J, Ramelet AS, van Dijk M, et al. Clinical recommendations for pain, sedation, withdrawal and delirium assessment in critically ill infants and children: an ESPNIC position statement for healthcare professionals. *Intensive Care Med* 2016; 42:972–86.

9. Carnevale FA, Razack S. An item analysis of the COMFORT scale in a pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 2002; 3:177–80.

b) Although there are several devices available that have been designed to assess pain there use in pediatrics is low.

As the reviewer indicates, others devices are available to assess pain in pediatric intensive care unit. For example, the MedStorm Company (Oslo, Norway) commercializes a pain monitor based on skin conductance measurement. IdMed (Marseille, France) commercializes a device allowing to estimate the pain response using a pupillary diameter dilatation estimation. However, use of such device remains very low. We added this point on the revised manuscript in paragraph "INTRODUCTION" as well as a reference presenting all the available technologies:

*"Currently, there are several available physiological monitoring devices, mostly based on the analysis of the autonomic nervous system, for continuous discomfort/pain evaluation (12). However, the use of such devices remains low in clinical practice."*

c) No mention made of FACES scale that is widely used by nurses in pediatrics.

We have added in paragraph "INTRODUCTION":

*"Self-reported scales are widely used for pain and stress assessment in children. As an example, the FACES scale consists of a series of line diagrams of faces with expressions of increasing distress and has been developed to allow children to self-evaluate their distress level. However, self-reported scales cannot be used in sedated or non-communicable patients (5,6)."*

d) Reference 11 refers to patients with cancer that may not be relevant to the patient population reported in this study.

Indeed, this reference is not relevant. So, we have removed this reference and we have changed the number of each reference to the end of the manuscript. We have also removed the sentence:

*“However, self-reported behavioural scales and physiological parameters could yield different findings, which might impede the implementation of an efficient pain management strategy (11).”*

## 2) Materials and Methods:

a) No mention made of whether infants were swaddled, held by parents during procedures, massage, or given non-nutritive sucking. All of these measures have been shown variable effectiveness (Riddell et al, Cochrane Review 2011).

We added in paragraph “MATERIALS AND METHODS”, in the subparagraph “Conduct of the study”:

*“A single patient could have undergone multiple distressful and uncomfortable procedures during a period of care. In order to be able to carry out these procedures, patients were not swaddled. Patients did not receive nutrition and non-nutritive sucking.*

*Investigators and nurses were present in the room during procedures; further, parents were allowed to be present, and could talk or touch their child (massage). On the other hand, patients were not held by their parents.”*

b) Sucrose has also been shown to be effective in reducing pain during procedures such as immunization (Stevens et al, Cochrane Review 2013).

We agree the reviewer. Stevens *et al.* have studied term, preterm, or both term and preterm neonates with a maximum of 28 days after reaching 40 weeks' postmenstrual age).

We did not study newborn population or preterm patients in our study. We have added in subparagraph “Study design”:

*“All patients from 1 month to 3-year-old invasively ventilated were eligible for enrolment.”*

That is why we did not use sucrose as a non-pharmacological intervention for procedural pain in our study.

c) Wide range of procedures lumped together as painful. Most clinicians would view changing bed sheets as much less noxious than lumbar puncture.

Indeed, each procedure is not related to pain but could be related to distress. We have therefore reoriented the article on children's comfort rather than on pain, as little pain care has been carried out. However, each patient had at least one treatment considered painful during each period of several care, and at least one distressful procedure during the same period of care. So, we have removed some words “*pain*”, “*painful*”, changed for “*distress*”, “*discomfort*”, as the title, and modified the paragraph ‘DISCUSSION’ accordingly:

***“Assessment of procedural distress in sedated/intubated children under 3 years old using the Newborn Infant Parasympathetic Evaluation (NIPE): A Diagnostic Accuracy Pilot Study.”***

d) Furthermore, none of the patients in this study underwent lumbar puncture, central line placement or arterial line placement, hence the inclusion of these procedures is misleading to the reader.

Indeed, no patient had lumbar puncture, central line placement or arterial line placement, because these procedures were indicated in the initial protocol of clinical trial. To be more explicit, we have added in paragraph “RESULTS”, in subparagraph “Population”:

*“No lumbar puncture, no peripheral or central catheterization (venous and arterial catheters) were performed.”*

e) Also, since most of the reported painful procedures reported in results would fall under distress-related pain the comparison of electrophysiologic measurements of heart rate and R-R intervals as a comparative measure is probably not valid.

As explain in a) we modified the following sentences in the paragraph "INTRODUCTION":  
*"Thought heart rate and R-R intervals values didn't demonstrated abilities for distress evaluation (9), we hypothesized that its high frequency variability estimated by the NIPE index could be used to assess procedural distress in sedated ventilated children in PICU."*

f) Disagree with the statement that the CBS was developed to assess direct pain and not distress related the pain. The original paper title is "Assessing Distress in Pediatric Intensive Care Environments: The COMFORT Scale " (Ambuel et al 1992 J Ped Psych).

We agree the reviewer. So, we have replaced terms "pain", "painful", by "distress", "discomfort" in the paper and in the title:

***"Assessment of procedural distress in sedated/intubated children under 3 years old using the Newborn Infant Parasympathetic Evaluation (NIPE): A Diagnostic Accuracy Pilot Study."***

e) The authors have misquoted the work by Ista et al 2005 PCCM in referencing that a score of 11-17 represented comfort and 17-22 represented moderate pain. The original work focused on a score of 10 or under representing over sedation and 23 or greater representing undersedation.

Indeed, taking into consideration the level of sedation in children mechanically ventilated in PICU, Ista et al. focused on a score under 10 representing over sedation and 23 or greater representing undersedation. Harris *et al.* in Intensive Care Med in 2016 recommended a score of 10 or under representing over sedation, and 23 or greater representing undersedation. However, considering pain in children from 0 to 3 years-old, mechanically ventilated in PICU, Harris *et al.* in Intensive Care Med in 2016 recommended a score of 17 or greater as a cut-off point for pain. Moreover, Ista *et al.* concluded that a CBS score between 11 and 22 does not adequately predict under or oversedation, pointing to a need for supplemental observation. Moreover, in our daily practice, we used CBS over 17 as an action level to increase sedation and/or analgesia in children mechanically ventilated in our PICU. It is for all these reasons that we have used a cut-off point of score at 17 to make our receiver operator characteristics curves.

We have so, modified paragraphs:

- "MATERIALS AND METHODS" in subparagraph "Data collection" accordingly to the comment of the reviewer: *"CBS was developed to assess pain and distress in PICU (5,6). It is admitted that CBS values lower than 10 are related to over-sedation whereas CBS over 23 are related to under-sedation (6,8). However, several authors considered value of 17 and over for moderate pain detection (5). In our clinical practice, it is accepted that a score of  $\geq 17$  necessitates appropriate analgesic and/or sedation treatment as adaptation."*
- "ABSTRACT" in "Measurements and Main Results"

f) The other key aspect is that both the paper by Ambuel and Ista found that the physiologic components were the least reliable parts of the score.

Indeed, that is why we have used the Comfort Behaviour Scale and not the Comfort Scale.

g) In the statistical analysis it would be helpful to separate distressful procedures such as suctioning and linen change from potentially painful procedures such as capillary blood gas and bladder catheterization.

In our study, every period of care included more than one procedure. To perform statistical analysis, we have used the maximum score of CBS during each period of care (at T1, T2 and T3) and the minimal NIPE score. Procedures, during a period of care, were carried out together to group the painful and distressful acts to children on the same period of the day as recommended. We cannot separate every procedure as distressful procedure and painful procedure for statistical analysis. Our statistical analysis was performed to study a large period of care and not a type of procedure.

In order to be more explicit, we have added in paragraph "MATERIALS AND METHODS" in subparagraph "Conduct of the study":

*"A single patient could have undergone multiple painful and uncomfortable procedures during a period of care."*

We have added in paragraph "MATERIALS AND METHODS" in subparagraph "Data collection":

*"As every period of care contains multiple painful/distressful procedures, the minimum of NIPEm, the minimum of NIPEi and the maximum of CBS were reported during T1, T2 and T3."*

### 3) Results:

The PIM3 scores reported in this manuscript would suggest a tendency towards low acuity patients and hence the data represented may not be applicable to units with a higher proportion of higher acuity. The bias towards medical patients also suggests that these pain ratings may not be transferable to infants undergoing complex surgery requiring maintenance of mechanical ventilation after the operation.

Indeed, patients presented in our study had a low PIM3 score. Our study was a pilot study to know if NIPE could be used as a tool to evaluate distress in children mechanically ventilated from 1 month to 3 years-old. Our included patients did not undergo complex surgery, that's why the applicability of these results is, for the moment, only valid for mildly severe children. Taking into account of this comment, we have added in paragraph "DISCUSSION" in subparagraph "limitations":

*"Moreover, patients included in our study had a low PIM3 score with a large proportion of medical patients. These results ratings may not be transferable to infants undergoing complex surgery."*

### 4) Discussion:

a) The authors have confused distressing procedures with painful procedures which makes it difficult to accurately assess their findings. They discuss acute pain but, in the results section, they only describe 24 procedures that most clinicians would consider painful.

As explicated previously to respond to the comments to the reviewer, we have been more accuracy with the use of words "pain" and "painful". Indeed, procedures were not all painful, but, for a large majority, distressful. So, we have therefore reoriented the article on children's comfort rather than on pain, as little pain care has been carried out, even if some period of care contained a painful procedure associated with distressful procedures. However, each patient had at least one treatment considered painful during each session of several care. So, we have removed some words "pain", "painful", changed for "distress", "discomfort", "distressful". We have modified the paragraph "DISCUSSION" accordingly, for example:

*"Valencia-Ramos et al. assessed 2 different nebulization systems on comfort in awake patients"*

*"Cremilleux et al. studied unsedated preterm infants (mean gestational age = 29.9 ± 4.2 weeks) who had undergone short duration painful and distressful procedures".*

b) However, agree with their statement that pain is underestimated and undertreated. The authors state that the CBS score increased significantly during procedures confirming that the procedures were associated with pain/discomfort but then state CBS has subjectivity.

We agree the reviewer that the term "subjective" was not adapted regarding the study design. So, we have modified the sentence in paragraph "INTRODUCTION":

*« However, this method is not continuous and depends on the examiner's training and ability to use this clinical tool (6, 10, 11). »*

And in "DISCUSSION":

*“Specifically, the CBS cannot be used for continuous recording. Therefore, there is a need to consider electrophysiological distress monitoring to allow immediate and continuous assessment.”*

## 5) Conclusion

a) Can only make these statements if exclusion of the distressing procedures is excluded. Otherwise, the use of NIPEi may result in greater use of opiates which goes against current trends in pediatrics.

To respond to this comment, as previously described, we have privileged the notion of discomfort as suggested by the reviewer and therefore modified the manuscript (cf. previous comments and answers).

We modified end of “DISCUSSION”:

*“The use of new distress monitoring device such as NIPE to guide analgesia could result in greater use of opiates. However, several randomized clinical studies using the adult monitoring system (ANI, MDMS, Loos, France) during surgery under general anesthesia tend to demonstrate a decrease in opioids consumption when using the ANI monitor to titrate analgesia (28).”*

We have added the reference number 28 in “REFERENCES”:

*“28. Dundar N, Kus A, Gurkan Y, et al. Analgesia nociception index (ani) monitoring in patients with thoracic paravertebral block: a randomized controlled study. J Clin Monit Comput. 2018;32:481–486.”*

We have also modified the paragraph “CONCLUSION”:

*“Specifically, randomized controlled trials are required to measure the impact of analgesia and sedation protocols based on NIPE compared with CBS, particularly regarding total amount of opioid administrated.”*

**Reviewer #2:** I was excited to read this paper as I understand its a bit of machine learning application that uses an algorithm to compare the effect of acute pain on NIPE and CBS scores in sedated ventilated patients under 3 years-old in The abstract is good

### 1) Introduction could be shortened

To respond to this comment and to the first reviewer, we have modified the paragraph “INTRODUCTION” to reduce the number of sentences.

### 2) Methods

a) (can CBS be a supplement)?

We have added as a supplemental material the Comfort Behaviour Scale.

b) Can authors discuss a bit more about Youden index?

In order to explain the Youden's index, we have added in paragraph “MATERIALS AND METHODS” in subparagraph “Statistical analysis”:

*“We calculated the sensitivity, specificity, positive predictive, and negative predictive values according to a standardized definition, as with the Youden's index. Youden's index enables to establish the threshold which maximize both sensitivity and specificity (19). The Youden's index is calculated as follows:  $J = \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$ . The threshold which maximize both sensitivity and specificity corresponds to the maximum value  $J$  (19).”*

c) Results well delineated but no mention of Youden index?

In order to respond to this comment, we have added in paragraph "RESULTS" in subparagraph "NIPE performance":

*"The best cut-off value for a NIPE<sub>i</sub> score threshold using Youden's index was 53. The sensitivity was 80.0%, specificity 73.5%, and positive and negative predictive value were 43.8% and 93.5% respectively."*

d) Discussion can be shortened

So, we have deleted or modified some sentences to shortening the paragraph "DISCUSSION".

### **3) Conclusion is okay**

We have slightly modified the paragraph "CONCLUSION" to respond to the comments of the first reviewer.