

Mémoire de Maîtrise en médecine No

Etude pilote sur la pertinence de la détermination du calcium dans la **sueur** (Sweat-Ca)

Etudiant

Bayard Aimie

Tuteur

Sykiotis Gerasimos

Dpt d'Endocrinologie, Diabétologie et Métabolisme, CHUV

Expert

Matter Maurice

Dpt de Chirurgie Viscérale

Lausanne, 08.04.2019

Table des matières

1 INTRODUCTION.....	3
1.1 ABSTRACT.....	3
1.2 HYPOTHESES ET OBJECTIFS	4
1.3 CARACTERISTIQUES DE L'ETUDE	4
1.4 COLLABORATION	5
2 METHODOLOGIE	5
2.1 AVANT-PROPOS	5
2.2 POUVOIR.....	6
2.3 RECRUTEMENT.....	6
2.3.1 Critère d'inclusion.....	6
2.3.2 Critère d'exclusion	7
2.4 PARTICIPATION ET RETRAIT DE L'ETUDE.....	7
2.5 BENEFICES POUR LES PARTICIPANTS	7
2.6 DEROULEMENT DES CONSULTATIONS	8
2.7 INFORMATION DETAILLEE SUR LE TEST À LA PILOCARPINE	9
2.8 DEROULEMENT DU TEST	10
2.8.1 Prise de sang.....	10
2.8.2 Analyse des échantillons	11
2.9 BUDGET	12
3 RESULTATS.....	12
3.1 CORRELATION.....	13
4 DISCUSSION	14
4.1 PROBLEMES RENCONTRES LORS DE L'ETUDE	14
4.2 INTERPRETATION	16
5 CONCLUSION.....	17
6 BIBLIOGRAPHIE	17

1 Introduction

1.1 Abstract

Le calcium est un électrolyte fréquemment mesuré en médecine, que ce soit dans les contrôles de routine, chez les insuffisants rénaux, en gastro-entérologie, en oncologie ou chez les patients ayant subi une opération de la thyroïde ou des glandes parathyroïdes. En endocrinologie par exemple, une méta-analyse¹ montre qu'entre 7% et 50% des patients présentent une hypoparathyroïdie transitoire après une thyroïdectomie dans le cadre d'un cancer thyroïdien et environ 1.2% des patients vont souffrir d'une hypoparathyroïdie post-opératoire permanente. Dans ce contexte, des suivis réguliers avec de nombreuses prises de sang doivent être effectués jusqu'à la normalisation de la calcémie, ce qui est chronophage, coûteux et contraignant pour le patient tout comme pour le médecin et le système de santé. Il paraît alors pertinent d'envisager d'autres méthodes pour rendre le suivi de la calcémie plus facile et moins invasif pour le patient, avec par exemple de nouveaux dispositifs de monitoring en continu. Ceci permettrait dans le futur d'intervenir plus précocement lors de déviation de la norme en ce qui concerne la calcémie, d'ajuster au mieux les traitements, de possiblement diminuer les coûts liés aux prises de sang ainsi que de réduire le temps et le stress lié au séjour hospitalier des patients.

La sueur est déjà utilisée pour le dépistage de la fibrose kystique, grâce au test à la pilocarpine. En effet le dosage quantitatif du chlore dans la sueur est considéré comme le « Gold Standard » pour le diagnostic de la dysfonction du récepteur CFTR responsable de la mucoviscidose. En outre ce test est également utilisé pour documenter la bonne réponse des traitements modulateurs du CFTR, comme l'Ivacaftor. Bien que les techniques de stimulation de la sueur par iontophorèse à la pilocarpine, mises au point par Gibson et Cooke², existent depuis la fin des années 50, ce n'est que récemment, et grâce aux avancées technologiques dans le domaine de la nanotechnologie, que des études, notamment en néphrologie, en médecine du sport etc., s'intéressent à ce fluide corporel qui a longtemps été laissé pour compte. Que ce soit en ce qui concerne le sodium pour l'insuffisance rénale ou en ce qui concerne le chlore ou le potassium, des études ont démontré des corrélations, plus ou moins fortes suivant les électrolytes, entre leur concentration dans la sueur et celle dans le sang. Néanmoins, ces études³, ne comportant que peu de participants, ne permettent pas pour l'instant de tirer de conclusions définitives.

En ce qui concerne le calcium, la recherche de littérature a montré qu'il n'y avait pas d'études qui s'étaient intéressées à la corrélation entre la concentration de calcium plasmatique et sudoral. Seules des études^{4,5} concernant les conditions de récoltes du calcium ont été réalisées. Elles ont démontré qu'il n'y avait pas de différence significative (moins de 10% de différence) en fonction de la partie du corps choisie pour la récolte. En raison du manque d'études sur le sujet et le potentiel que la sueur représente pour le suivi de la calcémie, il paraît important que des recherches soient effectuées sur ce sujet, c'est pourquoi cette étude s'y intéresse.

¹ Chishom EJ et al. Systematic review and meta-analysis of the adverse effects of thyroidectomy combined with central neck dissection as compared with thyroidectomy alone. *Laryngoscope*. 2009 119 (6):1135-1139.

² Gibson, L.E. and Cooke, R.E., A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis, *Pediatrics*, 23, 545, 1959.

³ Vairo D et al. Towards addressing the body electrolyte environment via sweat analysis: pilocarpine iontophoresis supports assessment of plasma potassium concentration. *Sci Rep*. 2017 7 (1):11801.

⁴ Rianon N et al. Monitoring sweat calcium using skin patches. *Calcif Tissue Int*. 2003 72 (6):694-697.

⁵ Nyein HYY et al. A wearable electrochemical platform for noninvasive simultaneous monitoring of Ca²⁺ and pH. *ACS Nano*, 2016, 10 (7): 7216-7224.

1.2 Hypothèses et objectifs

L'hypothèse de départ de cette étude est qu'il existe une corrélation entre le calcium corrigé plasmatique, reflétant la calcémie réelle indépendamment de la teneur en albumine et du calcium ionisé du sang, et la concentration du calcium dans la sueur. Nous partons du principe que cette hypothèse est valable à la fois pour des valeurs normales et pour des valeurs pathologiques de calcémie.

L'objectif primaire de ce travail de master est de démontrer ou d'infirmer une corrélation entre la calcémie et le calcium dans la sueur sur un échantillon limité de dix patients recrutés au sein du Service d'Endocrinologie du CHUV. Au vu de la taille de l'échantillon réduit, pour que le calcium sudoral puisse être considéré comme un bon indicateur de la calcémie, une forte corrélation entre ces deux paramètres sera requise.

L'objectif secondaire est d'évaluer la faisabilité d'une étude de plus grande envergure et de la mise en place d'un tel système de mesure.

L'objectif à moyen-long terme, si l'hypothèse de départ se vérifie, est le développement d'un système de dosage du calcium simplifié, directement au niveau sueur. L'avantage principal de ce type de technologie est sa non-invasivité. De plus, elle permettrait un monitoring en continu des patients et une détection plus précoce en cas de variations de la norme, et de ce fait, une adaptation anticipée et ajustée du traitement. D'autre part, il pourrait aussi être utilisé en médecine préventive, ou dans le cabinet du généraliste par exemple. Pour envisager une application médicale, il sera peut-être nécessaire, dans le cas où cette étude établit une première corrélation, ou si les données récoltées ne sont pas suffisamment significatives au vu du petit nombre de patient, d'agrandir l'échantillon de base (extension d'étude) ou de réaliser des études complémentaires. De plus, il serait aussi intéressant d'étudier les paramètres influençant la sécrétion du calcium (activité physique, médicaments, etc.) qui seraient susceptibles d'influencer l'excrétion de calcium. Pour cela, en cas de résultats concluants, nous proposerons des pistes de réflexion et calculerons la taille d'échantillon de patients nécessaires afin d'avoir des résultats statistiquement significatifs.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons donc réalisé deux prélèvements sur les dix patients de l'étude, le premier au niveau du sang, l'autre au niveau de la sueur qui a été récoltée de manière quantitative par un test iontophorétique à la pilocarpine (QPTI), via un système de stimulation et de recueil de la sueur (Macroduct®). Ce dernier est utilisé couramment en pédiatrie et pneumologie pour le dépistage de la mucoviscidose.

1.3 Caractéristiques de l'étude

Ce travail s'inscrit dans un projet de recherche clinique. C'est une étude pilote observationnelle, descriptive, quantitative, unicentrique, prenant place au sein du Service d'Endocrinologie, de Diabétologie et Métabolisme du CHUV.

Ce projet de recherche a été mené conformément au protocole, à la Déclaration d'Helsinki, et aux principes de bonnes pratiques cliniques, à la Human Research Act (HRA) et à l'Human Research Ordinance (HRO) règlements pertinents. Le chef de projet reconnaît ses responsabilités à la fois de chef de projet et de commanditaire.

Cette étude ne représente pas de risque particulier. Aucune analyse génétique ou administration de médicaments n'aura lieu dans le cadre de cette étude. Elle fait donc partie de la catégorie A, bas risque, avec des risques minimaux encourus par les

participants, ou plutôt des inconvénients. La seule mesure invasive que représente l'étude est la prise de sang. Les prélèvements sanguins sont effectués par des professionnels de la santé afin garantir l'asepsie et diminuer tout risque d'infection. Le risque de ce prélèvement est le même que les risques de n'importe quelle prise de sang, c'est-à-dire hématome, douleur et risque d'infection. Quant au test à la pilocarpine, il ne présente pas de risque particulier, outre un érythème localisé qui peut survenir dans les heures qui suivent le test à la pilocarpine. Il existe aussi un risque très minime d'urticaire et de brûlure locale. En cas de réaction allergique majeure ayant lieu pendant la mesure, le prélèvement est immédiatement arrêté. Le patient est tenu de nous informer au cas où il présenterait une réaction allergique majeure dans les heures qui suivent le prélèvement.

1.4 Collaboration

Cette étude est également inspirée par la présence locale de Xsensio⁶, une startup innovatrice de l'EPFL fondée en 2014, qui travaille actuellement sur un projet appelé « Lab-on-skin ». Le but de cette startup est de développer, à plus ou moins long terme, une technologie miniaturisée, sous forme de patch, permettant l'analyse et le monitoring en temps réel, 24h/7j, des différents constituants se retrouvant à la surface de la peau et dans la sueur, tels que les électrolytes, les métabolites ou les protéines, grâce à des capteurs issus de la nanotechnologie. Ces capteurs, dotés d'une grande sensibilité de l'ordre du picomolaire, sont en cours de développement en vue d'une future possible utilisation médicale.

A titre indicatif, un autre travail de master, effectué par le Service de Néphrologie du CHUV⁷ et visant à mesurer la concentration de sodium dans la sueur en fonction de différents régimes alimentaires, est également inspiré par la présence locale de Xsensio. Xsensio nous fournit, le temps de l'étude, le système de stimulation et de recueil pour les tests à la sueur (Macroduct®), sans contrepartie de notre part. Il faut néanmoins préciser que Xsensio n'intervient pas dans le déroulement de notre étude sur le calcium (y compris dans l'analyse des données) et qu'aucun accord contractuel avec Xsensio n'a été conclu ou est en cours. Si l'étude devait évoluer vers une collaboration avec Xsensio, le comité d'éthique CER- VD sera avisé, tout comme l'Unité des affaires juridiques du CHUV pour négocier les aspects contractuels.

2 Méthodologie

2.1 Avant-propos

Ce projet de travail de master est une étude pilote, observationnelle, descriptive, quantitative, unicentrique, au sein du Service d'Endocrinologie, de Diabétologie et Métabolisme du CHUV (Lausanne). Elle a pris place entre août 2018 et avril 2019, sous forme de deux consultations. La première consultation est dédiée à fournir toute l'information nécessaire au patient, la deuxième permet les prélèvements de sang et de sueur. Le protocole a reçu la validation du comité d'éthique en août 2018.

⁶Xsensio, Xsensio LAB-ON-SKIN™ Biochemical Data never explored before [En ligne]. [Cité le 23 mars 2019]. Disponible : <https://xsensio.com/>

⁷ Partie de l'étude GenderBOLD, BASEC-ID 2016-01971.

2.2 Pouvoir

Étant donné que cette étude est une étude pilote qui s'inscrit dans un projet de travail de master, nous avons choisi de limiter la taille de l'échantillon et le nombre de mesures, en raison du temps imparti et du financement limité, tout en maintenant une taille d'échantillon qui soit représentative.

Pour que le dosage du calcium dans la sueur puisse être cliniquement utile comme indice de la calcémie, une forte corrélation entre les deux paramètres serait requise. Pour un risque $\alpha = 0.05$ (two-tailed), $\beta = 0.2$ et $r = 0.8$ (coefficient de corrélation indicatif d'une corrélation forte), on calcule un nombre de 10 participants requis (<http://www.sample-size.net/correlation-sample-size/>).

Cet échantillon devrait permettre d'objectiver s'il existe une corrélation entre la teneur en calcium présent dans la sueur et le calcium total et corrigé présents dans le sang, et ce, pour des valeurs de calcémie qu'elles soient indifféremment dans la norme ou non. Si une concordance est retrouvée en faveur de l'hypothèse de départ, d'autres études ultérieures, plus approfondies, et sur un nombre de participants plus important, pourront être envisagées. En fonction des résultats obtenus, nous déterminerons le nombre de patients nécessaires à des études complémentaires.

2.3 Recrutement

Pour cette étude, nous avons choisi de prélever des échantillons de sang et de sueur sur un petit groupe de dix patients, en raison du temps et du budget imparti. Ils ont été recrutés et sélectionnés de manière aléatoire, au sein des consultations ambulatoires du Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Métabolisme du CHUV, par le biais du tuteur du travail de master (Dr G. Sykiotis).

L'étude comprend deux rendez-vous, le premier d'information, le deuxième de récolte. Après identification des patients (screening), les patients sont vus lors de leur consultation de routine, durant laquelle ils reçoivent toutes les informations relatives à l'étude. Le deuxième rendez-vous consiste au prélèvement.

La participation à cette étude est ouverte à toutes les personnes volontaires de plus de 18 ans ne présentant pas de contre-indication (Cf critère d'exclusion). Malgré la diminution de la capacité à produire de la sueur avec l'âge, nous n'avons pas placé de limite supérieure concernant l'âge. Nous avons décidé également de ne pas sélectionner les patients en fonction de leur calcémie, ni de leur maladie endocrinologie de base, ceci afin d'avoir un éventail large de patients et de calcémies. Une différence entre les sexes n'est pas attendue, nous ne ferons donc pas de sélection sur la base de ce critère.

2.3.1 Critère d'inclusion

Cette étude est ouverte à toutes personnes âgées de plus de 18 ans, ne présentant pas de critères de contre-indication.

- Volontaires âgés de plus de 18 ans (Hommes et Femmes), sans limite supérieure d'âge
- Francophones
- Capacité de réaliser l'étude
- Consentement à participer à l'étude

2.3.2 Critère d'exclusion

- Patient atteint de troubles de la sudation (hyperhydrose et hypohydrose), pouvant fausser les mesures en ce qui concerne le calcium sudoral.
- Maladie dermatologique au niveau de l'avant-bras empêchant le test à la pilocarpine.
- Insuffisance rénale avancée connue (eGFR <30 ml/min), ce qui provoque un trouble acido-basique modifiant le calcium ionisé mesuré.
- Femmes enceintes et autres populations vulnérables.
- Personne non consentante.
- Incapacité à comprendre ou à réaliser l'étude.
- Allergie à la pilocarpine.
- Glaucome ou iritis aiguë.
- Asthme.
- Affections cardiovasculaires non maîtrisées ou autres maladies chroniques pour lesquelles les agonistes cholinergiques pourraient représenter un risque (i.e., bronchite emphysémateuse chronique, pancréatite, ulcères gastriques et duodénaux, affections intestinales inflammatoires, colostomie/iléostomie).
- Dermatite atopique.
- Autre maladie atopique modérée ou sévère.

Dans cette étude, nous avons suivi les précautions et contre-indications du Compendium suisse des médicaments concernant la pilocarpine oculaire et cutanée.

2.4 Participation et retrait de l'étude

Les patients sont libres d'accepter ou de refuser la participation à l'étude et sont informés que leur décision qu'elle soit positive ou non, n'influencera pas leur prise en charge médicale habituelle. Les coûts des analyses comprenant le dosage du calcium total, du calcium corrigé dans le sang ainsi que le calcium et l'albumine présents dans la sueur sont bien entendu pris en charge par l'étude.

Les participants ont la possibilité de se retirer à tout moment de l'étude, et ce, sans justificatif. Dans le cas où un/une participant(e) refuse, lors du second rendez-vous, les prélèvements, un autre volontaire sera recruté afin de maintenir la taille de l'échantillon nécessaire à l'étude.

Si le retrait s'effectue après les prélèvements, les données récoltées sont alors anonymisées et peuvent donc être analysées de manière anonyme. L'étude ne peut donc pas comporter de missing data, étant donné qu'il n'y a qu'un seul prélèvement et que les patients ne seront pas revus par la suite. La disparition d'un participant, quelle que soit la nature de cette disparition, ne va pas engendrer de perte de données vu que l'étude ne comporte que deux prélèvements effectués simultanément. En cas de perte d'échantillon, la récolte sera répétée sur le volontaire concerné ou un autre participant sera recruté.

2.5 Bénéfices pour les participants

La participation à cette étude est volontaire et n'apporte aucun bénéfice direct aux participants. En revanche, les résultats obtenus dans cette étude pourront contribuer au développement d'une nouvelle technologie permettant la mesure en continu du calcium dans la sueur. Ceci pourrait permettre de diminuer les contraintes liées aux rendez-vous

et prises de sang pour le contrôle de la calcémie, et d'adapter au mieux le traitement au patient. Les patients peuvent tout de fois demander des dédommagements pour le frais qui découlent directement de la participation à l'étude, tels que les frais de transport, à hauteur de 50 CHF maximum.

2.6 Déroulement des consultations

Cette étude comporte dix patients, recrutés par le biais du tuteur de travail de master. Les patients sont vus lors de deux consultations, la première consultation étant consacrée à la présentation de l'étude. Lors de leur deuxième consultation, un échantillon de sang et un échantillon de sueur seront prélevés dans le but d'être analysés par le laboratoire central du CHUV afin de déterminer leur concentration en calcium total et corrigé et déterminer si une corrélation existe. La sueur sera recueillie de manière non invasive grâce un système de Macroduct®, utilisé pour le dépistage de la mucoviscidose. La prise de sang aura lieu à la fin de la récolte de la sueur ou pendant celle-ci.

Les patients ont reçu toutes les informations nécessaires en ce qui concerne l'étude et les formalités de participation lors de leur premier entretien. L'étude leur a été expliquée oralement de manière détaillée. Ils ont également reçu une feuille d'information (« Information détaillée au patient »), qui résume les points discutés pendant la consultation, sur les méthodes de prélèvements dont le test à la pilocarpine, les conditions de participation et les risques liés aux prélèvements. Ils ont eu l'occasion de poser leur(s) question(s) lors de l'entretien d'information et un temps de quinze minutes lors de la deuxième consultation, y est consacré également. Ils ont également eu l'occasion de poser leurs questions à l'investigateur principal par mail ou téléphone entre les deux séances.

Ils sont aussi informés en ce qui concerne l'anonymat des résultats et leur possibilité de se retirer à tout moment de l'étude. Un temps de réflexion d'au moins 24 heures leur est également accordé pour décider s'ils acceptent de participer ou non à l'étude.

Il n'y a pas de rémunération offerte pour participer à l'étude. Les participants ont pu demander le remboursement des frais de déplacement pour la deuxième séance à hauteur de 50 francs maximum.

Consultation 1 :

Lors de leur consultation de routine au sein du service ambulatoire d'Endocrinologie, de Métabolisme et de Diabétologie du CHUV, les participants reçoivent une information orale détaillée en ce qui concerne l'étude, ses objectifs, les méthodes de prélèvement et les risques qui leur sont liés. Ils sont informés également de leur droit de se retirer à tout moment de l'étude, et ce, sans avoir besoin de fournir de justification. Ils ont à tout moment la possibilité de poser les questions qu'ils jugent nécessaires.

Ils reçoivent également la feuille d'information au patient, leur expliquant l'étude, ainsi que le consentement qu'ils doivent signer et nous rapporter lors de la deuxième consultation.

Consultation 2 :

Lors de la seconde consultation, l'étude pilote est à nouveau expliquée aux participants de manière succincte. Pour les patients qui acceptent de participer, les prélèvements de sang et de sueur peuvent avoir lieu en parallèle de leur consultation de routine au sein

du Service d'endocrinologue du CHUV, ou après celle-ci. Les patients doivent compter cinquante minutes au minimum pour pouvoir participer à l'étude. Les quinze premières minutes sont consacrées aux éventuelles questions restantes et à la signature de la feuille de consentement. Les trente-cinq minutes suivantes sont quant à elle consacrées à la stimulation de la sudation par la pilocarpine, puis récolte de la sueur grâce au Macroduct®. La récolte peut être prolongée, au besoin, jusqu'à quarante minutes afin de disposer d'un volume de sueur suffisant pour effectuer les analyses. En aucun cas ce temps de prélèvement ne peut être dépassé car cela peut fausser les mesures. A la fin de la consultation, une copie du consentement signé sera remise à chaque participant.

Tableau 1 : Agenda

	Consultation 1	Consultation 2
Temps (en semaine)	0	1-2
Screening, crières d'inclusion et d'exclusions	+	-
Informations orales et écrites	+	-
Consentement écrit	-	+
CRF	-	+
Récolte	-	+

2.7 Information détaillée sur le test à la pilocarpine

La pilocarpine est un parasymphaticomymétique qui a une action sur les récepteurs muscariniques. Elle permet donc la stimulation des glandes sudoripares. Elle est notamment utilisée sous forme de collyre, dans le glaucome, afin de diminuer la pression intraoculaire. Les stimulateurs à la sueur utilisent la pilocarpine 0,5% sous forme de gel d'agar (Pilogel), permettant une meilleure stimulation par les électrodes. En effet, les gels de Pilocarpine permettent un meilleur contact entre la peau et les électrodes, en formant une sorte de pont électrique. Ceci permet une stimulation efficace et plus sûre, car il diminue l'intensité du courant nécessaire à une stimulation efficace et amoindrisent le risque de brûlure lié à l'utilisation d'électrodes⁸.

La pilocarpine ne représente pas de risque particulier. Un érythème, une légère sensation de brûlure et de démangeaison peuvent cependant apparaître dans les heures qui suivent et s'amendent spontanément. La pilocarpine ne présente aucun danger systémique. L'étude applique et maintient cependant les précautions du Compendium suisse des médicaments concernant la pilocarpine oculaire et cutanée. En raison de son action cholinergique, les contre-indications pour cette substance sont une hypersensibilité connue au principe actif Pilocarpine, un myosis indésirable ainsi que la grossesse et l'allaitement. Les personnes présentant une ou plusieurs de ces contre-indications ont été encartées de l'étude (Cf. Critères d'exclusion).

⁸ Wescor, Inc., Macroduct™, Mallette de stimulation et recueil pour le test de la sueur [En ligne]. USA ; 1998 [cité le 30 mars 2019]. Disponible : https://www.bium.ch/wp-content/uploads/2019/03/Vancouver_guide_BiUM_2019_0327.pdf

2.8 Déroulement du test

Les prélèvements s'effectuent sur la peau de l'avant-bras. Avant la pose des électrodes, la peau est dégraissée et nettoyée, tout d'abord avec de la Chlorhexidine, puis de l'eau distillée. Elle est ensuite séchée avec une compresse stérile. La stimulation de la sudation se fait à l'aide de deux électrodes (une positive, une négative). Ces dernières sont placées à une distance minimale l'une de l'autre de 2 cm. Des disques de gel froid, imprégnés de pilocarpine (0.5%) et conservés au réfrigérateur, sont placés entre les électrodes et la peau. Une goutte d'eau distillée est déposée à l'aide d'une seringue, de chaque côté des gels, afin de permettre un bon contact avec la peau et avec les électrodes respectivement.

Lors de la stimulation iontophorétique, les patients peuvent ressentir de légers picotements, qui sont néanmoins sans danger. Lorsque l'intensité totale du courant délivré atteint de 1.5 mA, et que la stimulation a été effective, la machine émet un signal sonore avant de s'éteindre automatiquement. Ce processus dure approximativement cinq minutes. Les électrodes sont ensuite enlevées de la peau, et les deux gels de pilocarpine sont jetés.

La peau de l'avant-bras est à nouveau nettoyée à l'eau uniquement, puis séchée à l'aide d'une compresse. Un collecteur capillaire (Macroduct®) est alors déposé à l'endroit où été placée précédemment l'électrode positive. Il est maintenu grâce à un bracelet. La sueur étant transparente, un colorant bleu soluble (colorant alimentaire) permet de rendre visible l'entrée de la sueur dans le système, et permet d'estimer approximativement le volume de la récolte. Selon le fabricant, ce colorant ne devrait pas influencer les mesures de laboratoire effectuées par photométrie. La durée de la récolte est d'environ trente minutes, mais peut se prolonger, au besoin, jusqu'à quarante minutes. Si la quantité de sueur n'est toujours pas suffisante, le dispositif ne peut être laissé plus longtemps. En effet, cela pourrait fausser les analyses. Afin de stimuler la sudation par un effet thermique, nous couvrons l'avant-bras du patient avec bandage et invitons les patients à s'habiller chaudement. Cependant, nous ne conseillons pas au patient d'effectuer de l'exercice physique afin d'augmenter le volume de sueur, car nous ne savons pas comment cela influe sur la sécrétion de calcium.

Pendant la durée de la récolte, les volontaires peuvent profiter de leur temps libre ou peuvent effectuer la prise de sang sur le bras opposé. Après trente minutes, un premier contrôle est effectué pour déterminer si la quantité de sueur est suffisante pour être analysée. Dans ce cas, le dispositif sera enlevé du bras du patient. Dans le cas contraire, le dispositif peut être laissé en place encore dix minutes. Si la quantité de sueur n'est toujours pas suffisante, la récolte sera tout de même interrompue pour éviter une falsification des mesures et les échantillons seront néanmoins amenés au laboratoire central du CHUV afin de savoir si une analyse par dilution peut tout de même être effectuée.

Le capillaire contenu dans le Macroduct® a une capacité totale allant jusqu'à 85 microlitres. Selon le fabricant, le volume de récolte attendu est de 50 à 60 microlitres en trente minutes, ce qui est suffisant pour l'analyse du calcium total et de l'albumine.

2.8.1 Prise de sang

Les patients peuvent effectuer la prise de sang sur le bras opposé lors de leur consultation de routine, pendant la récolte ou à la fin de celle-ci. Les paramètres

analysés dans le sang sont les mêmes que ceux dans la sueur, c'est-à-dire le calcium total et l'albumine. Nous avons renoncé à l'analyse d'autres paramètres pour des questions de coûts.

2.8.2 Analyse des échantillons

Les échantillons de sueur et de sang sont acheminés au Laboratoire Central du CHUV. En ce qui concerne les tests à la sueur, ils doivent tout d'abord être transférés dans une éprouvette afin d'être analysés par photométrie. Les analyses de la sueur ont été effectuées par deux laborantins habitués à manipuler et effectuer des analyses sur ce liquide physiologique. Le calcium sudoral est dosé par photométrie avec la méthode BAPTA, Roche Diagnostics, sur un automate cobas 8000 de Roche Diagnostics.

Dans le cas où la sueur ne peut pas être analysée rapidement (prélèvements effectués en fin de journée, absence des laborantins habilités à effectuer les analyses etc.), les capillaires du Macroduct® sont placés dans un réfrigérateur entre 4 et 8 C, en attendant leur analyse.

Le volume nécessaire pour l'analyse de la sueur est de 50 à 80 microlitres. En raison de la forte variabilité inter-individuelle en ce qui concerne la quantité de sueur produite pendant un temps donné, certains prélèvements peuvent ne pas contenir suffisamment de volume pour l'analyse. Dans ce cas, si le volume est proche de la quantité nécessaire à l'analyse, c'est-à-dire cinquante microlitres, les échantillons peuvent être dilués avec 50% d'eau afin de permettre le dosage du calcium et de l'albumine. Cependant, en diluant la sueur, la méthode d'analyse perd en précision et rend les mesures moins fiables. L'analyse après dilution ne pourra pas être effectuée pour des échantillons de sueur dont le volume est inférieur à vingt microlitres. En effet, cela nécessite plusieurs dilutions en série, rendant les valeurs obtenues après analyse de laboratoire trop aléatoires.

Nous avons choisi de doser 2 éléments dans la sueur et dans le sang qui sont le calcium total et l'albumine.

Nous avons renoncé à l'analyse du PH et le calcium ionisé. En effet, le dosage de ces deux éléments dans la sueur aurait requis un volume d'au moins 70 microlitres à eux seuls, en plus des 60 microlitres nécessaires au dosage du calcium total et de l'albumine. Cela nous aurait contraint à effectuer deux prélèvements de sueur sur chaque patient et aurait engendré des coûts supplémentaires que le budget de l'étude ne permettait pas. De plus, le PH et le calcium ionisé doivent être analysés rapidement après le prélèvement, par gazométrie, machine qui ne se trouve pas dans le service d'Endocrinologie du CHUV. En outre, ceci aurait demandé un transfert de la sueur contenue dans le capillaire du Macroduct vers capillaire du gazomètre médical, ce qui est compliqué en raison du diamètre des capillaires et du matériel à utiliser pour effectuer le transfert.

D'autre part, le PH est modifié au contact de l'air est nécessite une analyse rapide. Étant donné que la durée des prélèvements s'étend sur au moins trente minutes, nous ne savons pas quel effet cela pourrait avoir sur la mesure du PH de la sueur qui se trouve dans un capillaire au contact de l'air libre. De plus, cette étude est une étude pilote, qui vise à déterminer si une corrélation entre le calcium sudoral et la calcémie existe et qui s'intéresse également à la faisabilité de mesurer cet électrolyte dans la sueur. Nous souhaitons donc débuter cette étude sur un petit groupe de patients avec quelques paramètres à analyser, afin d'avoir une première idée sur une éventuelle corrélation,

quitte à élargir par la suite l'étude à d'autres paramètres. Pour toutes ces raisons, nous nous sommes contenus à l'analyse du calcium total et de l'albumine dans la sueur.

2.9 Budget

Cette étude, qui fait partie d'un projet de travail de master, est financée par le CHUV (fonds de l'investigateur principal) et l'Université de Lausanne à hauteur de 700.- (soutenance des travaux de maîtrise). Les coûts des analyses sont estimés à moins de CHF 100 par patients. Des frais de déplacement ne dépasseront pas les CHF 50 par patient, donc CHF 500 au maximum. Les coûts totaux de l'étude s'élèvent ainsi à CHF 1500 maximum.

Les données récoltées appartiennent exclusivement au Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Métabolisme du CHUV. Xsensio est un start-up de l'EPFL qui encourage les étudiants à participer à ce type d'étude. Néanmoins, Xsensio n'a aucun droit sur les données, les résultats et les conclusions de l'étude et n'a aucun pouvoir décisionnel en ce qui concerne une éventuelle publication. Comme précisé, Xsensio n'intervient pas dans le déroulement de l'étude (y compris dans l'analyse des données) et aucun accord contractuel avec Xsensio n'a été conclu ou est en cours. Si l'étude devait évoluer vers une collaboration avec Xsensio, le CER- VD sera avisé, tout comme le Service des affaires juridiques du CHUV pour négocier les aspects contractuels.

3 Résultats

Pour cette étude pilote, nous avons récolté des échantillons de sueur et de sang sur un groupe de dix patients, composés de 60% de femmes (6 sur 10), et de 40% d'hommes (4/10), recrutés au sein du Service d'Endocrinologie, de Diabétologie, et Métabolisme du CHUV. Les prélèvements ont eu lieu au sein du Service d'endocrinologie entre janvier et avril 2019, sous la surveillance du maître d'étude, le Dr G. Sykiotis.

L'âge des volontaires était compris entre 28 et 71 ans, l'âge moyen étant de 44 ans. Pour trois volontaires (30%), une récolte de trente minutes a été suffisante pour atteindre le volume optimal nécessaire à l'analyse par le laboratoire, pour les sept autres patients (70%), le capillaire du Macroduct a été laissé dix minutes de plus afin de disposer d'un volume convenable.

Tableau 2 : Résultats

Patient No	Ca total sanguin (en mmol/l)	Ca corrigé sanguin (en mmol/l)	Ca total sueur (en mmol/l)	Albumine sueur (en mmol/l)
1	2.25	2.18	0.68	0
2	2.37	2.27	0.3	0
3	2.16	2.06	Volume de sueur trop faible pour analyse	
4	2.30	2.22		
5	2.12	2.00	0	0
6	2.23	2.18	0	0
7	2.34	2.22	0	0
8	2.21	2.13	1.4	0
9	2.17	2.07	0.35	3.7
10	2.41	2.33	0.4	< 1

Huit des dix échantillons ont pu être analysés par le laboratoire du CHUV. Pour les deux échantillons restants, dont la récolte a été réalisée le même jour, le dosage du calcium et de l'albumine dans la sueur n'a pas pu être effectué en raison du volume insuffisant. En effet, les échantillons comportaient environ 8 microlitres, volume trop faible pour être analysé, et ce même après dilution.

Un des huit échantillons a dû être dilué par ajout de 50% d'eau, permettant ainsi son analyse mais diminuant la fiabilité de la mesure. Cet échantillon a été le premier à être récolté.

Sur les dix patients recrutés lors de l'étude, tous présentaient un calcium total sanguin dans la norme, trois avaient des valeurs de calcium corrigé sanguin inférieur à la norme, aucun ne présentait par contre d'hypercalcémie. Seul un échantillon de sueur sur les trois patients présentant des valeurs de calcium corrigé sanguin inférieures à la norme a pu être analysé correctement par le laboratoire. En effet, un des deux autres échantillons ne comportait pas suffisamment de volume pour être analysé. Pour l'échantillon restant, la valeur de la calcémie calculée par le laboratoire est de zéro, valeur que nous n'avons pas retenue pour le calcul de la corrélation (Cf. Discussion).

Sur ces huit patients dont la sueur a pu être analysée, trois comportaient une valeur de calcium sudoral et d'albumine égal à zéro. Ces trois échantillons ont été analysés le même jour au laboratoire central du CHUV et ont été exclus du calcul de corrélation (Cf. Discussion).

Un seul des échantillons présentait des traces d'albumine. Dans les autres échantillons la concentration d'albumine était nulle.

3.1 Corrélation

Afin de calculer une éventuelle corrélation, nous avons utilisé le logiciel GraphPad Prism⁹.

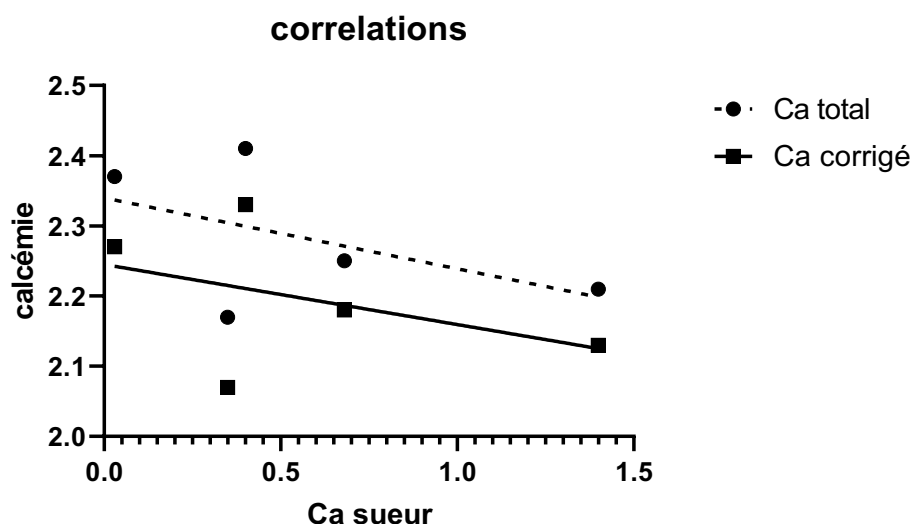


Figure 1 : Corrélation entre le calcium sanguin et le calcium sudoral

⁹ <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/> [cité le 23 mars 2019]

Ce graphique montre une tendance à diminution de calcium dans la sueur avec l'augmentation de la calcémie.

Tableau 3 : Analyse statistique des résultats obtenus

Corrélation	Ca sueur et Ca total sanguin	Ca sueur et Ca corrigé sanguin
Nombre de mesures effectuées	5	5
Pearson r	-0.5039	-0.4224
Intervalle de confiance de 95%	-0.9596 à 0.6812	-0.9505 à 0.7331
R^2	0.2539	0.1784
P value	0.3868	0.4787
Significatif par rapport à $\alpha = 0.05$	NON	NON

La corrélation entre la concentration du calcium dans la sueur et dans le sang est légèrement meilleure pour le calcium total que pour le calcium corrigé. Cependant cette corrélation est faible et n'est pas significative (P value> α). Le large intervalle de confiance concernant le coefficient de corrélation peut être expliqué par la faible taille de l'échantillon.

4 Discussion

4.1 Problèmes rencontrés lors de l'étude

Lors de cette étude pilote, nous avons rencontré de nombreux problèmes et complications qui ont entravé son bon déroulement et ont influé sur les résultats. Entre les contretemps associés au recrutement des patients et à la disponibilité de la machine pour la stimulation ; les soucis en ce qui concerne l'analyse de la sueur, d'une part en raison de volumes trop faibles pour être analysés, et d'autre part en raison de la méthode d'analyse dont les résultats sont peu concluants ; cette étude a nécessité plus de temps et de moyens qu'envisagés au départ. De plus nous n'avons pas recueilli le nombre d'échantillons escomptés.

Tout d'abord, le recrutement des patients au sein du Service d'Endocrinologie s'est avéré plus complexe que prévu. En effet, lors de la mise en place de cette étude pilote, nous pensions pouvoir facilement enrôler des volontaires. Bien que la récolte de sueur soit réalisée de manière non invasive, et que la stimulation ne présente que peu de danger pour la santé des patients, nous ne nous doutions pas faire face à autant de refus de leur part. De plus, la seule mesure réellement invasive nécessaire à l'étude qu'est la prise de sang, aurait eu lieu de toute façon dans la plupart de cas, lors de leur consultation de routine. En outre, l'étude ne comporte que deux rendez-vous qui sont aménageables en regard des rendez-vous de suivi des patients.

Nous supposons donc que le refus des patients émane du temps que nécessite la stimulation et la récolte de la sueur. Effectivement cela réclame, dans le meilleur des cas, quarante minutes de la part des patients (dix minutes d'informations/stimulation et trente minutes de récolte), pouvant aller jusqu'à cinquante minutes voire une heure, ce qui est non négligeable et difficilement réalisable pour des patients qui ont pour la plupart une vie active et d'autres rendez-vous agendés. De plus, certains participants ont eu du mal à se projeter et à imaginer le réel intérêt du développement de ce type de méthode. Surtout qu'aucun dispositif nano technologie n'est en cours de développement à ce jour pour la mesure du calcium dans la sueur et qu'aucune étude n'a encore prouvé qu'un lien existe entre la calcémie et le calcium sudoral existait.

Par ailleurs, les participants ne reçoivent aucun bénéfice direct de leur participation à l'étude. Seul des frais directement liés à leur participation, comme les frais de déplacement, peuvent être remboursés. Par conséquent, cela impacte également l'intérêt des volontaires.

Pour pallier à ce problème de recrutement et de temps de prélèvement, nous pourrions imaginer un réaménagement de la consultation et débiter la stimulation avant que le patient soit vu par le médecin du service. La récolte de la sueur aurait donc lieu en même temps que la consultation de routine du patient, diminuant ainsi les contraintes liées au temps d'attente des patients.

Un autre élément qui a compromis la bonne réalisation de l'étude est lié à la récolte de la sueur elle-même. En effet, nous avons dû faire face à un problème en raison d'un volume de sueur insuffisant pour être analysé (et ce même après dilution). Cette difficulté est survenue par deux fois lors d'une des journées de récolte. Les échantillons en question comportaient un volume inférieur à huit microlitres, ce qui est trop modeste pour être analysé par le laboratoire. Deux hypothèses peuvent être émises quant à cette récolte infructueuse.

La première explication est tout simplement que les patients présents ce jour-là transpirent de manière moins importante que la population générale.

La deuxième explication est qu'il est possible que les gels de pilocarpine utilisés le jour ou ses deux prélèvements ont eu lieu, aient été défectueux. Puisque ces deux prélèvements problématiques ont été effectués à la même date, nous penchons plutôt pour cette deuxième hypothèse. En effet, après changement des gels de pilocarpine concernés, nous n'avons plus rencontré de problème lié à un volume de sueur insuffisant. Nous avons estimé que le problème pouvait être dû à des gels périmés car venant d'un flacon trop longtemps ouvert, bien que nous ayons testé par la suite à nouveau les gels et que la stimulation a été assez efficace pour avoir un volume analysable. L'autre éventualité qui pourrait expliquer cela est les conditions dans lesquelles les gels ont été utilisés. En effet, ils ont été sortis du réfrigérateur dans lequel ils sont stockés, plusieurs dizaines de minutes avant leur utilisation, ce qui peut expliquer une stimulation moins efficace en raison d'une diminution de la conduction du courant électrique.

Ayant pris connaissance de ce problème, nous avons donc décidé, de manière préventive, de ne plus utiliser les anciens gels et de sortir les gels de pilocarpine du réfrigérateur au moment de la mesure. Avec ces précautions, toutes les mesures qui ont suivi comportaient suffisamment de sueur pour être analysées.

Autre point à soulever concerne certains résultats inattendus, obtenus lors des analyses du laboratoire. En effet trois échantillons, prélevés à un jour d'intervalle, mais analysés simultanément, ne présentaient ni calcium, ni albumine, alors que tous les autres échantillons de l'étude étaient dotés de calcium. Par conséquent, nous spéculons que ces trois mesures, sont liées à un problème de laboratoire. Ceci constitue uniquement une hypothèse qui nécessiterait des mesures complémentaires, par répétition des prélèvements sur les volontaires concernés ou par une extension de l'étude qui permettrait de voir si d'autres individus présentent aussi une sueur exempte de calcium.

Il est possible qu'il existe une certaine variabilité interindividuelle concernant l'excrétion du calcium dans la sueur, même si ceci n'a pas été vérifié par des études. Toutefois, cette variabilité interindividuelle devrait être aléatoire dans la population. Il nous paraît donc peu probable que les trois échantillons de sueur, analysés le même jour, et comportant une quantité de calcium égale à zéro, soit le fruit de cette variabilité étant donné que toutes les autres mesures comportaient du calcium et que nous n'avons plus eu de résultats nuls par la suite. Nous supposons donc une erreur de mesure liée à l'analyse laboratoire, que nous ne pouvons malheureusement pas complètement expliquer. De plus les échantillons ne comportaient pas suffisamment de sueur pour être analysés une seconde fois et infirmer ce résultat. Nous les avons donc mis de côté et ne les avons pas inclus dans le calcul de corrélation, bien que nous ne savons pas s'ils sont réellement dû à un problème de laboratoire. Cependant il aurait été intéressant d'effectuer à nouveau des prélèvements sur ces trois patients afin de documenter si ces résultats sont réellement la conséquence d'une mesure aberrante du laboratoire.

Pour toutes ces raisons, le nombre d'échantillons réellement analysés et pris en compte pour établir la corrélation entre la calcémie et le calcium sudoral est de cinq, soit 50% des échantillons prélevés. Il est à noter que sur ces cinq échantillons de sueur, le premier a dû être dilué pour être analysé, ce qui peut rendre la concentration de calcium obtenu moins fiable.

4.2 Interprétation

En ce qui concerne les résultats à proprement parler, nous constatons une diminution de la concentration du calcium dans la sueur avec l'augmentation de la calcémie (coefficient de Pearson négatif), alors que nous attendions plutôt une corrélation positive. Cette corrélation semble légèrement meilleure en ce qui concerne le calcium total qu'avec le calcium corrigé sanguin, sans être cependant significatif. En raison du large intervalle de confiance du coefficient de Pearson, il n'est pas possible d'affirmer la supériorité de la corrélation du calcium total par rapport au calcium corrigé. De plus, étant donné que $|r| < 0,8$, nous pouvons en déduire que la corrélation n'est pas aussi forte qu'attendu et que la relation linéaire est modérément positive.

De plus nous n'avons que peu d'informations concernant les valeurs pathologiques de calcémie. En effet, nous ne disposons que d'une seule mesure de calcium sudoral provenant d'un patient avec un calcium corrigé sanguin en dehors des valeurs de la norme. Avec une seule valeur, il est donc impossible de savoir si une corrélation existe pour des calcémies pathologiques.

Par conséquent, la corrélation pour les valeurs récoltées n'est pas significative (P value $> \alpha$ et relation linéaire modérément positive). L'intervalle de confiance pour le coefficient de corrélation est large ce qui ne permet pas d'exclure formellement une corrélation, ni de la confirmer. La largeur de l'intervalle est explicable par le faible nombre de mesures analysées et pourrait être réduit en augmentant la taille de l'échantillon. Pour

atteindre les dix mesures prévues à au départ de l'étude, avoir plus échantillons provenant de patient avec une calcémie pathologique et pouvoir réduire l'intervalle de confiance, il faudrait effectuer entre 7 et 10 prélèvements supplémentaires en tenant compte des paramètres qui influent sur la récolte et l'analyse des échantillons (50% des échantillons n'ont pas pu être analysés correctement pour des questions de volume ou de supposés problème de laboratoire).

Cependant en raison de l'absence de forte corrélation que ce soit entre le calcium corrigé ou total sanguin et le calcium dans la sueur, et en raison des problèmes de récolte et d'analyses de laboratoire rencontrés au cours de l'étude et dont nous ne comprenons pas réellement l'origine, il ne paraît pas approprié d'essayer de compléter l'échantillon de base et ainsi diminuer l'intervalle de confiance. Par conséquent, l'extension de l'étude afin de permettre une analyse de paramètres supplémentaires tel que le PH par exemple, n'est pas raisonnable et envisageable à l'heure actuelle.

5 Conclusion

Les analyses effectuées lors de cette étude pilote ne permettent pas de prouver ni d'infirmer qu'il existe bel et bien une corrélation que ce soit entre le calcium total ou corrigé sanguin et le calcium dans la sueur. En raison de cette absence de corrélation forte et des difficultés rencontrées lors de cette étude, tels que les problèmes liés à la récolte et à l'analyse des échantillons, nous estimons qu'il n'est pas judicieux d'étendre cette étude à un plus grand nombre de patients, avant d'avoir compris et élucidé les paramètres pouvant influencer sur la récolte et l'analyse du calcium (tels que les soucis liés au laboratoire par exemple). De plus, au vu du nombre de récoltes infructueuses, soit prêt de 50% des mesures effectuées lors de cette étude, l'investissement en temps et en argent que cela demanderait est trop important par rapport au bénéfice envisageable, c'est pourquoi nous ne trouvons pas raisonnable de poursuivre cette étude dans l'état actuel de nos connaissances.

6 Bibliographie

1. Chishom EJ et al. Systematic review and meta-analysis of the adverse effects of thyroidectomy combined with central neck dissection as compared with thyroidectomy alone. *Laryngoscope*. 2009 119 (6):1135-1139.
2. Vairo D et al. Towards addressing the body electrolyte environment via sweat analysis: pilocarpine iontophoresis supports assessment of plasma potassium concentration. *Sci Rep*. 2017 7 (1):11801.
3. Rianon N et al. Monitoring sweat calcium using skin patches. *Calcif Tissue Int*. 2003 72 (6):694-697.
4. Nyein HYY et al. A wearable electrochemical platform for noninvasive simultaneous monitoring of Ca²⁺ and pH. *ACS Nano*, 2016, 10 (7): 7216-7224.
5. Xsensio, Xsensio LAB-ON-SKIN™ Biochemical Data never explored before [En ligne]. [Cité le 23 mars 2019]. Disponible : <https://xsensio.com/>
6. Hammond KB et al. Clinical evaluation of the macroduct sweat collection system and conductivity analyzer in the diagnosis fibrosis. *J Pediatr*. 1994 124 (2):255-260.