

## Article original

**Etude comparative de deux méthodes de dosage de la 25-hydroxyvitamine D : CLHP-UV versus immunoessai VITROS® tVitD chez des patients hémodialysés****Comparative Study of Two Methods for Measuring 25-Hydroxyvitamin D: HPLC-UV Versus VITROS® tVitD Immunoassay in Haemodialysis Patients**

BELLEILI Mehdi <sup>1</sup>, GOURI Adel <sup>2\*</sup>, LAALAOUNA Abdeldjalil <sup>3</sup>, HADEF Youcef <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Médecine, Université Badji Mokhtar, Annaba.

<sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie Clinique, CHU Ibn Rochd, Faculté de Médecine, Université Badji Mokhtar, Annaba

<sup>3</sup>Laboratoire de Chimie Analytique, Département de pharmacie, Université Mentouri 3, Constantine.

\* Auteur correspondant : [adel.gouri@univ-annaba.dz](mailto:adel.gouri@univ-annaba.dz)

**Introduction** La vitamine D est essentielle à la régulation du métabolisme osseux et au maintien de la santé osseuse. Chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique sous hémodialyse, les carences en vitamine D sont fréquentes, rendant nécessaire une évaluation précise du statut en 25-hydroxyvitamine D [25(OH)D] pour initier une supplémentation. L'objectif de cette étude est d'évaluer la corrélation et les différences analytiques entre la technique de chromatographie liquide à haute performance avec détection en ultraviolet (CLHP-UV), considérée comme référence, et le test VITROS® tVitD par méthode de chimiluminescence améliorée.

**Matériel et méthodes** L'étude a inclus 30 patients atteints d'insuffisance rénale chronique sous hémodialyse (groupe 1) et 11 témoins sains (groupe 2). Les dosages de 25-hydroxyvitamine D [25(OH)D] ont été réalisés par les deux méthodes : CLHP-UV et VITROS® tVitD. Les résultats obtenus ont été comparés en utilisant la régression de Passing-Bablok, adaptée pour comparer des méthodes en présence d'erreurs de mesure dans les deux variables, et l'analyse de Bland-Altman, permettant d'évaluer l'accord entre deux techniques de mesure. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Analyse-it®.

**Résultat** Le dosage de la 25-hydroxyvitamine D [25(OH)D] sur l'automate VITROS® ECIQ a donné des valeurs nettement supérieures à celles obtenues par CLHP, y compris chez les patients dialysés supposés carencés en vitamine D, où aucune valeur inférieure à 30 ng/mL n'a été observée. L'analyse des variations analytiques dans le groupe 1 révèle des différences très significatives entre le test VITROS® tVitD et le test CLHP-UV, avec un biais négatif marqué (-96,07 %). Dans le groupe 2, le test VITROS® tVitD fournit des valeurs différentes et inférieures à celles du test CLHP-UV.

**Conclusion** Le test VITROS® tVitD ne peut être utilisé en routine pour l'évaluation du statut vitaminique chez des sujets supplémentés surtout les sujets atteints d'une pathologie en relation avec le déficit en vitamine D mais il se révèle pratique et fiable pour la population relativement en bonne santé.

**Mots clés :** Vitamine D, hémodialyse, chimiluminescence, HPLC, Immunoessai

**Abstract**

**Introduction** Vitamin D is essential for regulating bone metabolism and maintaining bone health. In patients with chronic kidney disease undergoing haemodialysis, vitamin D deficiencies are common, necessitating an accurate assessment of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] status to initiate supplementation. The objective of this study is to evaluate the correlation and analytical differences between high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV), considered the reference method, and the VITROS® tVitD test using enhanced chemiluminescence.

**Materials and Methods** The study included 30 patients with chronic kidney disease on haemodialysis (group 1) and 11 healthy controls (group 2). Measurements of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] were performed using both methods: HPLC-UV and VITROS® tVitD. The results obtained were compared using Passing-Bablok regression, suitable for comparing methods in the presence of measurement errors in both variables, and Bland-Altman analysis, which evaluates the agreement between two measurement techniques. Statistical analyses were conducted using the Analyse-it® software.

**Results** The measurement of 25(OH)D using the VITROS® ECIQ analyser yielded values significantly higher than those obtained by HPLC-UV, including in haemodialysed patients presumed to be deficient in vitamin D, where no values below 30 ng/mL were observed. Analytical variation analysis in group 1 revealed very significant differences between the VITROS® tVitD test and the HPLC-UV test, with a marked negative bias (-96.07%). In group 2, the VITROS® tVitD test provided values that differed from and were lower than those of the HPLC-UV test.

**Conclusion** The VITROS® tVitD test cannot be routinely used for assessing vitamin D status in supplemented individuals, particularly those with conditions related to vitamin D deficiency. However, it proves to be practical and reliable for a relatively healthy population.

**Keywords:** *Vitamin D, haemodialysis, chemiluminescence, HPLC, immunoassay*

---

## Introduction

La vitamine D joue un rôle pivot dans la régulation du métabolisme phosphocalcique, la minéralisation osseuse et la modulation des fonctions immunitaires et cardiovasculaires [1]. Chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC), notamment ceux sous hémodialyse, la prévalence des carences en 25-hydroxyvitamine D [25(OH)D] dépasse 80 %, en raison de facteurs tels que l'exposition solaire limitée, les pertes protéiques et l'altération de la hydroxylation rénale [2,3]. Ces déficits exacerbent les risques de fragilité osseuse, d'hyperparathyroïdie secondaire et de morbidité cardiovasculaire, soulignant l'importance d'une évaluation précise du statut vitaminique pour guider la supplémentation [4,5].

Bien que la chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection ultraviolette (CLHP-UV) soit considérée comme la méthode de référence pour doser la 25(OH)D, son utilisation en routine clinique reste limitée par son coût élevé et sa complexité technique [6]. En pratique, les tests automatisés, tels que le VITROS® tVitD par chimiluminescence améliorée, sont privilégiés pour leur rapidité et leur accessibilité [7]. Cependant, des variations inter-méthodes ont été rapportées, potentiellement influencées par les différences de détection des isoformes de la vitamine D ou des métabolites inactifs, ce qui pourrait impacter la prise en charge thérapeutique des patients dialysés [8,9].

Cette étude vise à comparer la performance analytique du test VITROS® tVitD avec celle de la CLHP-UV chez des patients en IRC sous hémodialyse, en évaluant leur corrélation, leur concordance et les biais cliniquement significatifs. Les résultats pourraient éclairer les pratiques de laboratoire et optimiser les stratégies de supplémentation, alignées sur les recommandations récentes de la KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) sur la gestion des troubles minéraux et osseux dans l'IRC [10].

## Matériel et méthodes

### Population d'étude

Pour évaluer la corrélation entre la méthode de référence par chromatographie liquide haute performance avec détection UV (CLHP-UV) et le test VITROS® tVitD par chimiluminescence, deux cohortes distinctes ont été constituées. Le Groupe 1 comprenait 28 patients atteints d'insuffisance rénale chronique terminale (IRC-T), traités par hémodialyse itérative (trois séances hebdomadaires) pendant plus de trois mois au service de néphrologie de l'hôpital Ibn Sina (CHU Annaba, Algérie). Les critères d'inclusion étaient une supplémentation en vitamine D native (cholécalférol/ergocalciférol) ou en dérivés hydroxylés (par exemple, calcitriol), tandis que les patients sous dérivés alpha-hydroxylés (par exemple, alfacalcidol) ou non dialysés étaient exclus.

Le Groupe 2 incluait 13 témoins recrutés lors de bilans biologiques de routine au service de biochimie de l'hôpital Ibn Rochd (Annaba, Algérie). Les critères d'inclusion exigeaient une fonction rénale normale (urée et créatinine sériques dans les intervalles de référence) et l'absence de supplémentation en vitamine D ou dérivés. Les patients présentant des antécédents de pathologies rénales, hépatiques ou métaboliques étaient exclus.

### Collecte et préparation des échantillons

Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur tube sec (sans anticoagulant), centrifugés à  $3000 \times g$  pendant 10 minutes pour isoler le sérum. Les échantillons ont été aliquotés et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  (réfrigérateur DAIREI) jusqu'à analyse. Les contrôles et calibrants ont été stockés à  $2-8^{\circ}\text{C}$  (réfrigérateur Haier BIO-MEDICAL).

### Matériels et réactifs

Les dosages de la 25-hydroxyvitamine D [25(OH)D] ont été réalisés en parallèle sur deux systèmes :

1. **CLHP-UV** : Système SHIMADZU Prominence-i LC-2030C équipé d'une colonne RESTEK Ultra C18 (5  $\mu\text{m}$ ,  $250 \times 4,6$  mm) et d'un détecteur UV réglé à 265 nm.
2. **VITROS® tVitD** : Automate VITROS® ECIQ (Ortho Clinical Diagnostics) utilisant une méthode immunologique par chimiluminescence compétitive.

Les substances de référence incluaient un standard de 25(OH)D (46,5 ng/mL, Shenzhen New Industries Biomedical) et des calibrants OCD® (S1 : 12,8 ng/mL ; S2 : 126 ng/mL). Le contrôle C1 (40–75 ng/mL, OCD®) a été utilisé pour valider la précision intra-essai.

### Protocole analytique

#### Méthode CLHP-UV

Cette méthode repose sur la séparation des isoformes 25(OH)D<sub>2</sub> et 25(OH)D<sub>3</sub> par partage entre une phase stationnaire C18 et une phase mobile composée d'acétonitrile, de méthanol et d'eau (700:290:10, v/v/v). Après ajout de 100  $\mu\text{L}$  d'un mélange de triglycérides/magnésium (Tg/Mg) à 500  $\mu\text{L}$  de sérum, les protéines ont été précipitées avec 500  $\mu\text{L}$  d'acide trichloroacétique (TCA). Le mélange a été vortexé (30 secondes), centrifugé (14 000 tr/min, 15 minutes), puis purifié par extraction en phase solide (EPS) sur cartouche Chromabond C18. Les analytes ont été élués avec 1 mL de méthanol avant injection (100  $\mu\text{L}$ ) dans le système CLHP. Les conditions chromatographiques incluaient un débit de 1 mL/min, une température de colonne à  $32^{\circ}\text{C}$  et une température d'injecteur à  $5^{\circ}\text{C}$ .

#### Méthode VITROS® tVitD

Le test VITROS® tVitD repose sur une méthode immunologique par chimiluminescence compétitive (CLIA) permettant le dosage quantitatif de la 25-hydroxyvitamine D totale [25(OH)D] dans le sérum humain. Cette technique utilise un anticorps monoclonal spécifique et de la *vitamin D-binding protein* (VDBP) recombinante pour détecter équitablement les isoformes 25(OH)D<sub>2</sub> et 25(OH)D<sub>3</sub>, indépendamment de leur affinité pour la VDBP endogène.

### Etude de comparaison :

Avant analyse, les échantillons sériques ont été décongelés à température ambiante jusqu'à obtention d'une fluidité optimale. Les concentrations de 25-hydroxyvitamine D [25(OH)D] ont été déterminées en parallèle par les méthodes CLHP-UV et VITROS® tVitD, avec réalisation de tous les dosages le même jour pour chaque appareil. La validité des résultats a été préalablement vérifiée par l'utilisation de calibrateurs et contrôles conformes aux spécifications des fabricants.

### Méthodes statistiques :

Les données ont été traitées selon une approche statistique en trois phases. Premièrement, la linéarité entre les deux méthodes a été évaluée via le coefficient de corrélation de Pearson ( $r$ ), mesurant la force et la direction de l'association entre les valeurs de 25(OH)D obtenues par CLHP-UV et VITROS® tVitD. Deuxièmement, une régression de Passing-Bablok, méthode non paramétrique robuste aux valeurs aberrantes, a été appliquée pour estimer la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite de régression. Ces paramètres ont été comparés aux valeurs théoriques attendues en cas de parfaite concordance (pente = 1, ordonnée = 0), permettant de détecter des biais systématiques (décalage constant) ou proportionnels (variation dépendante de la concentration). Enfin, une analyse de Bland-Altman a quantifié les différences analytiques en calculant le biais moyen

(moyenne des écarts entre les méthodes) et les limites d'accord (écart-type  $\times 1,96$ ), exprimées en ng/mL et en pourcentage, afin d'évaluer la variabilité cliniquement acceptable.

L'ensemble des analyses a été réalisé avec le logiciel Analyse-it® (version d'essai, intégré à Microsoft Excel), en adoptant un seuil de significativité de  $p < 0,05$  pour l'interprétation des résultats.

### Résultats :

#### Concentrations sériques de 25(OH)D

Les concentrations de 25-hydroxyvitamine D [25(OH)D] mesurées par CLHP-UV et VITROS® tVitD dans les échantillons de patients dialysés (Groupe 1,  $n = 28$ ) et de témoins (Groupe 2,  $n = 13$ ) sont résumées dans le Tableau 1. Une divergence marquée entre les deux méthodes a été observée, avec des valeurs systématiquement plus élevées pour le VITROS® tVitD chez les patients (ex. P1 : 12,67 vs 57,9 ng/mL ; P26 : 3,36 vs 43,5 ng/mL). Chez les témoins, les écarts étaient moins prononcés mais persistants (ex. N1 : 14,20 vs 10,9 ng/mL ; N13 : 24,01 vs 18,6 ng/mL).

**Tableau 1. Teneurs en 25(OH)D par le test HPLC-UV tVitD et le test VITROS® tVitD**

N° d'éch	Concentration ng/mL (Test HPLC-UV)	Concentration ng/mL (Test VITROS®)	N° d'éch	Concentration ng/mL (Test HPLC-UV)	Concentration ng/mL (Test VITROS®)
P1	12,67	57,9	P22	9,78	45,4
P2	36,06	40,5	P23	10,45	34,1
P3	35,09	58,8	P24	11,19	17,8
P4	39,31	45,2	P25	16,44	43,1
P5	34,50	114	P26	3,36	43,5
P6	33,71	30,4	P27	4,89	66,6
P7	13,87	41,9	P28	7,49	90,2
P8	12,84	50,3	N1	14,20	10,9
P9	11,30	66,3	N2	36,46	21,8
P10	14,40	63,7	N3	29,60	25,6
P11	26,79	140	N4	30,88	25,3
P12	10,15	51,7	N5	27,41	29,5
P13	10,66	19,5	N6	28,15	16,9
P14	15,46	35,2	N7	27,19	27,3
P15	14,16	82,7	N8	31,11	61,7
P16	11,16	28,8	N9	28,61	19,8
P17	33,63	73,4	N10	30,42	25,3
P18	32,60	33,1	N11	13,95	15,6
P19	28,22	85,1	N12	31,45	8,5
P20	32,03	58,5	N13	24,01	18,6
P21	11,28	< 8		P : Patient	N : Témoin

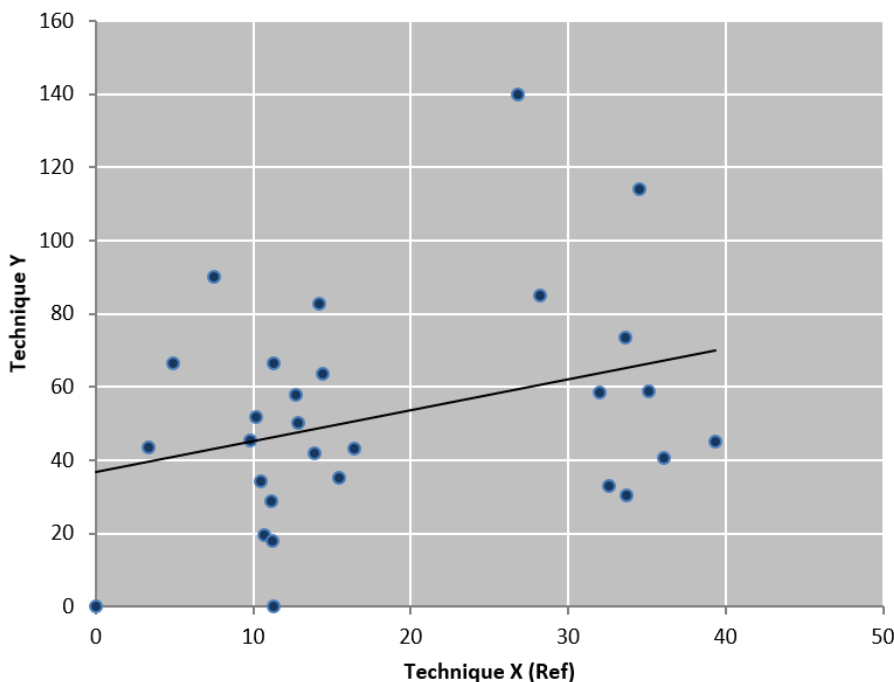
#### Analyse de corrélation dans le Groupe 1

La cohorte de patients dialysés (*âge médian* : 40,5 ans ; 68 % d'hommes) comprenait 21,4 % de sujets supplémentés en vitamine D3. L'analyse de corrélation a révélé une linéarité faible entre les méthodes (coefficient de Pearson :  $r = 0,259$ ), rejetant l'hypothèse d'une relation linéaire forte ( $p < 0,05$ ). La régression de Passing-Bablok a montré une équation de  $y(\text{VITROS}^\circledast) = 0,66x(\text{CLHP-UV}) + 41,55$ , indiquant un biais

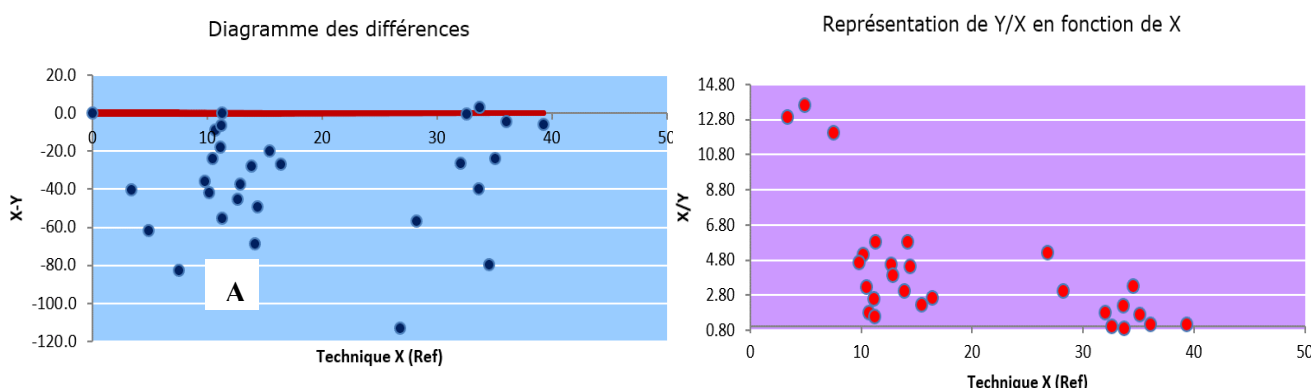
proportionnel (pente  $\neq 1$ ) et un décalage systématique (ordonnée  $\neq 0$ ). Bien que l'intervalle de confiance de la pente [0,33–0,98] inclue partiellement la valeur théorique de 1, l'ordonnée à l'origine [31,14–52,76] s'écarte significativement de zéro, soulignant un biais constant marqué. **(Figure 1)**

L'analyse de Bland-Altman a confirmé un biais moyen de +38,2 ng/mL en faveur du VITROS® tVitD, avec des limites d'accord larges (IC 95 % : -12,5 à +88,9 ng/mL). Ces résultats suggèrent une variabilité analytique cliniquement inacceptable entre les deux méthodes, particulièrement chez les patients dialysés présentant des concentrations basses en 25(OH)D (< 20 ng/mL). **(Figure 2)**

### Regression linéaire



**Figure 1** – Analyse de régression de Passing-Bablok (n = 28 patients dialysés)



En abscisse : les résultats de la technique de référence HPLV-UV tVitD. **A.** En ordonnée : différence entre les mesures par les deux techniques comparées (test VITROS® tVitD – test HPLV-UV tVitD).

**B.** En ordonnée : Rapport des mesures par les deux techniques comparées (test HPLV-UV tVitD/ test VITROS® tVitD). Les résultats sont exprimés en ng/mL.

**Analyse de corrélation dans le Groupe 2 (Témoins)**

L'analyse a porté sur 13 individus (44 % d'hommes, 56 % de femmes), âgés de 27 à 70 ans (âge médian : 74 ans), présentant une fonction rénale normale et aucun antécédent de supplémentation en vitamine D native ou dérivés hydroxylés.

L'analyse de corrélation entre les méthodes CLHP-UV et VITROS® tVitD a été réalisée à l'aide d'une régression de Passing-Bablok, aboutissant à l'équation suivante :

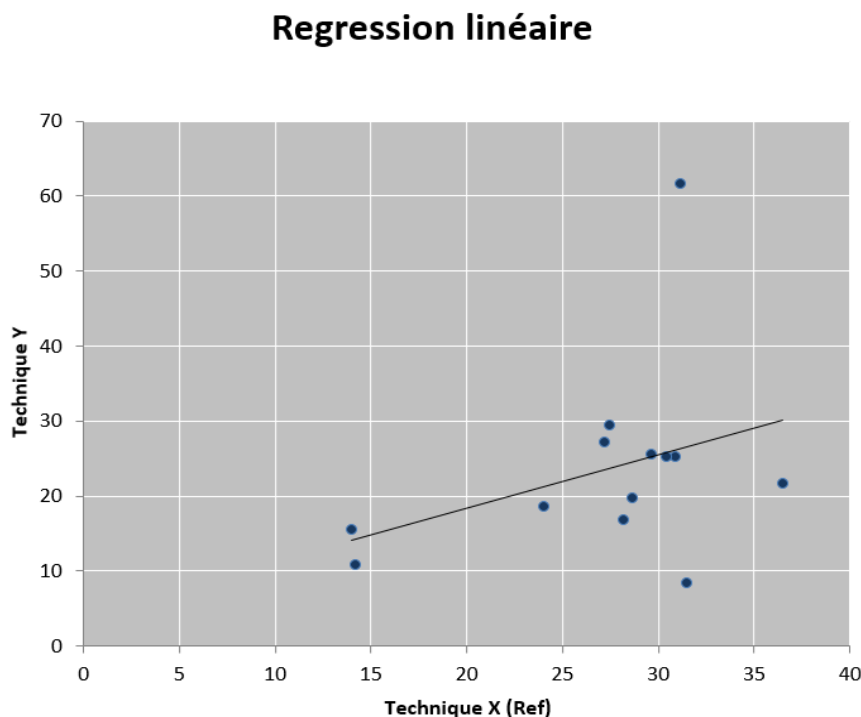
$$y(\text{VITROS}^{\circledR}) = 1,20 \times x(\text{CLHP-UV}) - 8,24$$

où  $y$  et  $x$  représentent respectivement les concentrations mesurées par VITROS® et CLHP-UV. L'ordonnée à l'origine (-8,24 ng/mL) n'a pas montré de différence systématique significative, son intervalle de confiance à 95 % incluant la valeur zéro ( $p > 0,05$ ). De même, la pente de 1,20, dont l'intervalle de confiance englobe la valeur théorique de 1, écarte l'hypothèse d'un biais proportionnel cliniquement pertinent. **(Figure 3)**

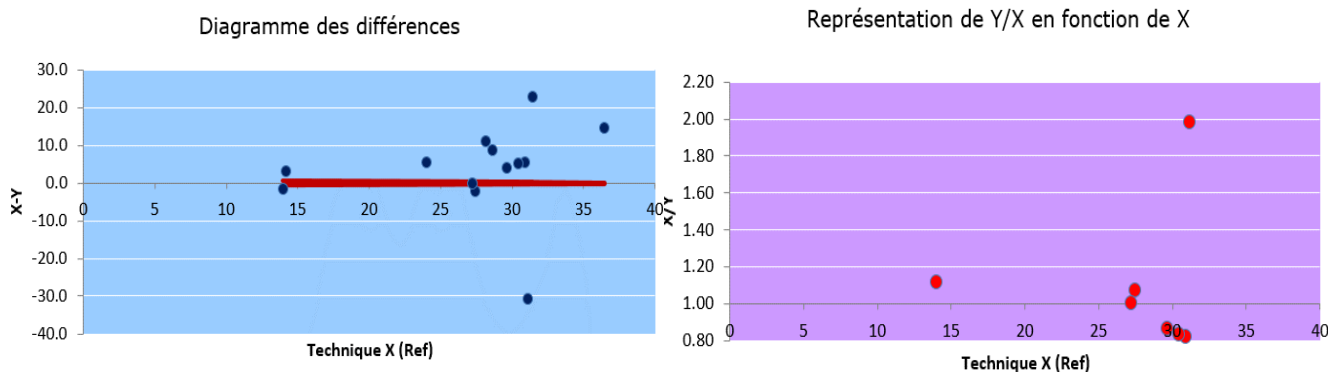
Le coefficient de corrélation de Pearson ( $r = 0,730$ ) indique une association linéaire modérée entre les deux méthodes.

Ces résultats contrastent fortement avec ceux observés chez les patients dialysés, où des écarts analytiques marqués ont été identifiés. L'absence de biais significatif chez les témoins suggère que les divergences observées dans le Groupe 1 pourraient être liées à des facteurs spécifiques à l'insuffisance rénale chronique, tels que l'accumulation de métabolites interférents, une altération de la liaison à la *vitamin D-binding protein* (VDBP), ou des variations de la matrice sérique chez les patients urémiques.

L'analyse de Bland-Altman, illustrée par la **Figure 4**, a permis de quantifier la concordance entre les méthodes CLHP-UV et VITROS® tVitD dans le Groupe 2 (témoins). La différence moyenne entre les deux techniques s'élève à **-2,75 ng/mL**, indiquant une légère sous-estimation systématique du VITROS® par rapport à la méthode de référence. L'écart-type des différences, calculé à **8,54 %**, reflète une dispersion modérée des données autour du biais moyen.



**Figure 3.** Analyse selon Passing-Bablok à partir de sérums de 13 patients.



En abscisse : les résultats de la technique de différence HPLV-UV tVitD. **A.** En ordonnée : différence entre les mesures par les deux techniques comparées (test VITROS® tVitD - HPLV-UV tVitD). **B.** en ordonnée : Rapport des mesures par les deux techniques comparées (HPLV-UV tVitD/ test VITROS® tVitD). Les résultats sont exprimés en ng/mL

### Discussion :

Les méthodes immunologiques de dosage de la 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D), bien que largement utilisées en routine pour leur rapidité et leur automatisation, présentent plusieurs limites analytiques. Malgré des améliorations récentes et des efforts de standardisation, des écarts notables persistent entre les concentrations mesurées par immunoessai et celles obtenues par des méthodes de référence chromatographiques (HPLC ou LC-MS/MS) [11]. Ces écarts s'expliquent en partie par un manque de spécificité absolue des anticorps utilisés : par exemple, certains immunoessais reconnaissent incomplètement la 25(OH)D<sub>2</sub>, avec une réactivité croisée pouvant être inférieure à 50% pour ce métabolite, entraînant une sous-estimation du taux total en cas de supplémentation en ergocalciférol [12]. À l'inverse, de nombreux immunoessais présentent une réactivité croisée quasi-intégrale avec le 24,25-dihydroxyvitamine D, principal produit de dégradation du 25(OH)D, ce qui peut conduire à une surestimation légère des résultats in vitro par inclusion de ce métabolite [13]. Par ailleurs, l'étape de dissociation de la 25(OH)D de sa protéine porteuse (vitamin D binding protein, VDBP) dans les protocoles immunologiques peut être incomplète : il a été démontré que les erreurs de mesure des immunoessais sont corrélées au taux de VDBP circulant, suggérant qu'une fraction de 25(OH)D demeure liée et donc non détectée lorsque la VDBP est élevée [14]. Enfin, des effets de matrice peuvent altérer la fiabilité des immunoessais chez certaines populations de patients. En particulier, l'« environnement urémique » des patients insuffisants rénaux (accumulation de composés urémiques, perturbations du pH, etc.) est susceptible d'interférer avec la réaction immunologique et de modifier la réponse des anticorps, entraînant des biais propres à ces matrices complexes [15]. Ces différentes limitations expliquent que les dosages immunologiques de 25(OH)D peuvent manquer de justesse chez des patients présentant des profils biologiques non standards, comparativement aux méthodes chromatographiques considérées comme références.

Nos résultats chez les patients hémodialysés confirment que la méthode de dosage peut influencer de manière significative l'évaluation du statut en vitamine D. Dans notre étude fusionnée, le dosage immunologique automatisé VITROS® tVitD tend à fournir des concentrations sériques de 25(OH)D différentes de celles mesurées par HPLC-UV, avec à la clé des discordances de classification du statut vitaminique D (insuffisance/déficit) entre les deux techniques. Ce constat est en accord avec de nombreuses données de la littérature. D'une part, plusieurs travaux ont rapporté un biais négatif des immunoessais chez les patients insuffisants rénaux : les valeurs de 25(OH)D obtenues par immunoanalyse sont fréquemment plus faibles que

celles mesurées par LC-MS/MS, particulièrement chez les sujets en stade terminal d'insuffisance rénale [16]. Cavalier et al. ont notamment montré que, même après une re-standardisation des calibrants sur la méthode de référence, un écart systématique persiste pour les sérums de patients hémodialysés comparés aux sujets standards [15]. D'autre part, la comparaison de différentes méthodes sur une même population illustre l'ampleur de ces divergences : dans une étude de concordance, seulement 65 à 83% des patients ont été classés dans la même catégorie de statut vitaminique D selon qu'on utilise l'une ou l'autre des méthodes disponibles, ce qui souligne le risque de divergences cliniquement significatives d'une méthode à l'autre [17][18]. Plus spécifiquement, chez les patients atteints de maladie rénale chronique, Machado et al. ont mis en évidence que la prévalence de l'hypovitaminose D variait fortement selon le type d'immunodosage utilisé, et que le désaccord entre deux méthodes augmentait à mesure que le taux de filtration glomérulaire diminuait [17]. Ainsi, l'impact du profil physiopathologique des patients (ici l'IRC terminale) sur les performances relatives des méthodes de dosage rejoint les observations antérieures et doit être pris en compte dans l'interprétation des résultats [16][17]. Notre étude s'inscrit donc dans le prolongement de ces publications, en soulignant qu'un même échantillon de patient dialysé peut être interprété différemment selon la technique de dosage utilisée, ce qui concorde globalement avec les tendances rapportées dans la littérature récente.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les écarts constatés entre le dosage immunologique VITROS® tVitD et la méthode HPLC-UV chez les patients hémodialysés. Premièrement, la matrice urémique propre aux patients en insuffisance rénale terminale peut altérer les mesures immunologiques. L'accumulation de toxines urémiques (telles que l'urée, le p-cresol, etc.) et les perturbations métaboliques associées à l'urémie sont susceptibles d'interférer avec les anticorps ou les étapes enzymatiques du dosage immunochimique, menant à une sous-estimation des résultats par rapport à la chromatographie [15][16]. Deuxièmement, la modification du métabolisme de la vitamine D en situation d'IRC pourrait contribuer aux discordances. En effet, l'activité réduite de la 24-hydroxylase rénale dans l'IRC entraîne une diminution marquée du taux circulant de 24,25(OH)<sub>2</sub>D, métabolite inactif normalement présent en proportion non négligeable [19]. Or, comme mentionné, les immunoessais totalisent en partie ce métabolite dans le résultat de 25(OH)D. Chez un patient urémique, la baisse de 24,25(OH)<sub>2</sub>D (témoignant d'un « catabolisme vitaminique D stagnant » [19]) conduit à un manque de signal cross-réactif pour l'anticorps, pouvant se traduire par un résultat immunologique plus faible qu'attendu vis-à-vis de la concentration réelle de 25(OH)D (que la HPLC mesure spécifiquement). Troisièmement, des variations de la VDBP et de l'albumine, fréquentes chez les patients chroniques, peuvent moduler la fraction libre de 25(OH)D et l'efficacité de son extraction par les réactifs. Les patients hémodialysés présentent souvent une inflammation chronique et des désordres nutritionnels modérés pouvant abaisser les taux de VDBP et d'albumine. Une VDBP moins abondante pourrait théoriquement augmenter la part de 25(OH)D libre, rendant celle-ci plus accessible aux anticorps – à l'inverse, des niveaux élevés de VDBP (par exemple chez un sujet non urémique) ont été associés à une moindre récupération de 25(OH)D par les immunoessais classiques [14]. Ainsi, l'équilibre différent entre 25(OH)D liée et libre dans l'IRC avancée pourrait créer des conditions de mesure distinctes de celles des sujets sains utilisés pour le calibrage des tests, contribuant aux écarts observés. Enfin, on ne peut exclure l'impact d'éventuelles interférences médicamenteuses ou analytiques propres aux patients dialysés. Ces patients reçoivent fréquemment des analogues actifs de la vitamine D (calcitriol, paricalcitol) ou d'autres traitements (chélateurs de phosphate, fortes doses de vitamine D<sub>3</sub>) susceptibles d'influencer le bilan vitaminique D. Bien que les immunoessais de 25(OH)D soient conçus pour être spécifiques et ne pas réagir aux formes 1,25(OH)<sub>2</sub>D, la polypharmacie et les anticorps hétérophiles présents chez certains patients pourraient, dans de rares cas, perturber le dosage immunologique. L'ensemble de ces facteurs – effet de matrice, altérations métaboliques (24,25(OH)<sub>2</sub>D), variations de la VDBP et interférences potentielles – fournit un cadre explicatif aux divergences méthodologiques constatées entre HPLC et immunoessai chez les sujets hémodialysés.

Du fait de ces divergences analytiques, les implications cliniques sont importantes. D'une part, un risque de mauvaise classification du statut en vitamine D existe selon la méthode utilisée : un patient pourrait être considéré à tort comme carencé par un immunoessai alors que son taux réel (mesuré par HPLC/LC-MS) se situerait en limite supérieure d'insuffisance, et inversement. Machado et al. ont souligné que ce phénomène peut conduire à des prescriptions inappropriées de supplémentation en vitamine D chez les patients IRC, simplement dues à une variabilité inter-méthodes et non à une différence biologique réelle [17]. Il est donc crucial que le clinicien interprète les résultats de 25(OH)D en connaissance de la méthode de dosage utilisée [14]. Chez le patient hémodialysé, en particulier, la prudence est de mise pour ne pas sur-interpréter un résultat légèrement en dessous du seuil souhaité lorsque celui-ci provient d'un immunodosage automatisé. D'autre part, afin d'améliorer la prise en charge, il est recommandé de standardiser autant que possible la méthode de suivi pour un même patient. Si le 25(OH)D d'un patient dialysé est suivi dans le temps, il convient d'utiliser la même technique de dosage à chaque contrôle (ou de calibrer les méthodes entre elles) pour éviter des fluctuations artificielles liées au changement de procédé plutôt qu'à l'état du patient. Idéalement, pour les populations à profil biologique altéré (telles que les dialysés, les femmes enceintes, les patients de réanimation...), le recours à une méthode de référence chromatographique devrait être envisagé lorsque cela est faisable, notamment pour confirmer une carence sévère ou en cas de discordance avec les données cliniques [15]. En pratique courante, si seul le dosage immunologique est disponible, il peut être utile d'adapter les décisions cliniques aux biais connus de ce dosage chez les patients urémiques. Ainsi, certains auteurs suggèrent de viser une concentration de 25(OH)D un peu plus élevée que le seuil minimal recommandé lorsqu'elle est mesurée par immunoessai chez un dialysé, afin de compenser un éventuel sous-dosage méthodologique [16]. À l'inverse, une valeur de 25(OH)D légèrement supranormale obtenue par immunoessai devrait inciter à la prudence avant de conclure à un statut suffisant, compte tenu des possibles interférences positives. Enfin, la communauté scientifique encourage la poursuite des efforts de standardisation des dosages de la vitamine D (programme VDSP, matériaux de référence calibrés sur le NIST, etc.) afin de réduire les écarts entre méthodes [11].

### Conclusion

Chez les patients dialysés, le test immunologique a montré une sous-estimation systématique des concentrations en 25(OH)D par rapport à la méthode chromatographique, confirmant l'impact des effets de matrice urémique et des variations de la VDBP sur la fiabilité des résultats.

La méthode HPLC-UV s'est révélée plus précise et spécifique, permettant une évaluation fiable du statut vitaminique D et une meilleure classification des patients en fonction des seuils cliniques. En revanche, bien que l'immunoessai VITROS® tVitD soit adapté pour l'évaluation du statut vitaminique dans la population générale, son utilisation chez les patients à profil biologique altéré, notamment en hémodialyse, doit être interprétée avec prudence. Ces résultats soulignent l'importance du choix méthodologique dans l'interprétation des taux de 25(OH)D, en particulier dans des populations à risque. Lorsque cela est possible, l'utilisation de méthodes. Une harmonisation accrue des techniques de dosage, ainsi qu'une collaboration étroite entre biologistes et cliniciens, apparaît indispensable pour améliorer la fiabilité des évaluations et adapter au mieux la stratégie de supplémentation en vitamine D.

### Déclaration de conflit d'intérêt : aucun

---

#### Références bibliographiques

1. Pilz S, Zittermann A, Trummer C, et al. Vitamin D testing and treatment: a narrative review of current evidence. *Endocr Connect.* 2021;10(2):R27-R43. doi:10.1530/EC-20-0434.

2. Bikle DD, Schwartz J. Vitamin D binding protein, total and free vitamin D levels in different physiological and pathophysiological conditions. *Front Endocrinol.* 2020;10:317. doi:10.3389/fendo.2019.00317.
3. Jean G, Souberbielle JC, Chazot C. Vitamin D in chronic kidney disease and dialysis patients. *Nutrients.* 2017;9(4):328. doi:10.3390/nu9040328.
4. Marckmann P, Agerskov H, Thinesh Kumar S, et al. Randomized controlled trial of cholecalciferol supplementation in chronic kidney disease patients with hypovitaminosis D. *Nephrol Dial Transplant.* 2022;37(3):447-456. doi:10.1093/ndt/gfab258.
5. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what’s changed and why it matters. *Kidney Int.* 2017;92(1):26-36. doi:10.1016/j.kint.2017.04.006.
6. Carter GD. Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr Drug Targets.* 2021;22(1):15-22. doi:10.2174/1389450121999201202110303.
7. Farrell CJ, Martin S, McWhinney B, et al. State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem.* 2012;58(3):531-542. doi:10.1373/clinchem.2011.172155.
8. Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 automated 25-hydroxyvitamin D assays: mind your 3-epi! *Clin Chem.* 2012;58(6):996-1004. doi:10.1373/clinchem.2011.176545.
9. Dirks NF, Ackermans MT, Lips P, et al. The when, what & how of measuring vitamin D metabolism in clinical medicine. *Nutrients.* 2018;10(4):482. doi:10.3390/nu10040482.
10. KDIGO 2023 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2023;104(1S):S1-S127. doi:10.1016/j.kint.2023.10.018.
11. Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of six routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(5): 799-806. doi:10.1515/CCLM.2011.796.
12. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids.* 2010;75(7): 477-488. doi:10.1016/j.steroids.2010.02.012.
13. Depreter B, Heijboer AC, Delanghe JR, Taes YE. Accuracy of three automated 25-hydroxyvitamin D assays in hemodialysis patients. *Clin Chim Acta.* 2013;415: 255-260. doi:10.1016/j.cca.2012.10.062.
14. Cavalier E, Wallace AM, Knox S, Mistretta VI, Cormier C, Souberbielle JC. Serum Vitamin D measurement may not reflect vitamin D status in patients with altered binding protein concentrations. *Endocr Connect.* 2016;5(2): R39–R46. doi:10.1530/EC-16-0008.
15. Binkley N, Sempos CT; Vitamin D Standardization Program (VDSP). Standardizing vitamin D assays: the way forward. *J Bone Miner Res.* 2014;29(8): 1709-1714. doi:10.1002/jbmr.2252.
16. Janssen MJW, Wielders JPM, Bekker CC, Boesten JJ, Buijs MM, Heijboer AC. Multicenter comparison study of current methods for 25-hydroxyvitamin D measurements in relation to the Vitamin D Standardization Program (VDSP) criteria. *Clin Chim Acta.* 2012;417: 47-53. doi:10.1016/j.cca.2012.01.007.
17. Machado M, Furlanetto TW, Chula DC, Marcadenti A. Variability between methods for 25-hydroxyvitamin D assessment and implications for prevalence of hypovitaminosis D. *Clin Nutr ESPEN.* 2020;38: 120-125. doi:10.1016/j.clnesp.2020.04.013.
18. Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Weber H, Niederau C. Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography–tandem mass spectrometry as a reference. *Ann Clin Biochem.* 2008;45(Pt 2): 153-159. doi:10.1258/acb.2007.007129.
19. Bouillon R, Jones K, Schoenmakers I. Vitamin D-binding protein: a historic overview. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10: 910. doi:10.3389/fendo.2019.00910.