

### Mesure de l'activité du facteur Willebrand

*Laboratory tests of von Willebrand factor activity*

Fanny LASSALLE<sup>1</sup>, Emmanuelle JEANPIERRE<sup>1</sup>

1. Institut d'Hématologie-Transfusion, CHU Lille, France.

Courriel : fanny.lassalle@chru-lille.fr

#### RÉSUMÉ

La maladie de Willebrand (MW) est la maladie hémorragique constitutionnelle la plus fréquente en France. Son diagnostic biologique n'est pourtant pas si aisé. Les différentes techniques de dosage de l'activité du facteur Willebrand (VWF) doivent être suffisamment sensibles pour permettre de distinguer les formes qualitatives des formes quantitatives de la MW. Depuis la découverte de la capacité de la ristocétine à promouvoir l'agrégation entre les plaquettes et le VWF dans les années 70, permettant ainsi le développement de l'activité cofacteur de la ristocétine, les techniques ont beaucoup évolué et se sont standardisées. Cependant, des discordances peuvent subsister entre les techniques. Dans cet article, nous faisons le point sur les différentes techniques existantes pour mesurer l'activité fonctionnelle du VWF (VWF:RCo, VWF:GPIbM, VWF:GPIbR, VWF:Ab), ainsi que leurs principes de mesure. Nous rappellerons aussi les valeurs seuils permettant le diagnostic de la MW et les recommandations établies par les sociétés savantes d'hémostase.

**Mots clés** : maladie de Willebrand, activité du VWF, diagnostic biologique.

#### ABSTRACT

Von Willebrand disease (VWD) is the most common hereditary bleeding disease in France. However, its biological diagnosis is not so simple. The different techniques that measure von Willebrand factor (VWF) activity have to be sensitive enough to discriminate qualitative from quantitative forms of VWD. Since the discovery of the ristocetin property to promote VWF-platelets aggregation in the 70s and the subsequent development of the ristocetin cofactor activity, techniques have been improved and standardized. However, discrepancies may remain between the methods available. In this article, we will focus on the different techniques that can be used to measure VWF activity (VWF:RCo, VWF:GPIbM, VWF:GPIbR, VWF:Ab). We will also recall the thresholds for the diagnosis of VWD and the guidelines established by the hemostasis societies.

**Keywords**: von Willebrand disease, VWF activity, biological diagnosis.

*Rev Francoph Hémost Thromb 2021 ; 3 (2) : 69-74.*

#### INTRODUCTION

La maladie de Willebrand (MW) est la maladie hémorragique constitutionnelle la plus fréquente en France. Elle est causée par un défaut du facteur Willebrand (VWF), protéine multimérique essentielle dans l'hémostase primaire, permettant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes lors d'une brèche vasculaire. Sa prévalence dans la population varie entre 0,1 et 1 % selon les études et les critères utilisés pour

le diagnostic **1**. Les patients atteints de la MW présentent généralement des saignements cutanéomuqueux comme des épistaxis, des ecchymoses, des gingivorragies et des ménométrorragies. Des saignements post-traumatiques ou post-chirurgicaux peuvent aussi survenir, ainsi qu'après un accouchement. D'après les recommandations de l'*International Society for Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) publiées en 2006 **2**, la MW est classifiée en 3 grandes catégories :

le type 1 et le type 3 sont respectivement caractérisés par un déficit quantitatif partiel et complet en VWF, alors que le type 2 est caractérisé par un déficit qualitatif en VWF, lui-même classifié en 4 sous-types selon la nature du déficit qualitatif (2A, 2M, 2B, 2N). La transmission est en majorité autosomale dominante sauf pour le type 3 et le type 2N qui se transmettent de manière récessive.

## DIAGNOSTIC

Le diagnostic de la MW repose sur la combinaison d'une histoire personnelle et/ou familiale d'un phénotype hémorragique et sur des dosages biologiques anormaux de VWF et/ou FVIII **3**. Les tests biologiques de première ligne sont la mesure de l'antigène du VWF (VWF:Ag) et de son activité fonctionnelle (VWF:Act), ainsi que la mesure de l'activité du FVIII (FVIII:C). Historiquement, la technique de référence pour la mesure de l'activité fonctionnelle du VWF est l'activité cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo) par agrégométrie. Elle permet la quantification de la liaison du VWF à la glycoprotéine GPIb $\alpha$  plaquettaire grâce à l'utilisation de ristocétine qui induit le déroulement du VWF et le démasquage de ses sites de liaison **4**. Cependant, due à sa faible sensibilité et sa précision plutôt médiocre, cette technique est de plus en plus remplacée par des techniques automatisées, avec ou sans présence de ristocétine, que nous allons détailler dans cet article. Néanmoins, tout comme le VWF:RCo, il est important de noter que les nouvelles techniques sont influencées par le groupe ABO, ainsi que par l'inflammation, le stress, ou bien encore la grossesse. Le diagnostic complet et la définition du sous-type nécessitent ensuite des tests complémentaires : le test d'agrégation plaquettaire induite par la ristocétine (RIPA), la liaison du VWF au collagène (VWF:CB), l'analyse des multimères du VWF, la liaison du VWF au FVIII (VWF:FVIII:B), le dosage du propeptide (VWF:pp), et l'analyse génétique du gène *VWF*.

## LE COFACTEUR DE LA RISTOCÉTINE DOIT-IL VRAIMENT DISPARAÎTRE DE NOS LABORATOIRES ?

### Un peu d'histoire

En 1971, Howard et Firking montrent que la ristocétine, un antibiotique utilisé avec succès dans les infections à cocci gram positif, était capable d'entraîner une agrégation des plaquettes de patients sains, mais pas chez les patients qui présentaient une MW. Lorsqu'il n'est pas dans des conditions de forces de cisaillement élevées, le VWF ne se lie pas à la GPIb des plaquettes. Mais la ristocétine, se liant au VWF, va lui permettre d'interagir avec les plaquettes. Les premiers tests mesuraient donc la capacité du VWF à

agglutiner aux plaquettes lyophilisées ou fixées, en présence de ristocétine, en utilisant un agrégomètre. Le VWF:RCo est resté relativement inchangé durant 30 ans environ, malgré les limites bien connues telles qu'un coefficient de variation très important et le manque d'harmonisation entre les différents laboratoires réalisant cette analyse (variation en fonction des standards utilisés, du type de plaquettes utilisées (lavées et/ou fixées), du lot de ristocétine, vitesse de centrifugation...). Les programmes d'Évaluation Externe de la Qualité qui se sont multipliés ont mis en lumière ces variations ainsi que la faible limite de quantification. À la fin des années 90, Siemens a développé le BC Von Willebrand *reagent*, et permis une automatisation du VWF:RCo. Cette étape a permis d'améliorer les coefficients de variation intra et inter laboratoires.

### Les nouvelles techniques de mesure de VWF:Act

À partir des années 2000, de nouvelles techniques de mesure de l'activité du VWF dépendante des plaquettes ont commencé à voir le jour (Tableau 1 et Figure 1), afin de s'affranchir des limites du VWF:RCo, et une nouvelle nomenclature, selon les recommandations de l'ISTH, a été publiée afin de distinguer ces techniques aux principes différents **5**. Dans tous les cas, les plaquettes ont été remplacées par des particules de latex ou des particules magnétiques. La technique VWF:GPIbR permet l'agglutination du VWF du patient avec des particules de latex recouvertes de GPIb recombinante (rGPIb, HemosIL VWF:RCo<sup>®</sup>) ou bien avec des particules magnétiques recouvertes d'un anticorps monoclonal lié à la rGPIb (HemosIL Acustar VWF:RCo<sup>®</sup>), en présence de ristocétine. La technique VWF:GPIbM (Siemens Innovance<sup>®</sup> VWF Ac) n'utilise pas de ristocétine et permet l'agglutination du VWF avec des particules de polystyrène recouvertes d'un anticorps anti-GPIb grâce à l'utilisation d'une rGPIb avec 2 variants gain de fonction (G233V et M239V) permettant la liaison au domaine A1 du VWF. Moins fréquente, la technique VWF:Ab repose sur l'agglutination du VWF avec des particules de latex recouvertes d'un anticorps monoclonal qui se lie au domaine A1 du VWF. Elle n'utilise pas non plus de ristocétine. La technique VWF:Ab (HemosIL VWF *activity*) n'est pas un test fonctionnel, mais une évaluation des sites de liaison du VWF à la GPIb. Elle n'évalue pas la capacité du VWF à se lier aux plaquettes ou à la GPIb. Du fait de la limite de détection relativement élevée du VWF:RCo, le ratio VWF:RCo/VWF:Ag n'est pas toujours interprétable pour les patients présentant des taux de VWF:Ag faibles, et ne permet donc pas la discrimination entre un type 1 et un type 2. Dans toutes les études ayant comparé différentes techniques au VWF:RCo, les corrélations étaient toujours cor-

**Mesure de l'activité du facteur Willebrand**  
*Laboratory tests of von Willebrand factor activity*

Tableau 1 : Description des différentes techniques de mesure de l'activité du VWF selon la nomenclature ISTH.  
 Table 1: Description of the different techniques measuring VWF activity according to the ISTH nomenclature.

Nomenclature ISTH	Description	Technique / Réactifs
<b>VWF:RCo</b> Activité cofacteur de la ristocétine : utilise plaquettes et ristocétine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agrégation ou agglutination du VWF du patient avec plaquettes (lavées ou lyophilisées) en présence de ristocétine</li> <li>• Détection par agrégomètre ou visuelle</li> </ul>	VWF:RCo par agrégométrie ou visuelle Tests de 1 <sup>er</sup> et 2 <sup>e</sup> génération
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agglutination VWF/plaquettes lyophilisées en présence de ristocétine sur automate Siemens, Sysmex ou Stago</li> </ul>	VWF:RCo automatisée avec Siemens BC Von Willebrand <i>reagent</i> Tests de 3 <sup>e</sup> et 4 <sup>e</sup> génération STA-VWF:RCo
<b>VWF:GPIbR</b> Test basé sur la liaison du VWF à la GPIb $\alpha$ recombinante en présence de ristocétine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agglutination du VWF du patient avec particules de latex recouvertes d'un anticorps monoclonal lié à la rGPIb en présence de ristocétine</li> <li>• Détection par turbidimétrie</li> </ul>	HemosIL VWF:RCo
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agglutination du VWF avec des particules magnétiques recouvertes d'un anticorps monoclonal lié à la rGPIb et en présence de ristocétine</li> <li>• Détection par chimiluminescence</li> </ul>	HemosIL AcuStar VWF:RCo
<b>VWF:Ab</b> Liaison d'un Ac monoclonal (mAb) à un épitope du domaine A1 du VWF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agglutination du VWF du patient avec des particules de latex recouvertes d'un anticorps monoclonal dont l'épitope est localisé au niveau du site de liaison du VWF à la GPIb<math>\alpha</math> (domaine A1 du VWF)</li> <li>• Sans ristocétine</li> <li>• Détection par turbidimétrie</li> </ul>	HemosIL VWF <i>activity</i>
<b>VWF:GPIbM</b> Liaison spontanée du VWF à la rGPIb mutée gain de fonction	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agglutination du VWF avec des particules de polystyrène recouvertes d'un anticorps anti-GPIb</li> <li>• Ajout de <b>rGPIb avec 2 variants gain de fonction</b> permettant la liaison</li> <li>• Sans ristocétine</li> <li>• Détection par turbidimétrie</li> </ul>	Siemens Innovance® VWF Ac

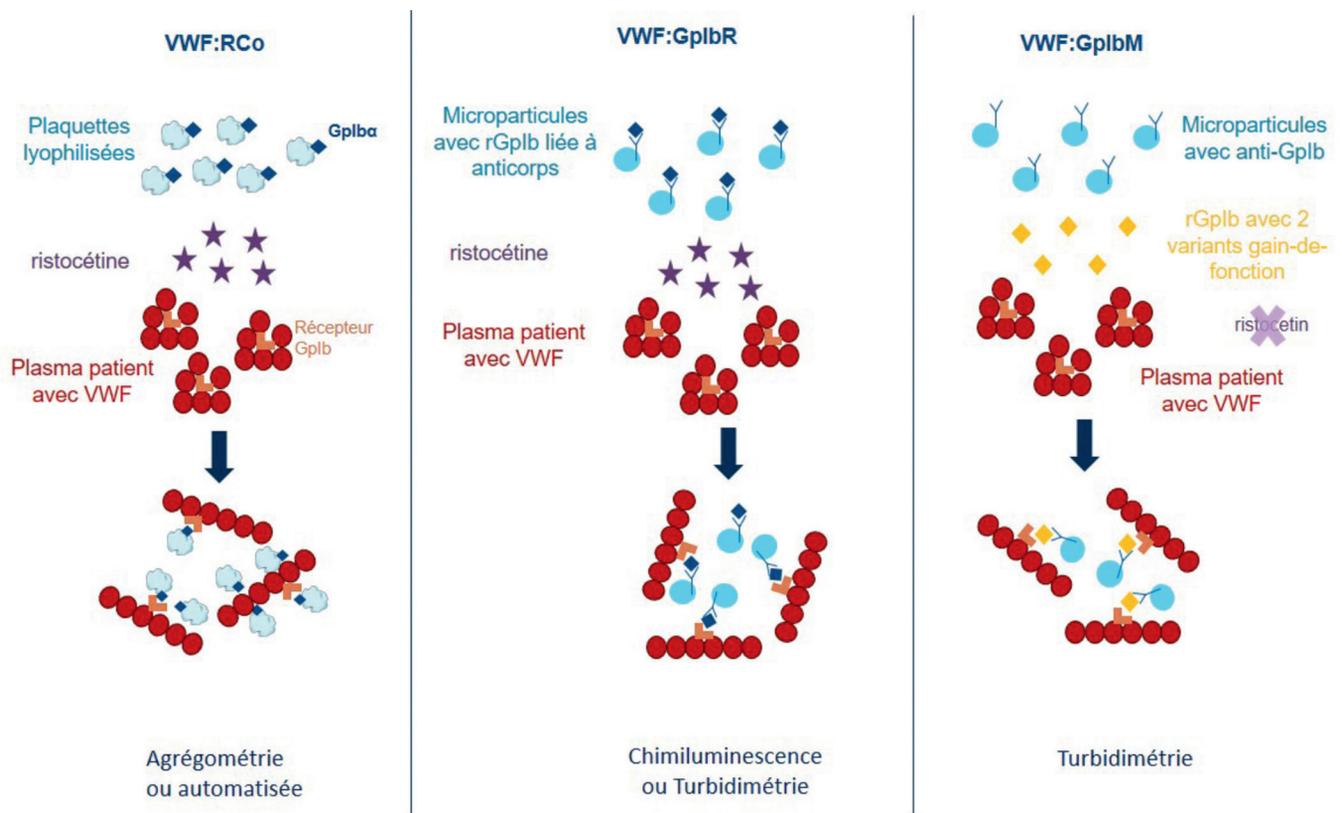


Figure 1 : Représentation schématique du principe des techniques de mesure de l'activité du VWF.  
 Figure 1: Schematic representation of the principle of VWF activity measurement techniques.

rectes avec néanmoins des difficultés dans les valeurs basses du fait de la faible limite de détection du VWF:RCo. Boender *et al.* ont évalué les 4 méthodes (VWF:RCo, VWF:Ab, VWF:GPIbR et VWF:GPIbM) dans une étude portant sur 661 patients parfaitement typés **6**. Bien que les 4 méthodes soient bien corrélées, les 3 nouvelles techniques ont toutes montré une supériorité tant au niveau de la sensibilité que de l'adéquation avec le type de maladie. Dans une population de MW parfaitement sous-typée (génotypage et profil multimérique réalisés), Vangenechten *et al.* ont évalué les sensibilité et spécificité de différentes techniques, pour un ratio VWF:Act/VWF:Ag < 0,7 **7**. Pour le VWF:GPIbM, la sensibilité est de 92 % et la spécificité de 85,1 %. Pour le VWF:GPIbR en immuno-turbidimétrie, la sensibilité est de 84 % et la spécificité de 89,7 %. Comparativement, un VWF:RCo/VWF:Ag < 0,7 a une sensibilité à 92 % mais une spécificité à 72,4 %.

La meilleure stabilité des réactifs, l'automatisation complète, l'adaptation possible des méthodes sur les différents automates (en dehors du VWF:GPIbR sur Acustar), ainsi que la bonne sensibilité de ces techniques contribuent au remplacement du VWF:RCo dans de nombreux laboratoires. La **figure 2** présente un état des lieux (en janvier 2021) dans les laboratoires de 39 Centres de Ressources et de Compétences - Maladies Hémorragiques Constitutionnelles (CRC-MHC) français. Sur ce panel, les VWF:GPIbR et VWF:GPIbM sont utilisées dans 72 % des laboratoires des CRC-MHC. Autre preuve que les nouvelles activités prennent le pas sur le VWF:RCo, il a été proposé que la valeur de VWF:RCo (0,87 UI par ampoule) dans le 6<sup>e</sup> Standard International de l'OMS FVIII/VWF, plasma (07/316) devrait être attribuée initialement comme « unités » pour les méthodes

VWF:GPIbM et VWF:GPIbR, et que le 6<sup>e</sup> Standard International de l'OMS (07/316) devrait servir de réactif de référence international pour les méthodes VWF:GPIbM et VWF:GPIbR avec des valeurs attribuées de 0,87 unité par ampoule, en attendant un réel titrage en VWF:GPIbR et VWF:GPIbM pour le prochain Standard International. À noter que l'activité VWF:Ab n'est pas concernée.

### Discordances entre les techniques

Des discordances intéressantes sont apparues, en lien avec le génotype des patients ou bien avec le principe de la méthode. Des polymorphismes situés dans l'exon 28 du gène du VWF qui code pour le domaine A1 (liaison du VWF à la GPIb) peuvent altérer la liaison du VWF à la ristocétine et conduire à une diminution artéfactuelle du taux de VWF:RCo. La variation de séquence D1472H, très fréquente chez les Afro-Américains, est située dans le domaine A1 et est associée à un ratio VWF:RCo/VWF:Ag significativement plus abaissé que dans une population contrôle, sans impact clinique, car il n'y a aucun effet sur la liaison du VWF à la GPIb des plaquettes **8**. La variation de séquence P1467S du domaine A1 entraîne également une diminution du ratio **9**. En cas de discordance entre un VWF:Ag normal et une activité VWF:RCo diminuée, et donc un ratio < 0,7, il est souhaitable de recourir à une méthode de dosage alternative basée sur une activité Willebrand n'utilisant pas de ristocétine, en particulier la technique VWF:GPIbM. À noter que, bien qu'elle soit réalisée en présence de ristocétine, la technique VWF:GPIbR en chimiluminescence sur Acustar est également insensible au variant D1472H du fait de sa faible concentration.

À l'inverse, certaines techniques peuvent être « insensibles » au défaut entraîné par certains variants génétiques et donner des résultats de VWF:Act faussement normaux **7**, pouvant ainsi conduire à de possibles erreurs diagnostiques. Des interférences indépendantes du génotype peuvent aussi survenir lors du dosage de VWF:Act. Dans son étude comparative, Boender *et al.* ont mis en évidence une activité entre 5 et 10 % mesurée avec VWF:GPIbM chez des patients atteints de MW de type 3 avec un VWF:Ag et VWFpp < 5 %, alors qu'elle est indétectable avec VWF:GPIbR Acustar **6**. La présence d'anticorps hétérophiles, interférant avec les réactifs, pourrait expliquer cette valeur anormalement élevée. Lorsqu'un résultat d'activité paraît discordant avec les antécédents, les antécédents ou le phénotype hémorragique, il est souhaitable de le vérifier par une autre technique.

### Répartition des activités dans les CRC-MHC (n = 39)

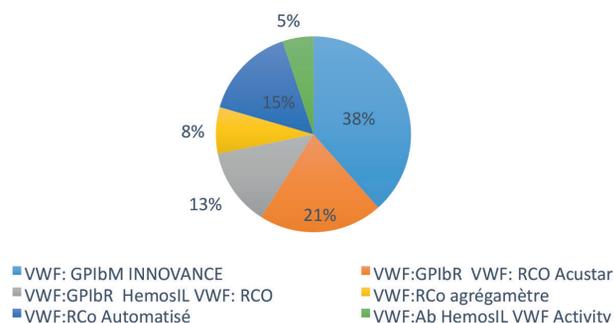


Figure 2 : Répartition des techniques utilisées pour mesurer VWF:Act dans les CRC-MHC au niveau national (janvier 2021).

Figure 2: Distribution of techniques used to measure VWF:Act in hospital departments treating constitutional bleeding disorders at the national level (January 2021).

### Recommandations des sociétés savantes

En début d'année 2021, l'ISTH, l'ASH (American Society of Hematology), la NFH (National Hemophilia Foundation) et la WFH

(World Federation of Hemophilia) ont publié des recommandations sur le diagnostic de la MW **10**. Il est ainsi recommandé de préférer la mesure de VWF:Act réalisée à l'aide des nouvelles techniques de mesures de la liaison du VWF aux plaquettes (VWF:GPIbM, VWF:GPIbR) au VWF:RCo, automatisé ou non. Là encore, il n'est pas fait mention de l'activité VWF:Ab.

### **Suivi des traitements substitutifs par concentré de Willebrand plasmatique (pdVWF) ou de Willebrand recombinant (rVWF)**

Les différentes activités, dépendantes de la GPIb, ne présentent pas la même sensibilité à la perte des multimères de haut poids moléculaire (MHPM) **11**. Différentes études ont montré que les techniques n'étaient pas équivalentes pour suivre les différents produits substitutifs. La présence d'une quantité plus ou moins importante de MHPM dans le concentré peut être responsable de discordance entre les différentes activités. En effet, le test VWF:GPIbM est plus sensible à la présence des MHPM que le test VWF:GPIbR. Aussi, chez les patients recevant du Veyvondi®, les taux seront plus élevés en VWF:GPIbM qu'en VWF:GPIbR, alors qu'en cas de traitement par Wilfactin®, les taux de VWF:GPIbM seront plus bas qu'avec le VWF:GPIbR, du fait de l'absence de MHPM dans le concentré plasmatique.

### **QUELLES VALEURS SEUILS POUR LE DIAGNOSTIC DE MALADIE DE WILLEBRAND ?**

Selon le Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) publié début 2021, toute anomalie des tests de première ligne (VWF:Act et/ou VWF:Ag < 50 % (ou UI/dL), VWF:Act/VWF:Ag < 0,7 ou FVIII:C/VWF:Ag < 0,7) peut faire évoquer une MW, et le patient doit être orienté vers une consultation avec un médecin du CRC-MHC afin de confirmer la MW et de la typer précisément **12**. Selon les recommandations de l'ISTH, pour le diagnostic de la MW de type 1, le seuil de VWF:Ag et/ou VWF:Act est à 30 % indépendamment du phénotype hémorragique, et à 50 % pour les patients présentant un phénotype hémorragique anormal. Pour le diagnostic de la MW

de type 2, il est recommandé un seuil VWF:Act/VWF:Ag à 0,7. Pour les patients présentant un ratio < 0,7 mais avec des valeurs de VWF:Ag et VWF:Act normales, il est recommandé de compléter l'analyse par une étude des multimères et de la liaison VWF:CB pour assurer le diagnostic **10**.

Le Centre de Référence de la Maladie de Willebrand (CRMW) recense tous les patients atteints de MW, tous types confondus, au niveau national. L'inclusion au CRMW permet ensuite la réalisation des analyses spécialisées permettant de définir le sous-type de MW dont sont atteints les patients. Les critères d'inclusion au CRMW sont un VWF:Ag < 40 % et/ou un ratio VWF:Act/VWF:Ag < 0,7. La technique de mesure de l'activité utilisée par le CRMW est la technique VWF:GPIbM. Si une demande d'inclusion comporte un ratio VWF:Act/VWF:Ag < 0,7 avec un VWF:Ag > 40 % et que la technique utilisée par le centre demandeur est autre que VWF:GPIbM, cette dernière est réalisée au CRMW pour vérifier l'activité du VWF. Si le ratio reste < 0,7, alors le patient est inclus au CRMW. En revanche, si le ratio passe au-dessus du seuil de 0,7, le patient n'est pas inclus.

### **CONCLUSION**

Il est important de noter qu'aucun des tests d'activité n'évalue la fonction physiologique du VWF, c'est-à-dire sa capacité à interagir avec les plaquettes en présence de forces de cisaillement élevées. Longtemps considéré comme la référence, le VWF:RCo a été supplanté par les nouvelles techniques en matière de sensibilité, variabilité et d'exactitude diagnostique. Les dernières recommandations des sociétés savantes incitent à préférer le VWF:GPIbM et VWF:GPIbR au VWF:RCo pour le diagnostic. Malgré cela, des discordances peuvent subsister entre les techniques, révélant toute la complexité de la mesure de l'activité fonctionnelle du VWF. Chaque technique présente des caractéristiques que le biologiste doit connaître afin de garder un regard critique sur les résultats. ■

## POINTS CLÉS À RETENIR

- La mesure de l'activité fonctionnelle du VWF est essentielle au diagnostic de la maladie de Willebrand.
- La technique de référence VWF:RCo a été remplacée au fil du temps par de nouvelles techniques standardisées présentant de meilleures performances analytiques.
- Les principes des différentes techniques de dosages peuvent être à l'origine de discordances de résultats.
- Le biologiste doit connaître les limites de la technique utilisée dans son laboratoire pour une bonne interprétation de ses résultats.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Bowman M, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D, James P. The prevalence of symptomatic von Willebrand disease in primary care practice. *J Thromb Haemost* 2010 ; 8 : 213-6.
2. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, Favaloro EJ, Hill FGH, Holmberg L, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 2103-14.
3. Leebeek FWG, Eikenboom JCJ. Von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* 2016 ; 375 : 2067-80.
4. Olson JD, Brockway WJ, Fass DN, Magnuson MA, Bowie EJ. Evaluation of ristocetin-Willebrand factor assay and ristocetin-induced platelet aggregation. *Am J Clin Pathol* 1975 ; 63 : 210-8.
5. Bodó I, Eikenboom J, Montgomery R, Patzke J, Schneppenheim R, Di Paola J, et al. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015 ; 13 : 1345-50.
6. Boender J, Eikenboom J, van der Bom JG, Meijer K, de Meris J, Fijnvandraat K, et al. Clinically relevant differences between assays for von Willebrand factor activity. *J Thromb Haemost* 2018 ; 16 : 2413-24.
7. Vangenechten I, Mayger K, Smejkal P, Zapletal O, Michiels JJ, Moore GW, et al. A comparative analysis of different automated von Willebrand factor glycoprotein Ib-binding activity assays in well typed von Willebrand disease patients. *J Thromb Haemost* 2018 ; 16 : 1268-77.
8. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, Christopherson PA, Friedman KD, Haberichter SL, et al. Common VWF exon 28 polymorphisms in African Americans affecting the VWF activity assay by ristocetin cofactor. *Blood* 2010 ; 116 : 280-6.
9. Flood VH, Friedman KD, Gill JC, Morateck PA, Wren JS, Scott JP, et al. Limitations of the ristocetin cofactor assay in measurement of von Willebrand factor function. *J Thromb Haemost* 2009 ; 7 : 1832-9.
10. James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N, et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv* 2021 ; 5 : 280-300.
11. Favaloro EJ, Bonar R, Hollestelle MJ, Jennings I, Mohammed S, Meijer P, et al. Differential sensitivity of von Willebrand factor activity assays to reduced VWF molecular weight forms: A large international cross-laboratory study. *Thromb Res* 2018 ; 166 : 96-105.
12. Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) Maladie de Willebrand. Centre de Référence de la Maladie de Willebrand. [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-02/maladie\\_de\\_willebrand\\_-\\_pnds.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-02/maladie_de_willebrand_-_pnds.pdf)