

Etude monocentrique de la maladie de Willebrand en Tunisie : Acquis et difficultés diagnostiques

Monocentric study of Willebrand's disease in Tunisia: assets and difficulties

Fatma Ben Lakhal¹, Wijdene El Borgi¹, Emna Gouider², Balkis Meddeb², Naouel Ben Salah¹, Raouf Hafsia¹.

1 : Service d'hématologie Biologique Hôpital Aziza Othmana

2 : Service d'hématologie clinique. Hôpital Aziza Othmana

Faculté de médecine de Tunis

RÉSUMÉ

Prérequis: La maladie de Willebrand (VWD) est la pathologie hémorragique constitutionnelle la plus fréquente. Elle est caractérisée par une très grande hétérogénéité clinique, biologique et moléculaire. Dans certains types de la maladie, la caractérisation précise de l'anomalie peut être difficile.

But : Nous rapportons les caractéristiques clinico-biologiques de la VWD et analysons les difficultés diagnostiques.

Méthodes : 33 cas de VWD sont diagnostiqués entre février et mai 2011. Un bilan d'hémostase standard avec une étude du complexe Willebrand (FVIII:C, VWF : Ag et VWF : RCo), un groupage sanguin et une NFS sont réalisés dans tous les cas.

Résultats : L'âge moyen au diagnostic est de 13 ans [10 mois- 43 ans]. Le sex ratio M/F est de 0,5. Les patients sont classés type 3 dans 52% des cas, type 2 dans 30% des cas et type 1 dans 18% des cas. Le diagnostic du type 2B est suspecté devant l'association d'un rapport VWF:RCo / VWF: Ag < 0,7 à une thrombopénie dans 1 cas.

Conclusion : Nous disposons des tests minimums requis pour le diagnostic positif et l'identification des principaux types. Des techniques plus spécialisées permettront d'affiner le diagnostic des variants type 2 pour une meilleure orientation thérapeutique.

Mots-clés

Maladie de von Willebrand, facteur de von Willebrand, diagnostic biologique, difficultés.

SUMMARY

Background: Von Willebrand's disease (VWD) is the most commonly inherited bleeding disorder. It is characterized by clinical, biological and molecular heterogeneity. In certain types of the disease, diagnosis can be difficult.

Aim : We report the clinico-biological characteristics of VWD's patients and analyze diagnosis difficulties.

Methods : 33 cases were diagnosed in the laboratory from February to May, 2011. Screening hemostasis included the measuring of FVIII: C, VWF: Ag and VWF: RCo. Blood cell count and blood group were performed in all cases.

Results : Mean age at diagnosis is 13 years [10 months -43 years]. The sex ratio M/F is 0.5. The patients are classified type 3 VWD in 52% of the cases, type 2 VWD in 30 % of the cases and type 1 VWD in 18 % of the cases. The diagnosis of type 2B VWD suspected in combination of the ratio VWF:RCo / VWF: Ag <0,7 and thrombocytopenia in one case. Required tests for positive diagnosis and distinction between the primary categories of VWD are available. Specialized tests will allow a best characterization variants type 2 VWD for a better therapeutic approach.

Key - words

Von Willebrand disease, Von Willebrand factor, Biological diagnosis, Difficulties.

La maladie de Willebrand (VWD) est la plus fréquente des maladies hémorragiques constitutionnelles. Elle est liée à une anomalie qualitative ou quantitative du facteur Willebrand (VWF). Elle est caractérisée par une grande hétérogénéité clinique et biologique. Il existe 3 principaux types qui correspondent à des mécanismes physiopathologiques différents, entraînant des caractéristiques clinico-biologiques distinctes et des difficultés diagnostiques [1]. L'objectif de notre travail est de rapporter les caractéristiques clinico-biologiques de patients atteints de VWD et d'analyser les difficultés diagnostiques.

METHODES

• Patients : Il s'agit d'une étude de cas consécutifs ayant concerné 33 cas de VWD diagnostiqués au laboratoire d'hématologie de l'hôpital Aziza Othmana entre février et mai 2011. Les données cliniques relevées sont principalement: l'âge, la consanguinité, les antécédents familiaux, les circonstances de découverte et les manifestations hémorragiques.

• Conditions préanalytiques : Les conditions préanalytiques en hémostase respectent les recommandations de l'International Society Thrombosis Hemostasis. Le prélèvement est fait sur citrate de sodium 0,109 M (9 vol de sang:1 vol d'anticoagulant) et acheminé au laboratoire dans les plus brefs délais. Le plasma pauvre en plaquettes est obtenu après une double centrifugation de 3000 tours par minute pendant 15 minutes chacune, et distribué dans des micro-tubes en plastique puis congelés à -20°C . La décongélation est faite au bain-marie à 37°C pendant 10 à 15 minutes.

• Bilan d'hémostase : Le bilan d'hémostase initial comprend: un temps de Quick (TQ), un temps de céphaline avec activateur (TCA) et un dosage du fibrinogène réalisés par technique coagulométrique sur l'automate STA Compact (STAGO®). L'épreuve de mélange (plasma du témoin avec plasma du malade à volume égal) est réalisée devant tout allongement du TCA. Une numération formule sanguine (NFS) avec numération plaquettaire est faite pour chaque patient sur BECKMAN® : LH 750 ANALYZER.

• L'étude du complexe Willebrand : Elle comprend:

- Un dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine du VWF (VWF:RCo): effectué par une méthode manuelle semi-quantitative par technique d'agglutination sur une plaque en verre.

- Un dosage de l'antigène du VWF plasmatique (VWF: Ag): réalisé par technique ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay) sur mini - VIDAS®.

- Un dosage du FVIII coagulant (FVIII:C) par technique coagulométrique sur STA Compact STAGO®.

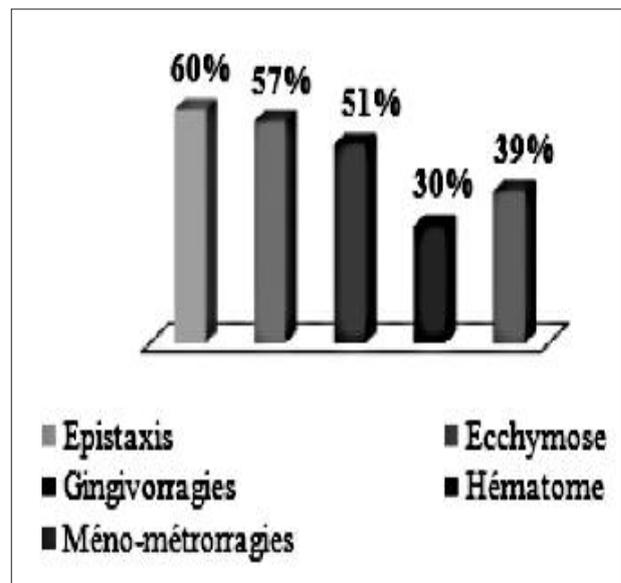
L'interprétation des résultats a tenu compte du contexte clinique et des groupes sanguins ABO. Le ratio $\text{VWF} : \text{RCo} / \text{VWF} : \text{Ag}$ est calculé pour distinguer le type 1 (ratio $> 0,7$) du type 2. Le type 1 est retenu devant des taux de $\text{VWF} : \text{Ag}$ et $\text{VWF} : \text{RCo}$ inférieurs à 60% pour les patients de GS non O et des taux de $\text{VWF} : \text{Ag}$ et $\text{VWF} : \text{RCo}$ inférieurs à 40% pour les patients de GS O. Le type 2B est suspecté devant un ratio $< 0,7$ et une thrombopénie associée. Le type 3 est défini par un $\text{VWF} : \text{Ag}$ et une $\text{VWF} : \text{RCo} \leq 5\%$. Le diagnostic est confirmé devant au moins deux déterminations réalisées sur deux prélèvements différents associées à un contexte clinique évocateur (bleeding score positif).

RESULTATS

Caractéristiques épidémiologiques et cliniques:

L'âge moyen au diagnostic est de 13 ans [10 mois- 43 ans]. Le sex ratio M/F est de 0,5. Une consanguinité parentale est notée dans 38% des cas. Un antécédent familial hémorragique est retrouvé dans 55% des cas. Les principales circonstances de découverte sont les épistaxis (30% des cas), les méno-métrorragies (27% des cas), les ecchymoses (18% des cas), les gingivorragies (21% des cas) et les hémorragies digestives (12 % des cas). Une découverte fortuite lors d'un bilan systématique est faite dans 12 % des cas. Les manifestations hémorragiques sont essentiellement de type cutanéomuqueuses. Elles sont résumées dans la figure N°1.

Figure 1: Répartition des manifestations hémorragiques



Bilan biologique :

Une anémie hypochrome microcytaire et une thrombopénie sont retrouvées respectivement dans 45% et 3 % des cas. Le groupe sanguin O est retrouvé dans 4 cas de type 1 et type 3 de VWD respectivement et dans 3 cas de type 2 de VWD.

Bilan d'hémostase :

Le bilan d'hémostase initial révèle un TCA allongé isolé et corrigé à l'épreuve du mélange dans 69,69% des cas. L'étude du complexe Willebrand note une activité VWF: RCo abaissée dans tous les cas avec une moyenne de 15,77% [0% - 55%]. Le taux de $\text{VWF} : \text{Ag}$ est abaissé dans 81,81% des cas [0% - 120%]. Le taux de FVIII: C est abaissé dans 81,81% des cas [0%-81%]. La classification de nos patients est représentée dans la figure N°2.

Le bilan biologique des patients en fonction du type de la VWD est résumé dans le tableau N°1.

Figure 2 : Classification des patients

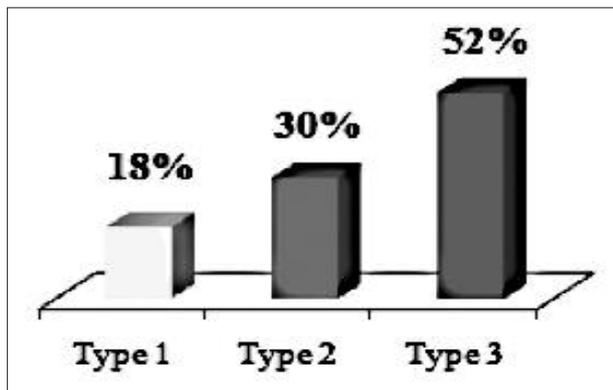


Tableau 1: bilan biologique en fonction du type de la VWD

Tests	Type 1 (n=6)	Type 2 (n=10)	Type 3 (n=17)
	Moyenne [extrêmes]	Moyenne [extrêmes]	Moyenne [extrêmes]
Hémoglobine (g dl-1)	10,6 [5,1 - 13,8]	12 [7,4 - 16,6]	10,3 [2,1 - 13,6]
Plaquettes (10 ³ /mm ³)	242,6 [148 - 321]	221 [56 - 367]	278,647 [156 - 389]
TCA (s)	35,5 [31- 41]	37,2 [30,1- 56]	58,6 [38 - 74]
TQ (s)	13 [12 - 13,7]	13,1 [12 - 15,4]	13,1 [12 - 14,5]
FVIII:C(% activité)	47 [30 - 60]	56 [30 - 81]	3 [0 - 20]
VWF :Ag (% activité)	39,7 [15,7 - 57]	74 [46,1 - 120]	1,4 [0 - 5]
VWF :RCo (%activité)	39,5 [12 - 55]	27 [12 - 50]	0,68 [0 - 5]
VWF : RCo / vWF : Ag	0,97 [0,76 - 1,37]	0,36 [0,2 - 0,6]	-
Fibrinogène (g L-1)	3,6 [2 - 4,2]	3,1 [2 - 5,2]	3,3 [1,6 - 4,8]

DISCUSSION

La VWD est la plus fréquente des maladies hémorragiques constitutionnelles. Sa prévalence est estimée entre 0,6 et 3 % de la population générale selon les séries rapportées [2]. Sa prévalence en Tunisie n'est pas encore connue vu l'absence d'un registre national. L'âge moyen au diagnostic est de 13 ans [10 mois- 43 ans] dans notre série. Cependant, il était plus tardif dans une série mexicaine [3] avec une moyenne de 18,5 ans [3-63 ans]. Cette différence pourrait être liée à des critères différents de choix de la population étudiée.

La VWD touche les deux sexes avec un sex ratio (M /F) de l'ordre de 0,8 à 1[4]. Dans notre étude, il est de 0,5. Ce résultat est comparable à celui d'A. Majluf-Cruz et al [3] qui notent un sex ratio à 0,55. Cette prédominance féminine pourrait être liée à un biais de sélection de nos patients. Notre institution est en effet, un centre hospitalier de 2ème ligne englobant un service de gynéco-obstétrique et un service

d'hématologie.

Le tableau clinico-biologique est hétérogène. Dans la population générale, la dispersion des taux de VWF est très grande, de nombreux facteurs environnementaux ou génétiques pouvant modifier l'expression du gène impliqué. Le groupe sanguin ABO est l'un des déterminants génétiques majeurs du taux de VWF. Ainsi, les sujets de GS O ont des taux de VWF: Ag, VWF : RCo et FVIII:C significativement plus bas de 25 à 35% que ceux des personnes d'autres groupes [1,5]. Dans notre série, l'interprétation des résultats a tenu compte des groupes sanguins ABO et du contexte clinique du patient. Les taux de VWF des patients avec un déficit très modéré peuvent chevaucher ceux d'une population normale. Le diagnostic du type 1 est retenu devant une forte suspicion clinique de VWD associée à des taux de VWF : Ag et VWF : RCo inférieurs à 60% pour les patients de GS non O et des taux de VWF : Ag et VWF : RCo inférieurs à 40% pour les patients de GS O. En effet, le seuil en dessous duquel le diagnostic de VWD est certain est extrêmement discuté, en particulier pour les déficits quantitatifs partiels [6]. Le consensus britannique [7] retient que le diagnostic de VWD de type 1 est possible pour des taux de VWF : Ag et VWF : RCo inférieurs à 50 UI/dl à deux reprises (sans considération d'âge ou de groupe ABO). Le consensus américain [8] recommande un seuil de 30 UI/dl au-dessous duquel le diagnostic de VWD de type 1 est certain. Le contexte clinique évocateur a aussi suscité beaucoup de réflexions de la part des experts. Depuis quelques années, des outils permettant de quantifier de façon objective le syndrome hémorragique ont été développés tel le score hémorragique élaboré par Tosseto et al [9].

Les manifestations hémorragiques de la VWD varient au sein d'une même famille et dans le temps chez un même sujet. La tendance hémorragique s'atténue souvent avec l'âge [10, 11, 12]. La VWD est découverte dans notre série à l'occasion essentiellement d'un syndrome hémorragique cutanéomuqueux (96% des cas) et lors d'un bilan systématique (12% des cas). Les hémorragies cutanéomuqueuses sont les manifestations cliniques les plus rapportées chez nos patients comme c'est décrit dans la littérature [13]. Les ménorragies sont notées chez 39 % de nos patientes versus 3 à 36% dans la littérature [14]. Les hématomes sont moins décrits [15]. Cependant, dans notre série et dans la série mexicaine [3] ils sont retrouvés chez 30% et 71,7% des patients respectivement. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la forme sévère de la maladie est fréquente dans notre série.

L'exploration biologique de la VWD permet le diagnostic positif et l'identification du type quantitatif ou qualitatif [10, 16]. Le bilan de départ comprend au minimum une NFS, un TQ, un TCA et un dosage du fibrinogène. Cette évaluation initiale ne permet en aucun cas d'affirmer ou d'exclure le diagnostic de la VWD. Le TCA varie en fonction du type de la maladie, il peut être normal notamment en cas de syndrome inflammatoire associé [6]. Dans notre série, le TCA est normal dans 30,31% des cas. Certains réalisent aussi un temps de saignement (TS) ou une mesure du temps d'occlusion plaquettaire (TOP) sur l'automate PFA100, tests qui permettent une exploration globale de l'hémostase primaire [6]. Dans la VWD, la sensibilité du TS est de 50 à 60% alors que celle du TOP est de 90% [6]. Ces deux derniers tests ne sont pas réalisés dans notre laboratoire. En effet, le TS manque de sensibilité et de spécificité pour le diagnostic de la VWD.

Le développement du TOP serait intéressant surtout dans l'urgence. La confirmation du diagnostic nécessite le recours au dosage spécifique du complexe FVIII-VWF :

- Le dosage de VWF: RCo est primordial, permet le diagnostic de VWD. C'est un test fonctionnel qui mesure la capacité du VWF à se lier aux plaquettes en présence de ristocétine soit en technique agrégométrique ou par le test d'agglutination macroscopique semi-quantitatif sur lame particulièrement utile en urgence. Un taux bas conforte le diagnostic, mais le test d'agglutination macroscopique présente quelques inconvénients : faible sensibilité et mauvaise reproductibilité [17]. Le test d'agrégation plaquettaire induite par la ristocétine (RIPA) du plasma riche en plaquettes peut être normal au cours de la VWD [6]. Il a pour but de déceler un variant particulier caractérisé par une hyperaffinité du VWF pour la glycoprotéine plaquettaire Ib (GPIb). Il est recommandé par certaines équipes comme test de premier niveau afin de ne pas méconnaître les cas où les taux de VWF et de FVIII: C sont normaux [6]. Le test d'agglutination macroscopique sur lame s'avère plus sensible et plus fiable que ce dernier [17]. Par ailleurs, une automatisation des mesures de VWF: RCo est désormais, possible sur quelques automates récents [11, 18,19].

- Le dosage VWF : Ag : est primordial pour le diagnostic de VWD en particulier dans les formes modérées et frustes. La technique de référence étant celle réalisée par ELISA [17]. Elle est, certes, sensible et spécifique, mais reste de réalisation longue, non automatisée et non adaptée aux dosages unitaires, ce qui limite son utilisation aux cas urgents [17]. Ces inconvénients sont palliés par l'installation de la technique ELFA, rapide et automatisée (Vidas®VWF) [20] ; technique adoptée dans notre étude.

- Le dosage du FVIII: C qui évalue indirectement la capacité du VWF à transporter et à maintenir le FVIII dans la circulation [6]. Un taux de FVIII: C normal est fréquent dans la VWD et ne permet pas d'exclure le diagnostic [21]. Cependant dans notre série, le taux de FVIII: C est souvent abaissé (81,81% des cas) vu la fréquence des formes sévères.

L'interprétation des résultats nécessite la connaissance du contexte clinique (syndrome inflammatoire, grossesse,..). L'infirmité ou l'affirmation du diagnostic repose sur au moins deux déterminations réalisées à deux occasions. L'analyse des rapports VWF : RCo / VWF: Ag et FVIII:C/VWF : Ag doit être réalisée systématiquement puisqu'elle permet de s'orienter vers le type de déficit. La pertinence de ces ratios est limitée par le taux de VWF : Ag qui, s'il est inférieur à 15 UI/dl, peut mettre leur valeur informative en défaut [6]. Un rapport VWF : RCo / VWF : Ag abaissé (le seuil discriminatif de 0,6 ou 0,7 reste discuté [6]) est en faveur d'une anomalie qualitative d'interaction du VWF avec les plaquettes ; un rapport FVIII:C/VWF : Ag abaissé (inférieur à 0,6) peut être en relation avec une anomalie d'interaction du VWF avec le FVIII ou avec une hémophilie modérée ou mineure. La VWF : RCo peut ne pas détecter des anomalies de liaison du VWF au collagène et elle est moins sensible que la mesure de la capacité de liaison du VWF au collagène (VWF : CB) [6]. La mesure de VWF : CB est assurée par un test ELISA qui souffre encore d'un manque de standardisation [21]. Le VWF : CB est sensible aux variants fonctionnels associés à la perte des multimères de haut poids moléculaires (MHPM) [21]. En revanche, il comporte l'inconvénient de ne pas permettre la distinction entre une anomalie quantitative et une

anomalie qualitative par défaut de liaison du VWF aux plaquettes sans anomalie du profil des multimères. Le VWF : CB et la VWF : RCo sont donc deux tests complémentaires, et la VWF : RCo restant le test de première intention [21].

Trois grands types de la VWD sont décrits : Le type 1 dû à un déficit quantitatif partiel en VWF, est rapporté chez 50 à 75% des patients [21]. Dans notre série, le type 1 est peu représenté (18% des cas) par rapport à sa prévalence dans la population générale et dans la série mexicaine (88,7% des cas). En effet, il reste sous-estimé de par la pauvreté des signes cliniques et le chevauchement du phénotype biologique à celui de sujets sains dans les formes frustes.

Le type 2, correspondant à un déficit qualitatif en VWF ; s'avère plus fréquent qu'originellement décrit et pourrait être presque aussi fréquent que le type 1 depuis l'avènement de la biologie moléculaire [21]. Le type 2, décrit chez 15 à 19% des patients, est subdivisé en 4 principaux sous-types (2A, 2B, 2M et 2N) différenciés par des tests spécifiques. Ce type 2 est plus fréquent chez nos patients (30 % des cas). Le type 2B probable est retrouvé de façon comparable à la littérature (3 à 5% de toutes les VWD et environ 20% des cas de VWD type 2) [21]. En effet, le diagnostic biologique des différents sous types nécessite des examens spécialisés dont on ne dispose pas comme l'étude électrophorétique des MHPM, l'agrégométrie, VWF : CB et l'étude de la liaison de VWF au FVIII. Le diagnostic du type 2B dans notre laboratoire a été retenu chez un patient devant seulement un rapport VWF : RCo / VWF : Ag < 0,7 associé à une thrombopénie et à une symptomatologie hémorragique évocatrice ; alors que sa caractérisation nécessite l'étude de la liaison du VWF aux plaquettes et la RIPA. En effet, la desmopressine est contre-indiquée dans ce type vu le risque d'aggravation de la thrombopénie. Le type 2N est retenu devant l'association du rapport FVIII:C/VWF : Ag < 0,7 avec un TCA allongé corrigé et une clinique évocatrice.

Le type 3, secondaire à un déficit quantitatif total en VWF, est rapporté chez 1 à 5% des patients [21]. Ce type 3 prédomine chez nos patients (52% des cas versus 3,8% dans la série mexicaine [3]), ceci s'explique d'une part par la sévérité de la symptomatologie hémorragique amenant les patients à consulter et d'autre part au biais de sélection de notre centre.

Ainsi, il n'est pas toujours aisé de porter le diagnostic biologique. Plusieurs difficultés diagnostiques se présentent. La phase pré-analytique conditionne la qualité des résultats obtenus [22]. Les explorations de laboratoire utilisées pour le diagnostic de la VWD présentent aussi des insuffisances et des difficultés d'interprétation. La non disponibilité de certaines d'entre elles conduit, parfois, à une sous-estimation de la maladie, en particulier dans les pays en voie de développement [23].

Des experts internationaux ont proposé que le diagnostic de VWD repose sur l'association de 3 critères [24, 25] : l'existence d'une symptomatologie hémorragique depuis l'enfance, un taux de VWF diminué (inférieur au taux moyen -2DS d'une population normale de GS ABO apparié) et enfin l'existence d'une symptomatologie hémorragique dans la famille. Ces critères permettent aisément le diagnostic des types 3, la majorité des variants type 2 et les déficits partiels majeurs (VWF < 30 UI/dl). Mais il existe clairement un chevauchement à la fois du phénotype clinique et biologique entre les formes les plus modérées (sujets ayant un taux de VWF compris entre 30 et 50 UI/dl) et les sujets sains [24,26]. Récemment, un

modèle statistique s'appuyant sur le théorème de Bayes [27] et consistant en une approche probabiliste prenant en compte le score hémorragique et le taux de VWF du patient et des membres de sa famille potentiellement atteints permet de calculer une probabilité finale d'être atteint de VWD de type 1. Cet outil n'est malheureusement pas applicable en pratique clinique quotidienne.

CONCLUSION

Il y a toujours une incertitude quant à la capacité des tests de laboratoire à refléter la fonction du VWF in vivo. La très grande hétérogénéité clinico-biologique de la maladie ainsi que les difficultés

diagnostiques doivent être bien connues par le praticien. La mise en place d'un registre national permettra d'évaluer la prévalence de cette maladie dans notre pays. Nous disposons dans notre laboratoire des tests minimums requis pour le diagnostic positif de la VWD. L'étude des rapports VWF: RCo / VWF: Ag et FVIII:C / VWF : Ag permet d'identifier avec certitude les principaux types. L'introduction de l'étude VWF : CB permettra de différencier le type 2A du type 2M. L'étude de l'agrégation plaquettaire induite par les faibles doses de ristocétine confirmera le diagnostic du type 2B pour une meilleure orientation thérapeutique. L'étude des MHPM, l'étude de la liaison du FVIII-VWF et la biologie moléculaire n'ont pas d'impact thérapeutique et restent l'apanage des centres spécialisés.

Références

1. Sadler E, Budde U, Eikenboom JCJ et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the subcommittee on von willebrand factor. *J Thromb and Haemost* 2006; 4: 2103-14.
2. Cherkaoui S, Laaloui A, Faiz S, Benchemi N. Pregnancy and delivery in a patient with Willebrand's disease. *Transfus Clin et Biol* 2007; 14: 474-80.
3. Majluf-Cruz A, Velez-Ruelas MA, Gonzalez-Avila AI et al. Von Willebrand's disease in Mexico: a pilot study. *Haemophilia* 2013; 19: 231-5.
4. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von willebrand's disease. *Blood* 1987; 69: 454-9.
5. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Jr Marks WJ, Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; 69: 1691-95.
6. Veyradier A, Fressinaud E, Goudemand J, Meyer D. La maladie de Willebrand. *Hématologie* 2011; 17: 278-88.
7. Laffan M, Brown SA, Collins PW et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10:199-217.
8. Nichols WL, Hultin MB, James AH et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008; 14: 171-232.
9. Tosseto A, Rodeghiero F, Castaman G et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 766-73.
10. Rothschild C. Maladie de Willebrand. *Transfus Clin Biol* 1998; 5: 357-61.
11. Siguret V, Ribba AS, Meyer D. Diagnostic biologique de la maladie de Willebrand. *Ann Biol Clin* 1997 ; 55 : 601-6.
12. Michiels JJ, Gadisseur A, Budd U et al. Characterization, classification, and treatment of Von Willebrand disease: A critical appraisal of the literature and personal experiences. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31 : 577-601.
13. Sadler JE. Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood* 2003; 101(6): 2089-93.
14. Mikhail S, Kouides P. von Willebrand disease in the pediatric and adolescent population. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2010; 23 (6 Suppl): S3-10.
15. Lak M, Peyvandi F, Mannucci PM. Clinical manifestations and complications of childbirth and replacement therapy in 385 Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2000; 111:1236-9.
16. Budde U, Scheppenheim R. Von Willebrand factor and Willebrand disease. *Reviews in clinical and experimental hematology* 2001; 5(4): 335-68.
17. Znazin R, Guermazi S, Karoui M. Diagnostic biologique de la maladie de Willebrand et ses difficultés. *Tunis Med* 2007; 85 : 445-9.
18. Lattuada A, Preda L, Sacchi E, Gallo L, Federici AB, Rossi E. A rapid assay for ristocetin cofactor activity using an automated coagulometer (ACL9000). *Blood Coag Fibrinol* 2004; 15 : 505-11.
19. Redaelli R, Corno AR, Borroni L, Mostarda G, Nichelatti M, Morra E. Von Willebrand factor ristocetin cofactor (VWF : RCo) assay : implementation on an automated coagulometer (ACL). *J Thromb Haemost* 2005; 3 : 2684-8.
20. Pittet JL, Barbalat V, Sanvert M, Villard C, Jorieux S, Mazurier C. Evaluation of a new automated Elisa test for Von Willebrand factor using tow monoclonal antibodies. *Blood Coag Fibrinol* 1997; 8 : 209-15.
21. Fressinaud E, Meyer D. Maladie de Willebrand. *Encycl Méd Chir, Hématologie*, 13-021-A-50, 2001, 13p.
22. Groupe d'Etude sur l'hémostase et la Thrombose. Annexe technique. *Sang Thromb Vais* 1993; 5: 37-9.
23. Srivastava A, Rodeghiero F. Epidemiology of Von Willebrand disease in developing countries. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31(5): 569-76.
24. Sadler JE. Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009; 106-12.
25. Rodeghiero F, Castaman G, Tosetto A et al. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study. *J Thromb Haemost* 2005; 3 : 2619-26.
26. Salder J E. Slippery criteria for von Willebrand disease type 1. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1720-3.
27. Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Evidence-based diagnosis of type 1 von Willebrand disease: a Bayes theorem approach. *Blood* 2008; 111: 3998-4003.