

## Numération des populations lymphocytaires T, B et Natural Killer : Etablissement des valeurs normales tunisiennes et étude dans une population d'individus séropositifs pour le VIH, en fonction de l'évolution clinico-biologique de leur maladie.

S. FEKI\*,  
T. BEN CHAABANE\*\*,  
K. BOUKEF\*,  
F. JENHANI\*.

**Résumé :** Les cellules T, B et Natural Killer ont été analysées en pourcentage ainsi qu'en valeur absolue, chez 43 individus VIH+ et 46 donneurs de sang normaux, au moyen d'une méthode de cytométrie en flux en trois couleurs. En première étape, nous avons établi les valeurs normales, pour ces paramètres, dans la population tunisienne et ce, à l'aide de cette technique qui est reconnue comme étant la plus sensible et la plus précise à l'heure actuelle. Ensuite, nous avons comparé les résultats obtenus dans le groupe des séropositifs pour le VIH par rapport à ceux du groupe des donneurs sains. Enfin, nous avons analysé l'évolution de tous ces paramètres enregistrés chez les sujets séropositifs, en fonction du stade clinico-biologique de leur infection, et nous avons trouvé un certain nombre de corrélations dans l'évolution des cellules T totales, T CD4+, T CD8+, B et Natural Killer en valeurs absolues.

**Mots clés :** lymphocytes T - lymphocytes B - natural killer- VIH - cytométrie en flux.

**Abstract :** T, B and Natural Killer cells were analysed in percentage and in absolute count, in 43 HIV+ individuals and in 46 normal blood donors by means of a three-colour flow cytometric method. We initially established normal ranges for these parameters in the tunisian population, by means of the most sensitive and precise method existing currently. Then, we compared the results obtained in the HIV seropositives group versus the normal donors group. Finally, we analysed the evolution of all these parameters recorded in HIV seropositive subjects, according to the clinico-biological stage of their infection, and found a certain number of correlations in the evolution of total T cell, CD4+ T cell, CD8+ T cell, B cell and Natural Killer cell absolute counts.

**Key words :** T lymphocytes - B lymphocytes - natural killer cells - HIV - flow cytometry.

\* Laboratoire d'Immunologie Cellulaire ; Centre National de Transfusion Sanguine, Tunis, Tunisie.

\*\* Service Infectieux ; Hopital La Rabta, Tunis, Tunisie.

### Introduction

Bien que le système immunitaire ne parvienne qu'à contenir plutôt qu'à éradiquer un grand nombre d'infections virales, il joue, cependant un rôle central dans le contrôle viral. Des données de plus en plus fréquentes indiquent le rôle important des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) dans l'infection par le VIH-1 (1). Malheureusement, peu de choses sont connues concernant les lymphocytes T auxiliaires CD4+ spécifiques du

VIH-1. Il a été montré, dans un modèle murin, que les réponses cellulaires T CD4+ spécifiques du virus sont déterminantes pour le maintien d'une fonction CTL effective au cours de l'infection virale chronique (2, 3). De plus, des données récentes suggèrent l'existence d'un lien fonctionnel entre les CTLs spécifiques du VIH-1 et les réponses cellulaires T auxiliaires CD4+ (4). Dans la littérature, les fonctions immunes des cellules B et NK au cours de l'infection par le VIH, sont peu étudiées en comparaison avec la grande masse des investi-

gations orientées vers les cellules T (5, 6). On sait, cependant, qu'au cours de l'infection, les lymphocytes B sont hyper activés, produisent des anticorps polyclonaux de manière intense et, paradoxalement, présentent une diminution des réponses aux mitogènes et une dépression générale de leurs fonctions lymphocytaires (6).

Notre objectif, ici, a été d'explorer quantitativement ces trois types cellulaires T, B et NK dans la population tunisienne. Nous avons commencé, ainsi, par établir nos propres valeurs normales à l'aide d'une technique précise ; ensuite, nous avons cherché à réaliser cette exploration dans une population d'individus vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), tout en recherchant l'existence éventuelle de corrélations entre l'évolution de ces trois paramètres et celle des cellules T CD4+ (déterminant le stade biologique de l'infection), des cellules T CD8 + et du stade clinico-biologique de l'infection par le VIH.

### Matériel et méthode

#### Sujets :

La population étudiée comprend 46 donneurs de sang en bonne santé, appartenant aux deux sexes, âgés de 19 à 56 ans (moyenne d'âge de 27.8 ans), et 43 personnes infectées par le VIH, appartenant également aux deux sexes et âgés de 14 à 45 ans (moyenne d'âge de 33.5 ans). Parmi les patients, 3 étaient asymptomatiques (stade clinique A), 17 étaient symptomatiques (stade clinique B) et 23 présentaient une condition définissant le stade SIDA (stade clinique C), selon la classification du CDC (Center for Disease Control) de 1993 (13, 16).

Les donneurs de sang proviennent du Centre National de Transfusion Sanguine, alors que les individus infectés par le VIH nous sont adressés par le service des maladies infectieuses de l'hôpital La Rabta.

#### Analyses de cytométrie en flux :

Des aliquots de sang sont marqués selon la technique de «lyse sans lavage» (voir infra), par un panel de réactifs TriTEST (CD3 / CD19 / CD45 et CD3 / CD16 + CD56 / CD 45), utilisant des tubes «TruCount Absolute Count» Becton Dickinson pour la numération directe des trois populations lymphocytaires T, B et NK. Une numération

des cellules T CD4 + et T CD8 + a été menée en parallèle, avec également des réactifs TriTEST (CD3 / CD 4 / CD 45 et CD3/CD8/CD45). Les données sont collectées grâce à un cytomètre en flux (FacsCalibur, Becton Dickinson) utilisant le logiciel MultiSet.

#### Technique de «lyse sans lavage» :

Elle consiste à déposer au fond d'un tube «TruCount TM», 20  $\mu$ l d'anticorps monoclonaux marqués (réactif «Tri TESTTM») et 50  $\mu$ l de sang hépariné. Après 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante, 450  $\mu$ l de solution de lyse sont ajoutés dans le but de lyser les hématies. Après une deuxième incubation de 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante, le tube est passé au cytofluorimètre où les données sont acquises puis analysées (figures 6 et 7).

#### Tests statistiques :

Nous avons utilisé la méthode de comparaison de deux moyennes observées sur de grands échantillons (supérieurs à 30), basée sur l'écart réduit, ainsi que le calcul du coefficient de corrélation pour déterminer la relation entre deux propriétés.

### Résultats

La détermination des sous-populations lymphocytaires T, B et NK, dans la population saine et la population VIH+, a été réalisée directement en valeur absolue ainsi qu'en pourcentage par rapport aux lymphocytes totaux (tableaux I, II et III ; figures 1 et 2).

#### 1. Etablissement des valeurs normales tunisiennes :

Dans un premier temps, cette étude fournit des données sur la valeur des lymphocytes T (CD3+), des lymphocytes B (CD19+) et des cellules NK (CD3-CD16 + CD 56 +), dans une population de sujets tunisiens indemnes de toute pathologie.

Les résultats des lymphocytes T obtenus, ici, sont très proches de ceux obtenus dans une précédente étude (7, 14) où nous avons déterminé la valeur des lymphocytes T totaux et de leurs sous-classes CD4+ et CD8+.

Quand on compare ces valeurs normales tunisiennes avec un certain nombre de résultats obtenus dans d'autres pays (tableau I), on s'aperçoit que :

Tableau I : Comparaison des résultats avec ceux de la littérature

		Nos résultats	D'Hautcourt	Hannet	Landay
Cellules T	% ( $\alpha$ )	72.5	72.8 NS	72 NS	72 NS
	VA ( $\alpha$ )	1433	1340 NS	1400 NS	1214 $\alpha < 0.02$
Cellules B	% ( $\alpha$ )	13.3	11.8 $\alpha \approx 0.04$	13 NS	
	VA ( $\alpha$ )	261	200 $\alpha \approx 0.001$	300 NS	
Cellules NK	% ( $\alpha$ )	12.7	14 NS	13 NS	
	VA ( $\alpha$ )	252		300 $\alpha_j 0.05$	228 NS

Tableau II : Pourcentages moyens des cellules T, B et NK dans les populations saine et VIH positive.

Populations cellulaires	Individus sains			Individus VIH+			$\alpha$
	Moyenne	Ecart-type	Min-max	Moyenne	Ecart-type	Min-max	
T	72.5	7.10	55-86	78	11.9	52-98	< 0.01
B	13.3	4.89	4-30	10.2	6.98	1-33	< 0.02
NK	12.7	5.88	4-26	9.98	8.67	1-32	NS

Tel qu'il a été énoncé plus haut, aussi bien le pourcentage que la valeur absolue des cellules T sont très similaires à ceux publiés dans la littérature ; en fait aucune différence significative n'a été trouvée avec les résultats de D'Hautcourt (8) et de Hannet (9). Pour les cellules B, aucune différence significative n'a été trouvée avec les résultats de Hannet, aussi bien en pourcentage qu'en valeur absolue, alors qu'une petite différence a été trouvée avec les résultats de D'Hautcourt ( $\alpha \approx 0.04$  pour le pourcentage et  $\alpha \approx 0.001$  pour la valeur absolue) ; cette différence peut être expliquée statistiquement par le trop grand effectif de l'étude de cette équipe (n = 1032 pour les % ; n = 1060 pour les VA) alors que l'équipe de Hannet a travaillé sur 101 individus, ce qui est beaucoup plus proche de l'effectif de notre série. Enfin, pour les cellules NK, peu d'équipes dans le monde ont déterminé leurs valeurs de référence. Il n'en demeure pas moins que les nôtres sont très proches de celles rapportées dans la littérature : aucune différence significative n'a été trouvée avec les résultats de Landay (10) aussi bien en

pourcentage qu'en valeur absolue ; aucune différence significative n'a été trouvée avec les résultats de Hannet pour le pourcentage des cellules NK, alors que leur valeur absolue est statistiquement plus élevée que dans notre série ( $\alpha \approx 0.05$ ). Cette différence peut être due à la technique qu'a utilisée Hannet, qui une technique « maison » nécessitant l'utilisation d'un compteur de cellules pour transformer les pourcentages cellulaires en valeurs absolues, étape supplémentaire qui introduit une marge d'erreur plus importante, surtout quand il s'agit de dénombrer des cellules qui sont à un taux très bas dans le sang, comme les cellules NK.

## 2. Résultats chez les individus vivant avec le VIH

Dans un deuxième temps, cette étude nous fournit des résultats comparatifs entre des sujets sains et des sujets infectés par le VIH.

Les pourcentages cellulaires (tableau II et figure 1), chez les patients VIH+, sont statistiquement plus élevés pour les cellules T ( $\alpha < 0.01$ ) et moins élevés pour les cellules

## Numération des populations lymphocytaires T, B et Natural Killer

**Tableau III : Valeurs absolues moyennes des cellules T, B et NK dans les populations saine et VIH positive.**

Populations cellulaires	Individus sains			Individus VIH+			$\alpha$
	Moyenne	Ecart-type	Min-max	Moyenne	Ecart-type	Min-max	
T	1433	434	618-2639	1142	898	70-4946	0.05
B	261	125	55-763	121	97.5	6-359	$< 10^{-8}$
NK	252	137	58-652	103	99.0	13-535	$< 10^{-8}$

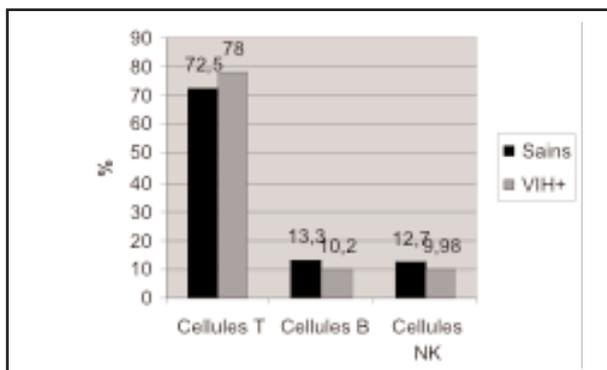
B ( $\alpha < 0.02$ ), avec aucune différence significative pour les cellules NK, par rapport aux pourcentages cellulaires obtenus chez les individus sains.

En revanche, les valeurs absolues des trois populations cellulaires T, B et NK sont significativement diminuées (respectivement :  $\alpha \approx 0.05$  ;  $\alpha < 10^{-8}$  ;  $\alpha < 10^{-8}$ ) chez les patients VIH+, par rapport aux individus sains (tableau III et figure 2). On remarque, cependant, que la différence est beaucoup plus significative pour les cellules B et NK que pour les cellules T.

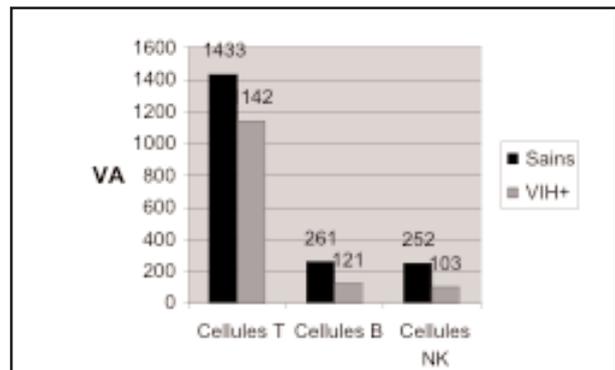
Il ressort donc de cette étude que des contradictions existent, dans la comparaison des résultats du groupe VIH+ avec le groupe témoin, entre les pourcentages et les valeurs absolues correspondantes. Ainsi, les cellules T paraissent augmentées en pourcentage et diminuées en valeur absolue ; les cellules NK paraissent inchangées en pourcentage et diminuées en valeur absolue ; les cellules B paraissent diminuées en pourcentage et en valeur absolue, mais la diminution en valeur absolue est beaucoup plus significative ( $\alpha < 10^{-8}$ ) que celle en pourcentage ( $\alpha < 0.02$ ). En fait, la variation du pourcentage

d'une population cellulaire donnée ne dépend pas uniquement de la variation de cette population cellulaire seule, mais également de la variation des autres populations cellulaires et notamment, ici, de la diminution du nombre de cellules T CD4+ qui a tendance à faire augmenter les pourcentages des autres populations cellulaires. C'est ce qui explique l'augmentation du pourcentage des cellules T CD8+ et donc des cellules T totales, alors qu'en valeur absolues, ces dernières sont diminuées (bien que de manière moins significative que pour les cellules B et NK) ; c'est ce qui explique également la diminution faiblement significative du pourcentage des cellules B ( $\alpha < 0.02$ ) alors qu'en valeur absolue elle est fortement significative ( $\alpha < 10^{-8}$ ) ; enfin, c'est ce qui explique aussi la diminution fortement significative ( $\alpha < 10^{-8}$ ) de la valeur absolue des cellules NK (qui sont déjà en petit nombre par rapport aux autres cellules du sang périphérique), diminution masquée par les autres catégories cellulaires lorsqu'on étudie ces cellules NK en pourcentage.

Les résultats de cette étude nous confirment, donc,



**Figure 1 : Comparaison des pourcentages moyens des différentes sous-populations cellulaires, entre sujets sains et sujets VIH +**



**Figure 2 : Comparaison des valeurs absolues moyennes des différentes sous-populations cellulaires, entre sujets sains et sujets VIH +**

qu'évaluer des populations cellulaires en valeur absolue est plus fiable que les évaluer en pourcentage. C'est pourquoi, des analyses ultérieures (en fonction des stades clinico-biologiques, de la production de cytokines et du burst oxydatif) ont été réalisées en valeur absolue (11, 12, 13).

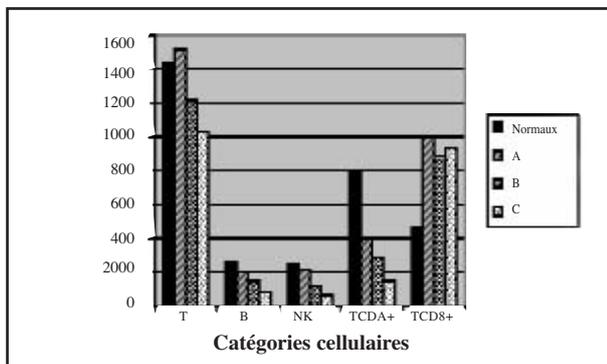
### 3. Résultats en fonction de l'évolution de l'infection par le VIH

Enfin, l'étude des valeurs absolues de ces trois populations lymphocytaires en fonction de l'état clinico-biologique des patients (tableau IV) a donné les résultats suivants :

- Ainsi, quand on observe les variations dans les valeurs absolues des différentes catégories cellulaires au fur et à mesure que l'on progresse dans les stades cliniques des patients (figure 3), on s'aperçoit que :

**Tableau IV : Effectif en fonction des différents stades cliniques et biologiques de l'infection par le VIH**

Stades	Effectif
Stade A	3
Stade B	17
Stade C	23
Stade 1 (CD4>500)	8
Stade 2 200<CD4<500	12
Stade 3 CD4<200	23
Témoins	46



**Figure 3 : Variations de la valeur absolue des différentes catégories cellulaires en fonction du stade clinique de l'infection par le VIH**

Les cellules T marquent une petite augmentation, par rapport aux normaux, au stade initial (A), puis diminuent progressivement jusqu'au stade C. Les cellules T CD4+ diminuent presque de moitié au stade A et continuent de baisser jusqu'au stade C. Les cellules T CD8+, voient leur nombre doubler au stade A et malgré leur relative baisse aux stades B et C, elles demeurent quand même très élevées.

Quant aux cellules B et NK, elles diminuent progressivement jusqu'à afficher une valeur basse (moins du tiers de la normale) au stade C.

- Quand on observe maintenant ces variations cellulaires au fur et à mesure que le nombre de cellules T CD4+ diminue (stades biologiques) (figure 4), on note que :

L'augmentation initiale des cellules T en général et des cellules T CD8+ surtout, est très prononcée au premier stade biologique (CD4>500 cellules /  $\mu$ l). Les cellules T totales deviennent ensuite inférieures à la normale au second stade biologique (200 < CD4 < 500) et continuent à baisser au troisième (CD4 < 200 cellules /  $\mu$ l), tandis que les cellules T CD8+, malgré leur diminution progressive au fur et à mesure que l'on avance dans les stades biologiques, demeurent malgré tout toujours plus élevées que la normale.

Les cellules B, comme pour les stades cliniques, présentent une diminution progressive au fur et à mesure que l'on avance dans les stades biologiques, alors que les cellules NK montrent une nette diminution initiale brutale (environ de moitié) et se maintiennent à un niveau toujours très bas aux deux stades biologiques suivants.

- Enfin, la figure 5 résume les variations des valeurs absolues cellulaires au cours de chaque stade clinico-biologique de l'infection par le VIH. Ce que l'on doit dire, tout d'abord, c'est que les résultats au sein du stade A ne sont pas statistiquement valables en raison de l'effectif trop faible pour cette catégorie de patients (deux individus au stade A1 et seulement un au stade A2) et donc on ne peut pas considérer comme fiables les augmentations des cellules B et des cellules NK au stade A2 qui ne concerne, en fait, qu'un seul patient. Par contre, au sein de chacun des deux stades cliniques suivants (B et C) où l'effectif est largement plus important, on retrouve la

diminution progressive, en fonction du stade biologique (de 1 à 3), des trois catégories cellulaires T, B et NK, ainsi que l'augmentation initiale (stade B1) des cellules T.

## Discussion

Ce travail souligne, tout d'abord, l'intérêt de cette méthode par triple marquage (trois anticorps monoclonaux avec trois fluorochromes différents) qui permet, par exemple, de déterminer avec précision le nombre de lymphocytes T CD3+CD8+ sans être faussés par les quelques cellules NK CD3-CD8+ (9, 14). A côté de ce premier avantage, cette nouvelle méthode en présente trois autres.

- Tout d'abord, il s'agit d'une méthode utilisant la technique de «lyse sans lavage», ce qui limite les pertes cellulaires occasionnées par les centrifugations de la technique «maison» et ceci est d'autant plus intéressant que notre but, ici, est de déterminer avant tout des valeurs absolues cellulaires.

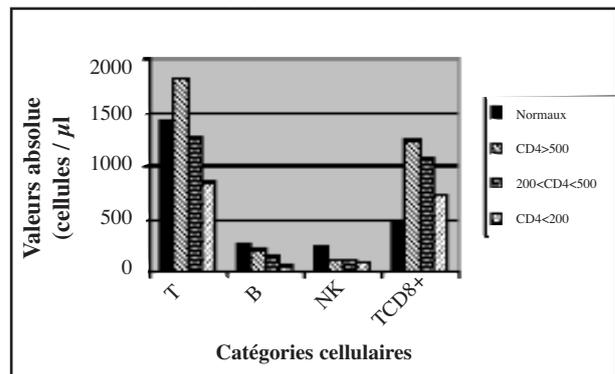
- Ensuite, cette nouvelle méthode utilise des tubes contenant un nombre bien défini de billes fluorescentes qui permettent d'avoir directement les valeurs absolues, sans avoir à faire une Numération Formule Sanguine (NFS) au préalable pour transformer des pourcentages cellulaires en valeur absolue ; en effet, l'introduction de cette étape supplémentaire augmente la marge d'erreur.

- Enfin, pour ce qui est de l'infection par le VIH, l'autre intérêt majeur de cette méthode est qu'elle permet de déterminer avec précision le nombre de lymphocytes T CD3+CD4+, ce qui est beaucoup plus précis que le rapport CD4 / CD8 qui était utilisé auparavant et qui pouvait fluctuer en fonction de la valeur du CD8.

Le nombre de cellules B et de cellules NK était fortement diminué ( $\alpha < 10^{-8}$  dans les deux cas) chez les patients VIH+, par rapport aux individus sains (tableau III et figure 2). La diminution des cellules NK a été rapportée par Lucia qui a de plus montré que la majorité de ces cellules NK étaient activées (HLA-DR+) et qui a ensuite proposé comme explication l'hypothèse de la perte de cytokines d'immunorégulation qui ont été montrées comme étant importantes dans le maintien de l'activité NK (5). Dans la littérature à propos des fonc-

tions immunes au cours de l'infection par le VIH, l'étude des dysrégulations des cellules B paraît marginalisée en comparaison avec la grande masse des investigations orientées vers les cellules T ; ce que l'on sait, cependant, est que au cours de l'infection, les lymphocytes B sont hyperactivés, produisent des anticorps polyclonaux de manière intense et, paradoxalement, présentent une diminution des réponses aux mitogènes et une dépression générale de leurs fonctions lymphocytaires (6). Par ailleurs, il ressort de notre étude que la diminution des cellules B est fortement corrélée avec celle des cellules T CD4+ ( $r=0.627$  ;  $a < 0.001$ ), mais pas avec la variation des cellules T CD8+. Aucune corrélation n'a été trouvée, cependant, entre la diminution des cellules NK et les variations respectives des cellules T CD4+, T CD8+ et B.

L'étude de ces deux catégories cellulaires B et NK a, de plus, montré une diminution progressive de leur nombre au fur et à mesure que l'on avance dans les stades cliniques, jusqu'à afficher des valeurs dramatiquement faibles (moins du tiers de la normale) au dernier stade clinique (tableau IV et figure 3). Ceci particulièrement a été relevé pour les cellules NK dont la diminution est plus spectaculaire en fonction des stades biologiques et semble parallèle à celle des



**Figure 4 : Variations de la valeur absolue des différentes catégories cellulaires en fonction du stade biologique de l'infection par le VIH**

cellules T CD4+ (tableau V et figure 4).

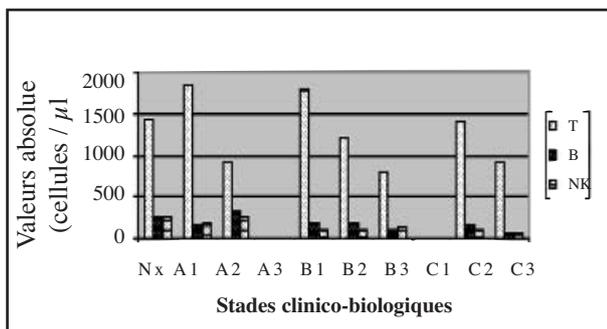
## Conclusion

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine est relativement peu fréquente en Tunisie. La DSSB (Direction des Soins et de Santé de Base) classe notre

pays parmi les pays à faible prévalence (15). Mais il n'en demeure pas moins que le VIH représente une menace pour l'avenir de notre pays et nous nous devons de tout mettre en œuvre pour une meilleure prise en charge de nos malades atteints par cette infection. C'est dans cet ordre d'idée que nous nous sommes proposés, d'établir nos propres valeurs normales, sur un échantillon de la population tunisienne saine, pour les lymphocytes T CD4+ et T CD8+, les lymphocytes B et les cellules NK, sachant que le taux des lymphocytes T totaux a déjà été établi dans un travail antérieur (7,15).

Par la suite, nous nous sommes intéressés à explorer ces paramètres chez des individus vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les variations que nous avons relevées, par rapport à la population tunisienne normale, nous ont incité à pousser plus loin ces explorations et nous avons noté une évolution de ces variations en fonction des différents stades clinico-biologiques de l'infection par le VIH chez ces patients. De plus, des études de corrélations ont permis de mettre en évidence certaines relations entre ces différents paramètres, notamment au cours de l'évolution de la maladie.

Afin d'expliquer toutes ces variations dans les numérations des différentes cellules lymphocytaires, nous projetons d'étudier les fonctions de ces cellules, à commencer par leur



**Figure 5 : Variations de la valeur absolue des différentes catégories cellulaires en fonction du stade clinico-biologique de l'infection par le VIH**

## Références

1. Brander C, Walker BD. T lymphocyte responses in HIV-1 infection : implications for vaccine development. *Curr Opin Immunol* 1999 ; 11 : 451-9.

2. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 1994 ; 68 : 8056-63.

3. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM et al. Vigorous HIV-1 specific CD4 + T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997 ; 278 : 1447-50.

4. Kalams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES et al. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999 ; 73 : 6715-20.

5. Lucia B, Jennings C, Cauda R et al. Evidence of a selective depletion of a CD16+ CD56+ CD8+ natural killer cell subset during HIV infection. *Cytometry* 1995 ; 22 (1) : 10-5.

6. Amadori A, Chieco-Bianchi L. B-cell activation and HIV-1 infection : deeds and misdeeds. *Immunol Today* 1990 ; 11 (10) : 374-9.

7. Feki S, Rekaya Z, Ben Chaabane T, Zribi A, Hili K, Sidhom M, Boukef K et Jenhani F. Numération des sous-populations lymphocytaires T dans la population tunisienne. *Maghreb Médical*, Volume 20, n° 343, Janvier 2000.

8. D'Hautcourt JL, Giroto M, Lawry J et al. Lymphocyte subset reference values in peripheral blood : european survey. *Biol Cell* 1992 ; 76 : 68a.

9. Hannel I, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P et al. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunology today* 1992 ; Vol 13 ; N° 6.

10. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS* 1990 ; 4 : 479-497.

11. Feki S, Ben Chaabane T, Boukef K and Jenhani F. Changes in INFγ, IL-2 and IL-4 production by different T lymphocyte subclasses in human immunodeficiency virus-seropositive and seronegative individuals from the Tunisian population. Article sous presse dans « Disease Markers ».

12. Feki S, Ben Chaabane T, Jenhani F, Boukef K. La balance Th1/Th2 au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). «Revue Tunisienne de Biologie Clinique» (article sous presse).

13. Feki Bouhoula S. Etude du profil immuno-cellulaire au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), dans la population tunisienne : Numérations lymphocytaires, production de cytokines Th1 / Th2 et burst oxydatif. Thèse de doctorat de Sciences Pharmaceutiques, soutenue le 16 janvier 2001 à la Faculté de Pharmacie de Monastir.

14. Feki S, Rekaya Z, Ben Chaabane T, Zribi A, Boukef K and Jenhani F. Determination of T-lymphocyte subsets in a north african population (Tunisia) : Establishment of normal ranges and results in HIV-infected individuals. *Disease Markers* 1998 ; 14 : 161-164.

15. DSSB-MSP : infection à VIH. *Bulletins épidémiologiques*, 1998.

16. Kazatchkine M. Avant-propos. *La Revue du Praticien (Paris)* 1995 ; 45 : 677-81.