

**Contribution à l'Étude
de la Maladie Athéromateuse***

S. P. AZIZI¹ J. L. DELSAL³
R. SARLATY² H. MANHOURI⁴

Depuis 1935, nous avons été frappé de certains faits cliniques tels que :

1) L'absence d'athérome aortique à l'autopsie des sujets âgés dans les hôpitaux de Téhéran; fait d'ailleurs remarqué par le Professeur Oberling, ancien doyen de la Faculté de Médecine de Téhéran.

2) La fréquence énorme des troubles phospho - calciques se traduisant par :

a) des états tétaniques occultes chez les femmes pendant la grossesse et la période d'allaitement.

b) un état ostéomalacique, surtout chez les femmes venant de l'est et du sud-est de l'Iran.

3) Des états anémiques, diarrhéiques et de l'œdème s'améliorant rapidement par ingestion de fortes quantités de viande.

Ces faits nous ont paru dignes d'intérêt, et, pour mettre en évidence l'état biologique de la population qui fréquente les hôpitaux

*) Mémoire présenté au 4e congrès international de nutrition, Paris 1957, et publié dans l'Arch. Inst. Razi, 1957, 10, 1-12.

1) Professeur de Clinique Médicale à la Faculté de Médecine de Téhéran, Médecin de l'Hôpital Pahlavi.

2) Assistant.

3) Chef du Service de Biochimie, Institut Razi, Hessaarak.

4) Assistant.

de Téhéran, nous nous sommes adressé au Docteur Delsal de l'institut de Hessarak, et lui avons demandé de doser les protéines et les phospholipides, substances qui contribuent à causer la maladie.

Entre temps, nous avons constaté, que dans les pays limitrophes de l'Iran, en particulier aux Indes (Chakrabarty, 1944) et en Afghanistan, certain de ces faits avaient été étudiés sur une grande échelle par des savants français qui dirigeaient, à cette époque, les Facultés de Médecine de Kaboul (Boissier J. et O. 1953, et de Sérafino, 1955). Ces auteurs attribuent ces états pathologiques à une manifestation carenentielle due en partie aux régimes alimentaires de la population afghane. Ils pensent à juste raison :

«que le peuple afghan se trouve dans un équilibre biologique instable fort bien supporté pendant longtemps, mais cette instabilité ne résiste pas à des agressions variées qui entraînent alors une cascade de troubles graves donnant à la pathologie une allure très personnelle et particulièrement riche au point de vue biologique» (citation intégrale).

En effet, le régime carenciel est à la base de la maladie athéromateuse, et, par conséquent, explique la rareté des maladies vasculaires, si fréquentes dans les autres pays et dans la population bien nourrie de l'Iran. Toutefois, l'étiopathogénie de l'ostéomalacie, comme nous l'avons montré avec notre élève Samyan (1956) est complexe et dépend aussi bien de facteurs sociaux que de facteurs alimentaires.

Les 96 sujets chez lesquels nous avons cherché à démontrer cet état biologique ont été choisis d'abord parmi des malades fréquentant les hôpitaux de Téhéran, c'est-à-dire parmi les personnes pauvres et sous-alimentées, puis, parmi des sujets cliniquement sains, ne présentant aucune maladie évidente de la nutrition, ni aucuns troubles rénaux, gastro-intestinaux ni angio-cholécystiques.

Nous pensons qu'il est utile de savoir que la majorité de la population iranienne qui fréquente les hôpitaux de Téhéran est accoutumée à un régime, d'ailleurs ancestral qui est un véritable régime de famine. Elle se nourrit d'un kilogramme de pain et de 200 grammes de fromage par jour, (avec de temps à autre, un peu de viande maigre et de fruits).

Voici les méthodes pratiquées par monsieur Delsal.

Méthodes expérimentales :

a) *Séparation des lipides et des protéines.*

Lorsque l'on délipide directement les protéines du sérum sanguin par les solvants organiques tels que l'éthanol-éther, le chloroforme méthanol ou le méthylal-méthanol (6) l'extrait lipidique obtenu contient de nombreuses impuretés non-lipidiques et principalement de l'urée. La redissolution de l'extrait lipidique sec dans le chloroforme ou l'éther de pétrole ne purifie que partiellement ces lipides.

La méthode (8) que nous avons appliquée dans ce travail, consiste à éliminer ces impuretés non-lipidiques avant d'extraire les lipides. Les protéines de 1ml de sérum, non hémolysé, mélangé avec 7 ml d'eau distillée, sont précipitées par 1 ml de solution à 10% de sulfate de zinc ($7H_2O$) et 1 ml de soude 0.5 N, selon la méthode de Somogyi (29). La solution de soude est titrée contre la solution de sulfate de zinc de sorte que, 10, 8 à 11, 2 ml de soude 0.5 N soient utilisés pour produire une coloration rose stable, en présence de phénolphtaléine, et 10 ml de solution de sulfate de zinc avec de l'eau distillée. Les protéines sont ainsi précipitées à pH neutre. Après 15 minutes de contact, on centrifuge et lave deux fois le précipité protéinique avec 5ml d'eau distillée. Le premier surnageant et le liquide des deux lavages sont réunis et complétés à 25 ml avec de l'eau distillée. On peut doser, sur cette solution, notamment l'urée et le calcium.

Les lipides des lipo-protéines sont extraits par 25ml de solvant des lipides. Nous avons utilisé le mélange de Bloor : éthanol-éther (3/1), notre stock de métylal étant insuffisant pour effectuer ce travail. Après 30 minutes, on centrifuge et lave les protéines avec 10 ml de solvant. les solvants d'extraction et de lavage sont réunis et évaporés sous vide, à basse température. Les lipides sont dissous dans le chloroforme et ajoutés à 10 ml dans une fiole jaugée avec du chloroforme. Les lipides, obtenus par cette méthode, sont purifiés et ne contiennent ni urée, ni phosphore minéral, celui-ci restant avec le précipité protéines-

hydroxyde de zinc. On dose, sur cette solution chloroformique lipidique, le cholestérol et le phosphore lipidique.

b) *Dosage des protéines totales.*

Les protéines, restant après l'extraction des lipides, sont reprises dans 20 ml d'acide trichloracétique à 5%. L'hydroxyde de zinc passe en solution, ainsi que le phosphore minéral et les protéines précipitent. Après centrifugation, les protéines sont dissoutes dans de la soude N/10, et l'azote est dosé par micro-Kjeldahl sur une partie aliquote. La teneur en azote protéinique est multipliée par le coefficient 6,25 pour obtenir la teneur en protéines. Nous faisons remarquer que les protéines ainsi obtenues sont purifiées et ne contiennent ni azote non-protéinique, ni azote lipidique.

c) *Dosage du cholestérol total.*

On prélève 2 ml de l'extrait chloroformique (0,2 ml de sérum) que l'on verse dans un tube colorimétrique (19×150 mm). On chasse chloroforme sous vide et ajoute 1 ml de chloroforme. On a préparé, avant de faire les dosages, un mélange de 40 ml d'anhydride acétique, redistillé, refroidi dans un bain de glace, et de 0,2 ml d'acide sulfurique concentré et pur. Ce mélange, bien homogène, est ensuite retiré de la glace et mis dans un bain-marie à 20°. On ajoute 4 ml de ce réactif aux dosages. On prépare parallèlement à la série de dosages un blanc contenant 1 ml de chloroforme, 4 ml de réactif servant à régler le spectrophotomètre à 100% de transmission et un témoin de 300 gamma de cholestérol (purifié par précipitation du dibromure, débromuration et recristallisation) par ml de chloroforme auquel on ajoute 4 ml de réactif. Les tubes sont mis à l'obscurité à 20° et lus à 640 millimicrons au spectrophotomètre Coleman Junior 6A. Si la température est de 20° les lectures sont faites après 35-50 minutes et la coloration est stable 10 minutes environ. Les lectures sont faites en densité optique. Si, pour 300 gamma de cholestérol on a une densité optique D₁ et pour le dosage

une densité D₂ le taux du cholestérol total du sérum en gamma% sera de : $0,15 D_2/d_1$

d) *Dosage du phosphore lipidique.*

On prélève 4 ml de l'extrait chloroformique (0,4 ml de sérum) que l'on verse dans un tube pyrex de 18×150 mm, jauge à 10 ml auquel a été soudé un rodage normalisé de 19/38 (7). Le chloroforme est évaporé. On ajoute 0,3 ml d'acide sulfurique concentré. On bouche le tube en maintenant le bouchon de façon à laisser seulement un léger interstice. On chauffe légèrement jusqu'à calcination en évitant tout départ de fumées d'acide sulfurique. Expérience facile à réaliser, car, lorsqu'on voit les fumées dépasser la moitié du tube, il suffit de boucher celui-ci et de le laisser refroidir, pour que les fumées se condensent. On ajoute alors, une goutte d'eau oxygénée à 30% (sans phosphore et chauffée légèrement). La destruction est très rapide. Cependant, bien que la solution soit incolore, il faut chauffer encore quelques instants pour décomposer complètement l'eau oxygénée en excès et parfaire la destruction. On ajoute, ensuite, 7 ml d'eau bidistillée en rinçant le bouchon et on met le mélange au bain-marie pendant 20 minutes pour transformer l'acide pyrophosphorique, qui aurait pu se former au cours d'un chauffage trop violent, en acide orthophosphorique, seul dosé. Après refroidissement, on ajoute 1 ml d'une solution de molybdate d'ammonium à 5% et 0,5 du réactif de réduction de Fiske et Subarow (12) (Acidel-amino 2-naphtol-4 sulfonique- 0,2% contenant 12% de bisulfite de sodium et 1,2% de sulfite anhydre de sodium). On complète à 10 ml avec de l'eau bidistillée. On prépare, en même temps, un blanc contenant tous les réactifs, sauf le phosphore et un témoin à 20 gamma de phosphore avec les mêmes réactifs et un volume total de 10 ml. Après 30 minutes, on transvase les solutions dans des tubes colorimétriques de 19×150 mm et effectue les lectures à 700 millimicrons au spectrophotomètre Coleman Junior 6A. Si la densité optique pour 20 gamma de phosphore est D₁, et pour le dosage D₂, le taux en phosphore lipidique en mg pour 100 ml de sérum sera de : $5 \times D_2/D_1$.

Pour avoir le taux en phospholipides, on multiplie le taux en phosphore lipidique par 25.

Partant de lipides purifiés, qui ne contiennent pas de phosphore minéral, le dosage du phosphore organique correspond bien aux phospholipides totaux du sérum solubles dans le chloroforme.

Calcul de la déviation standard.

Si M est la moyenne arithmétique des N sérums examinés (N=96), e la différence entre chaque valeur individuelle et moyenne arithmétique, la déviation standard est donnée par la formule : $\sigma = \sqrt{\frac{\sum e^2}{N-1}}$.

Le calcul a été effectué pour les protéines totales, le cholestérol total, les phospholipides et le rapport cholestérol / phospholipides (C/P). Les résultats, exprimés en g pour 100cc de sérum, sont groupés dans le tableau suivant :

	Moyenne arithmétique	Déviation standard
Protéines totales	6,60	0,75
Cholestérol total	0,160	0,042
Phospholipides	0,165	0,037
C/P	0,97	0,115

Tableau de répartition des fréquences de M-26 à M+26.

Protéines totales	< 5,10	5,10-5,85	5,85-7,35	7,35-8,10	> 8,10
Fréquence en o/o	2	9,3	72,9	12,5	3,2
Cholestérol total	< 0,076	0,076-0,118	0,118-0,202	0,202-0,244	> 0,244
Fréquence en o/o	0	17,7	63,5	14,6	4,1
Phospholipides	< 0,088	0,088-0,128	0,128-0,202	0,202-0,239	> 0,239
Fréquence en o/o	0	17,7	67,7	12,5	2
C/P	< 0,75	0,75-0,86	0,86-1,08	1,08-1,19	> 1,19
Fréquence en o/o	6,25	11,50	65,50	12,50	6,20

E.J. King et I.D.P. Wootton (21,30) donnent les teneurs normales suivantes en g. pour 100 cc de sérum en fonction de la fréquence en o/o.

Fréquence en o/o	1	9	80	9	1
Protéines totales	< 6.3	6.3-6.7	6.7-7.7	7.7-8.2	> 8.2
Cholestérol total	< 0.123	0.123-0.153	0.153-0.260	0.260-0.324	> 0.324
Phospholipides	< 0.175	0.175-0.207	0.207-0.315	0.315-0.372	> 0.372

En comparant les fréquences en o/o de nos résultats avec celles de E.J. King par les teneurs normales indiquées dans le tableau précédent nous obtenons le tableau suivant :

Selon King en o/o	1	9	80	9	1
Protéines totales	37.5	21.9	32.2	6.3	2.1
Cholestérol total	19.8	32.3	45.8	2	—
Phospholipides	60.4	25	14.6	—	—

Les résultats de ce tableau et l'examen des courbes comparatives (concentration g/o fréquence o/o) des résultats normaux anglais et iraniens nous montrent une diminution très sensible des protéines totales, du cholestérol total et des phospholipides chez les sujets iraniens.

Puisque nous comparons les résultats anglais et les nôtres, nous devons examiner si les méthodes analytiques employées sont susceptibles d'apporter des différences.

Pour le dosage des protéines totales, notre méthode se rapproche de celle de E.J. King : la précipitation des protéines par l'hydroxyde de zinc ou par l'acide molybdique aboutissant sensiblement aux mêmes résultats. Cependant, dans notre méthode, l'azote lipidique n'est pas dosé ce qui introduit une diminution inférieure à 0,50/o. On peut donc affirmer que 59/o des sujets iraniens ont des teneurs en protéines totales inférieures à la normale contre 100/o seulement chez les sujets anglais.

Pour le dosage du cholestérol total, notre méthode et celle de E.J. King sont semblables; les deux méthodes effectuant le dosage sans saponification. En conclusion, 52% des sujets iraniens ont un taux de cholestérol total inférieur à la normal 100% pour les sujets anglais.

Le décalage le plus important entre nos résultats et les teneurs normales, concerne les phospholipides. En effet, 85% des sujets iraniens ont un taux de phospholipides inférieur à la normale, contre 100% pour les sujets anglais. Mais ici, une différence peut provenir des méthodes de dosage. E.J. King dose les phospholipides directement, soit dans l'extrait direct alcoolo-éthéré, soit dans le précipité trichloracétique (les résultats étant identiques selon D.B. Zilverstmit et A.K. Davis (31)). Dans notre méthode l'extrait lipidique, purifié, alcoolo-éthéré est repris dans le chloroforme et une partie du phosphore organique n'est pas soluble. Cette fraction, non dosée par notre méthode, mais dosée par la méthode de E.J. King, est constituée, selon M.H. Hack (13) par un ou plusieurs phosphatidyl-peptides. Cette différence est de l'ordre de 10% en phospholipides. En tenant compte de ce fait, il y a encore, au moins 75% de sujets iraniens qui ont un taux de phospholipides inférieur à la normale.

On peut donc conclure, avec certitude, qu'au moins 50% des sujets iraniens, ont des taux en protéines totales, en cholestérol total et en phospholipides inférieurs à la normale.

Un fait particulier au sujet du rapport cholestérol phospholipides est à signaler. D'après les résultats de Eder, Russ, Pritchett, Wilber et Barr (10) le rapport C/P pour un plasma normal est de 0,87 (0,62-1,20) pour des sujets de 18 à 35 ans, et de 1,00 (0,79-1,18) pour ceux de 45 à 65 ans). Nos résultats indiquent que le rapport C/P est normal chez 50% des sujets iraniens ayant des taux de cholestérol total et de phospholipides inférieurs à la normale. Malgré la diminution importante de ces taux, l'équilibre entre le cholestérol total et les phospholipides est maintenu.

Comparaison entre les valeurs normales en Iran et dans d'autres pays

En **Amérique**, Peters et Man (23) ont trouvé chez 300 sujets normaux 0,24 g/o de phospholipides et 0,20 g/o de cholestérol total. Russ, Eder et Barr (24) sur le plasma de 100 sujets normaux trouvent 0,25 g/o de phospholipides et 0,22 g/o de cholestérol total. Keys et Al. (14) ont étudié le taux de cholestérol en fonction de l'âge du sujet et montré sa variation : 0,17 g/o à 18 ans ; 0,20 g/o à 35 ans ; 0,22 g/o à 40 ans ; 0,25 g/o à 50 ans avec diminution à partir de 55-60 ans.

En **France**, dans de nombreuses analyses de cholestérol total nous avons trouvé un taux normal sensiblement identique au taux normal américain. Melle Y. Sabetay et G. Sandor (25) ont trouvé également que le taux du cholestérol en France était comme en Amérique; mais par contre, que le taux des phospholipides était beaucoup plus faible en France (16 g/o contre 0,24-0,25 g/o en Amérique). Plus récemment G. Sandor (27) compare les lipoprotéines du sérum humain en France et en Amérique. Il arrive à cette conclusion, que le taux des phospholipides est sensiblement doublé en Amérique, mais, que le taux des glycérides est de deux à trois fois plus élevé en France.

D'une enquête, fait par A. Keys et Al. en Amérique, en Italie, en Afrique du Sud, et au Japon, il résulte que dans une population à régime riche en graisse, le taux du cholestérol tend à s'élever de l'adolescence à l'âge moyen (de 18 à 54 ans). Au contraire, à Naples, où le régime est faible en graisse on a trouvé chez 84 sujets sains que le taux du cholestérol s'élève jusqu'à 30 ans et n'augmente plus.

La sous-alimentation ou un régime déficient en graisse, produit un abaissement du taux du cholestérol. Tout récemment A. Keys et Al. (20) ont montré que chez le fermier japonais où 90% des calories sont apportées par les graisses, le taux du cholestérol est de 0,141 g/o. Par contre, chez des japonais du même âge, de Los Angeles, avec 39% de calories apportées par la graisse, le taux du cholestérol est de 0,246 g/o.

En **Afghanistan**, Boissier J. et O. (3) trouvent 5,51 g^o/o comme taux moyen de protéines totales mais, un taux normal de lipides totaux et de cholestérol total.

Au **Liban**, El Khazen, Naamé et Mallat (II) dosent le cholestérol total chez 750 sujets. Ils trouvent une moyenne générale de 0,241 g^o/o. Ils constatent également une variation saisonnière avec chiffres les plus bas en Juin et Juillet, puis remontée progressive à partir d'Août et d'Octobre. Cette variation saisonnière peut être attribuée au régime alimentaire estival très riche en fruits et légumes frais. Les auteurs concluent à une hypercholestérolémie ne provoquant pas une augmentation du nombre des malades artérioscléreux; Le Liban ne présentant pas de statistiques particulièrement élevées de lésions d'athérome, d'artériosclérose ni de maladie coronarienne. Les auteurs concilient ces faits en faisant jouer un rôle important au facteur héréditaire.

CONCLUSION

En Iran, 50% des sujets ont des taux en protéines totales, cholestérol total, phospholipides, inférieurs à la normale. Par contre, le rapport cholestérol / phospholipides est normal traduisant un équilibre entre le cholestérol et les phospholipides.

Ainsi, en face du rôle déjà classique, joué par les régimes riches en aliments cétogènes etc., dans l'étiologie de l'athérosclérose, il est permis d'envisager que le régime carenciel est à la base de la rareté de l'athérosclérose en Iran.

Nous pensons finalement qu'une alimentation rationnelle doit être envisagée pour la prophylaxie des maladies vasculaires.

CONCLUSION

In Iran, about 50% of the population have less than normal amount of total protein, total cholesterol and phospholipides in their

blood. On the other hand the cholesterol phospholipides ration is normal.

The present day conception of the part played by rich food and ketogenic diet in the aetiology of atherosclerosis would permit us to suggest, that the low incidence of vascular diseases in Iran is due to undernourishment. Therefore the efforts exerted towards improvement of nutrition amongst the poor should take into consideration this hypothesis; and a rational diet should be encouraged.

BIBLIOGRAPHIE

1. Anderson, J.T. et Keys, A.: Clin. Chem., 1956, 2, 145.
2. Anderson, J.T., Taylor, H.L. et Keys, A.: Fed. Proc., 1956, 15, 1763.
3. Boissier, J. et O.: Annales Biologie et Clinique, 1953, 11, 292, 302 et 396, 401 (49 références).
4. Boissier, J. et Sérafino, X.: Rev. Méd. Moyen Orient, 1953, 10, 51. 73 (74 références.)
5. Chakrabarty, M.L.: Calcutta Med. J., 1944, 41, 203.
6. Delsal, J.L.: Bull Soc. Chim. Biol. 1944, 26, 99.
7. Delsal, J.L. et Manhour, H.: Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 1041.
8. Delsal, J.L.: C.R. Acad. Sci., 1957, 244, 2252.
9. Djabe Babai, Thèse, Téhéran, 1947.
10. Eder, H.A., Russe, E.M., Pritchett, R.A.R., Wilber, M.M. et Barr, D.P.: J. Clin. Inv., 1955, 34, 1147.
11. El Khazen, P. Naamé, R. et Mallat, F.: Rev. Moyen Orient, 1957, 14, 244.
12. Fiske, C. et Subaroww, Y.J.: Biol. Chem., 1925, 66, 375.
13. Keys, A. et Al.: J. Clin. Inv., 1950, 29, 1347.
14. Hack, M.H.: Fed. Proc., 1955, 14, 222.
15. Keys, A. et Al.: Lancet, 1952, 263, 209.
16. Keys, A.: J. Gerontol, 1952, 7, 201.
17. Keys, A.: Arch. Internat. Med., 1954, 93, 328.
18. Keys, A. J. et Al.: Clin. Inv., 1956, 35, 1173.
19. Keys, A. et Anderson: J.T. Am. J. Clin. Nutrition, 1957, 5, 29.
20. Keys, A. et Al.: Fed. Proc., 1957, 16, No 875.

21. King, E.J. et Wootom, I.D.P. : Micro analysis in medical biochemistry. 1956, P. 2.
22. Leriche, R. : *Physiol. et Pathol. du tissu osseux*-Masson Edit. 1939.
23. Peters, J.P. et Man, E.B.J. : *Clin. Inv.*, 1943, 22, 707.
24. Russ, E.M., Eder, H.A. et Barr, D.P. : *Am. J. Méd.*, 1951, II, 468.
25. Melle Sabety, Y. et Sandor, G. : *Bull. Acad. Nat. Med.*, 1953, 137, 248.
26. Samyan, M. : Thèse, Téhéran, 1956.
27. Sandor, G. : *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1957, 141, 287.
28. Sérafino, X. : *Rev. Méd. Moyen Orient*, 1955, 12, 1,8.
29. Somogyi, M. : *J. Biol. Chem.*, 1930, 86, 655 et 87, 339.
30. Wootom, I.D.P. et King, E.J. : *Lancet*, 1953, 264, 470.
31. Zilversmit, D.B. et Davis, A.K. : *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, 35, 155.

A Contribution to the Study of the Association of Pulmonary Emphysema and Peptic Ulcer

A. T. NAFICI, M.D.*

The association of peptic ulcer with pulmonary emphysema was first noticed by Green and Dundree (1952). In a series of 700 consecutive autopsies in males, they found that ulcer was approximately three times as frequent in those with emphysema (19%) as in the group as a whole (6.4%).

Their report also included 72 living patients with «chronic pulmonary disease» of whom 14 (19%) had ulcer. Later, in 1955 Weber and Gregg published a well documented report upon the coincidence of benign gastric ulcer and chronic pulmonary disease. In their series of 70 patients with gastric ulcer there were 40 cases of chronic lung disease, mainly chronic obstructive emphysema.

In 1956 Lowell & al. in a special report noted the association of emphysema, peptic ulcer and smoking. Recently Latts and his associates (1956) examined the hospital records of 686 men in whom hypertrophic pulmonary emphysema had been diagnosed, and they discovered that peptic ulceration had also been demonstrated in approximately 1 in 5, and that signs and symptoms suggestive of peptic ulceration had been noted in the same member of cases. The findings were based on clinical evidence in 479 out of 586 cases, and on postmortem evidence in the remaining 107. More patients

*) Professor of Clinical Medicine, Isfahan Medical School, Isfahan, Iran.