

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA MALADIE  
ATHÉROMATEUSE

par

MM. LE PROFESSEUR S. P. AZIZI\* et  
Professeur de Clinique Médicale  
à la Faculté de Médecine de Téhéran  
Médecin de l'Hôpital Pahlavi

JEAN-LOUIS DELSAL  
Chef du Service de Biochimie  
Institut Razi,  
Hessarek

LE DOCTEUR R. SARLATY,  
ASSISTANT

ING. HAMID MANHOURI,  
ASSISTANT

---

Depuis 1935 l'un de nous a été frappé de certains faits cliniques tels que :

1) L'absence d'athérome aortique à l'autopsie des gens âgés dans les hôpitaux 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 à la période d'allaitement.

b) un état ostéomalacique surtout chez les femmes venant de l'est et du sud-est de l'Iran (Djade-Babai, 1947).

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

Ces faits nous ont paru digne d'intérêt et nous ont montré la voie que nous devons prendre pour arriver à l'étiologie de ces états pathologiques.

Entre temps nous nous sommes rendus compte que dans les pays limitrophes de l'Iran et en particulier aux Indes (Chakrabarty, 1944) et en Afghanistan certains de ces faits étaient remarqués

---

\* Mémoire présenté au 4ème Congrès International de Nutrition, Paris, 1957.

et étudiés sur une grande échelle par des savants français qui dirigeaient, à cette époque, la Faculté de Médecine de Kaboul (Boissier . et O., 1953 et Sérafino X., 1955). Ces auteurs attribuent ces états pathologiques à une manifestation carencielle 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 rareté de la maladie athéromateuse et par conséquence de la rareté des maladies vasculaires si fréquentes dans les autres pays et chez la population trop 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 des facteurs sociaux que des facteurs alimentaires.

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

Nous pensons qu'il est utile de connaître 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 s'alimente avec un kilogramme de pain et 200 grammes de fromage par jour et de temps à autre elle ajoute à son alimentation un peu de fruit et de viande maigre.

#### *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 ou le chloroforme-méthanol ou le méthylal-méthanol (†) 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 purifie seulement 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 1 ml de sérum, non hémolysé, mélangé avec 7 ml d'eau distillée, sont précipitées par 1 ml de solution à 10% de sulfate de Zinc ( $7 H_2 O$ ) et 1 ml de soude 0,5 N selon la méthode de Somogyi (29). La solution de soude est titrée contre le 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 phénolphthaléine, et 10 ml de solution de sulfate de zinc diluée avec de l'eau distillée. Les protéines sont ainsi précipitées à pH neutre. Après 15 minutes de contact on centrifuge et lave le précipité protéinique deux fois avec 5 ml 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 25 ml de solvant des lipides : nous avons utilisé le mélange de Bloor : éthanol-éther (3/1) notre stock de méthylal 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 ajustés 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 total 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 avoir celle 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 x 150 mm).

On chasse le 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 et 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 35-40 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  $d_1$  et pour le dosage une densité  $d_2$ , le taux du cholestérol total du sérum en gramme % sera de : 
$$\frac{0,15 d_2}{d_1}$$

d) *Dosage du phosphore lipidique :*

On prélève 4 ml de l'extrait lipidique chloroformique (0,4 ml de sérum) que l'on verse dans un tube pyrex de 18 x 150 mm, jaugé 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. Ceci est facile à réaliser car lorsque l'on voit les fumées dépasser la moitié du tube il suffit de boucher le tube et de le laisser refroidir pour que les fumées se condensent. On ajoute alors une goutte d'eau oxygénée à 30% (sans phosphore) et chauffe légèrement. La destruction est très rapide; cependant bien que la solution soit incolore il faut chauffer encore un peu 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 porte au bain marie bouillant 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 ml du réactif de réduction de Fiske et Subbarow (12) (Acide 1-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 x 150 mm. et effectue les lectures à 700 millimicrons au spectrophotomètre Coleman Junior 6A. Si la densité optique pour 20 gamma de phosphore est  $d_1$  et pour le dosage  $d_2$  le taux en phosphore lipidique en mg. pour 100 ml de sérum sera de :

$$\frac{5 \times d_2}{d_1}$$

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.

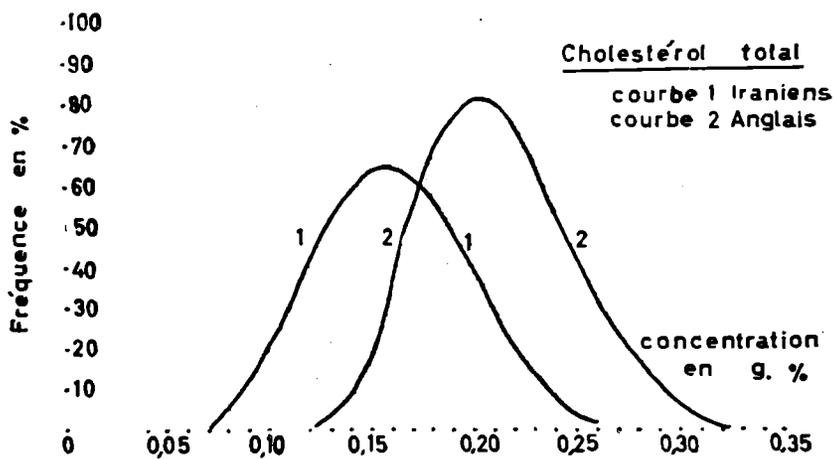
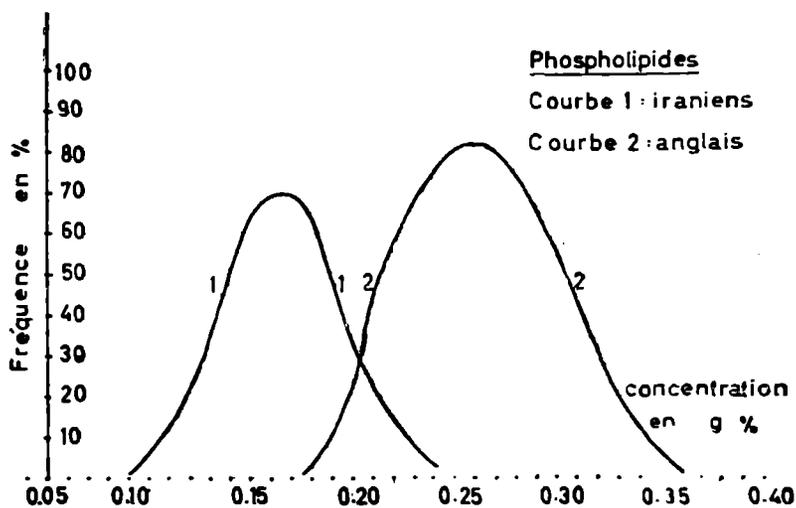
#### *Interprétation des résultats :*

Si  $M$  est la moyenne arithmétique des  $n$  sérums examinés ( $n = 96$ ),  $\Delta$  la différence entre chaque valeur individuelle et la moyenne arithmétique, la déviation standard  $\delta$  est donnée par la formule :

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n - 1}}$$

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 100 ml 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



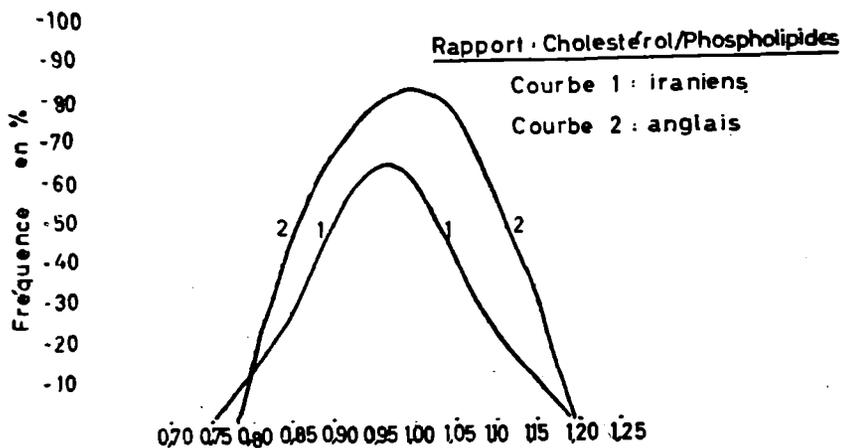
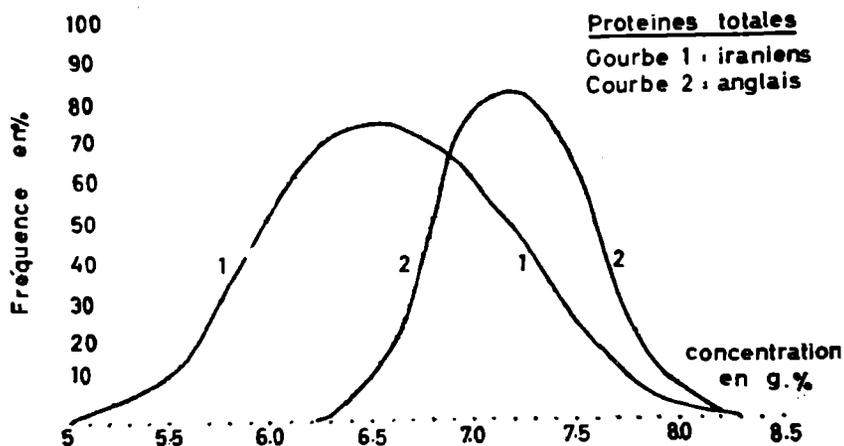


Tableau de répartition des fréquences de  $M-2\delta$  à  $M+2\delta$  :

Protéines totales	< 5,10	5,10-5,85	5,85-7,35	7,35-8,10	> 8,10
Fréquence en %	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 %	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 %	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 %	6,25	11,50	63,50	12,50	6,25

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

Fréquence en %	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 % de nos résultats avec celles de E. J. King pour les teneurs normales indiquées dans le tableau précédent nous obtenons le tableau suivant :

Selon King en %	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. % - fréquence %) des résultats normaux

anglais et des résultats iraniens nous montre 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 les méthodes analytiques employées pour nous rendre compte si elles 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 0,5 %. On peut donc affirmer que 59 % des sujets iraniens ont des teneurs en protéines totales inférieures à la normale contre 10 % seulement chez les sujets anglais.

Pour le dosage du cholestérol total notre méthode et celle de E. J. King sont comparables ; les deux méthodes effectuant le dosage sans saponification. En conclusion 52 % des sujets iraniens ont un taux de cholestérol total inférieur à la normale contre 10 % pour les sujets anglais.

Le décalage le plus important entre nos résultats et les teneurs normales est pour les phospholipides. En effet 85 % des sujets iraniens ont un taux de phospholipides inférieur à la normale contre 10 % 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. Zilversmit 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 % des 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 même chez les 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 celles d'autres pays :*

En Amérique Peters et Man (23) ont trouvé chez 300 sujets normaux 0,24 g. % de phospholipides et 0,20 g. % de cholestérol total. Russ, Eder et Barr (24) sur le plasma de 100 sujets normaux trouvent 0,25 g. % de phospholipides et 0,22 g. % de cholestérol total. Keys et al. (14) ont étudié le taux du cholestérol en fonction de l'âge du sujet et montré sa variation : 0,17 g. % à 18 ans ; 0,20 g. % à 35 ans ; 0,22 g. % à 40 ans ; 0,25 g. % 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. Mlle 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 (0,16 g. % contre 0,24-0,25 g. % en Amérique). Plus récemment G. Sandor (27) compare les lipoprotéines du sérum humain en France et Amérique. Il arrive à cette conclusion que le taux des phospholipides est sensiblement doublé en Amérique, mais par contre que le taux des glycérides est deux à trois fois plus élevé en France.

Dans une enquête faite par A. Keys et al. en Amérique, Italie, Afrique du Sud, Japon il en résulte que dans une population à régime riche en graisse le taux du cholestérol tend à s'élever avec l'âge de l'adolescence à l'âge moyen (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'augments plus.

La sous-nutrition 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 9% des calories est apporté par la graisse le taux du cholestérol est de 0,141 g. %. Par contre chez des japonais, du même âge, de Los Angeles, avec 39% de calories apportés par la graisse, le taux du cholestérol

total est de 0,246 g. %.

En *Afghanistan* Boissier J. et O. (3) trouvent 5,51 g. % comme taux moyen des protéines totales ; mais par contre un taux normal en lipides totaux et cholestérol total.

Au *Liban*, El-Khazen, Naamé et Mallat (11) dosent le cholestérol total chez 750 sujets. Ils trouvent une moyenne générale de 0,241 g. %. Ils constatent également une variation saisonnière avec chiffres les plus bas en juillet, puis en juin et remontée progressive à partir d'août et 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'artério-sclérose et de maladie coronarienne. Les auteurs concilient ces faits en faisant jouer un rôle important au facteur héréditaire.

En *Iran* l'étude statistique chez 96 sujets donne les taux moyens : protéines totales 6,60 g. % ; cholestérol total 0,160 g. % ; phospholipides 0,165 g. % ; Cholestérol / phospholipides : normal. Ces résultats sont en accord avec ceux des régimes déficients en graisse.

#### 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 céto-gènes, etc. dans l'étiologie de l'athérosclérose, il est permis, nous croyons, d'envisager que le régime carenciel est à la base de la rareté de la maladie vasculaire.

#### 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-n° 1762.
- 3 - Boissier J. et O. Annales Biologie Clinique 1953-XI-92, 302 et 396, 401 (49 références).
- 4 - Boissier J. et Sérafino X. Rev. Med. Moyen Orient 1953-X-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 Manhoury H. Bull. Soc. Chim. Biol. 1955-37-1041.
- 8 - Delsal J.-L. C. R. Acad. Sci. 1957-244-2252.
- 9 - Djade Babai - 1947 - Thèse Téhéran.
- 10 - Eder H. A., Russ 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. Med. Moyen Orient 1957-14-244.
- 12 - Fiske C. et Subbarow Y. J. Biol. Chem. 1925-66-375.
- 13 - Hack M. H. Fed. Proc. 1955-14-222.
- 14 - Keys A. et al. J. Clin. Inv. 1950-29-1347.
- 15 - Keys A. et al. Lancet 1952-263-209.
- 16 - Keys A. J. Gerontol. 1952-7-201.
- 17 - Keys A. Arch. Internal. Med. 1954-93-328.
- 18 - Keys A. et al. J. 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-n° 875.
- 21 - King E. J. et Wootton I. D. P. Micro-analysis in medical biochemistry 1956 - p. 2.
- 22 - Leriche R. 1939 - Physiol. et Pathol. du tissu osseux-Masson-Edit.
- 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. Med. 1951-XI-468.
- 25 - Mlle Sabetay Y. et Sandor G. - Bull. Acad. Nat. Med. 1953-137-248.
- 26 - Samyan M. 1956 - Thèse Téhéran.
- 27 - Sandor G. - Bull. Acad. Nat. Med. 1957-141-287.
- 28 - Sérafino X. Rev. Med. Moyen Orient 1955-12-1,8.
- 29 - Somogyi M. J. Biol. Chem. 1930-86-655 et 87-339.
- 30 - Wootton 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.