

Chap. 9

- ① Summary
state of art
- ② Summary
needs
- ③ Summary of recommendation



TRANSLATION:

Basecqz, J.-M., R. Lauwerys and J.-P. Buchet: COMPARATIVE STUDY OF VARIOUS BIOLOGICAL LEAD-EXPOSURE TESTS. (Étude comparative de divers tests biologiques d'exposition au plomb.) *Arch. Mal. Prof.*, Vol. 32, No. 6, pp. 453-463, 1971. Industrial Toxicology Unit, Catholic University of Louvain, and National Scientific Research Foundation, Brussels (Belgium).

ABSTRACT. This study confirms the validity of determining urinary δ -aminolevulinic acid for monitoring lead-exposed workers. Its correlation with urine lead is definitely superior to that of coproporphyrinuria. Stippled cell studies offer no interest. This study demonstrates, however, that significant inhibition of the globular enzyme, δ -aminolevulinic dehydratase, can occur without an elevation of the urinary δ -aminolevulinic acid level. Determination of the activity of this enzyme is therefore a very sensitive and very early test of lead exposure. Even in subjects who are not occupationally exposed to lead, enzymatic activity is a function of the amount of circulating blood. This observation confirms the role of lead as an environmental pollutant.

Although lead has been one of the most extensively studied industrial toxins, early diagnosis of lead accumulation before the appearance of clinical signs of poisoning remains a difficult problem.

Blood lead and urinary lead are generally considered as two valid indices for estimating the degree of exposure [2, 21, 22, 35], but certain technical difficulties limit their generalization for the routine monitoring of workers.

Over the last ten years, several authors [5, 14, 31] have emphasized the importance of determining the urinary concentration of δ -aminolevulinic acid (ALA) for evaluating the metabolic response of the organism. Nevertheless, stippled cell studies, in the majority of cases, still constitute the only analysis performed by industrial medical services. Some authors, however, recommend semi-quantitative evaluation of coproporphyrinuria [29].

We thought it would be of interest to conduct a comparative study of

various biological tests for monitoring lead exposure. In addition, we also carried out a detailed study of the action of lead on an erythrocyte enzyme, δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-d). Several recent studies [4, 7, 8, 18] indicate that this enzyme is readily inhibited by lead.

MATERIAL AND METHODS

I. Description of Measurement Techniques

(1) Determination of Lead in Air

Lead dust was collected on filters using a TFIA-2 Staplex High-Volume Air Sampler equipped with TFA No. 41 filters. After mineralizing the sample, lead was determined by polarography [24].

(2) Urinary lead and blood lead were determined by the dithizon colorimetric method described by Keenan et al. [19].

(3) Stippled cells were counted according to the standard Manson-Schwarz technique.

(4) The creatinine level was determined by Jaffé's method [16].

(5) Determination of Urinary Coproporphyrins

Quantitative determination of urinary coproporphyrins was performed by fluorometry according to Talman's method [32]. Donath's method [9] was used for semi-quantitative determination.

(6) Determination of Urinary δ -Aminolevulinic Acid (ALA)

This was performed according to a modification of Grabecki's method [13]. This method consists in directly complexing ALA with acetylacetone to form pyrrole, which yields a colored complex with Ehrlich's reagent. We noted that

certain urinary metabolites interfered with the development of the colorimetric reaction, and that this interference varied from one urine specimen to the other. This phenomenon therefore decreased the accuracy of readings made in reference to a standard curve. The addition of an internal ALA standard to the urine specimen enabled us to remedy this shortcoming. Three colorimetric measurements were thus performed for each urine specimen:

- (1) urine specimen treated in the standard manner according to Grabecki;
- (2) a specimen to which acetylacetone is not added (blank);
- (3) a specimen to which 20 μ g of ALA is added.

After subtracting the blank, it is easy to determine the urinary ALA concentration by a simple rule of three [proportion -- *Tr.*].

The technique is described below.

Reagents

Acetylacetone, acetate buffer (1 M, pH 4.6) containing, per liter of water, 136 g of sodium acetate $3H_2O$ and 57 ml of glacial acetic acid, and an ALA stock solution: 10 mg of ALA per 100 ml of acetate buffer; this solution is stored at 0°C out of contact with light; a standard ALA solution (20 μ g/ml) is prepared by diluting the stock solution five times with the acetate buffer; Ehrlich's reagent: 1 g of dimethylbenzaldehyde and approximately 30 ml of glacial acetic acid are placed in a 50-ml flask; 8 ml of 70% perchloric acid is then added and the remaining volume is filled with glacial acetic acid.

These last two solutions are prepared before use.

Procedure

Three tubes are prepared for each urine specimen. Tube A contains 1 ml

of urine, 0.2 ml of acetylacetone, and 5.8 ml of acetate buffer. Tube B (blank) contains 1 ml of urine and 6 ml of buffer. One milliliter of urine, 0.2 ml of acetylacetone, 1 ml of standard ALA solution, and 4.8 ml of buffer are placed in Tube C. The tubes are thoroughly shaken and placed in a water bath at 100°C for 10 minutes. After cooling, 7 ml of Ehrlich's reagent is added. The solutions are mixed again and absorbency at 555 mμ against water is read after 15 minutes. The amount of ALA expressed in μg per ml of urine is equal to:

$$\frac{DO_A - DO_B}{DO_C - DO_B} \times 20.$$

The results are then calculated in mg/g of creatinine.

We were able to demonstrate the existence of an excellent correlation between the results provided by this method and those obtained by the technique described by Mauzerall and Granick [25] (Figure 1).

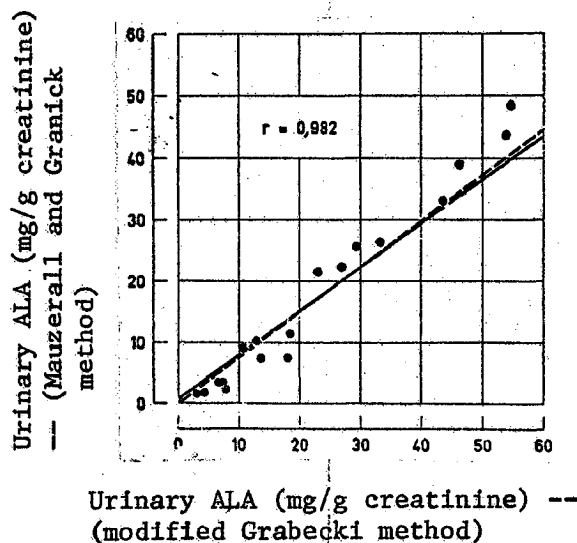


Figure 1. Determination of urinary ALA. Correlation between Mauzerall-Granick method (y) and modified Grabecki method (x).

(7) Red Blood Cell Activity of δ -ALA Dehydratase (ALA-D)

ALA-D activity was determined by colorimetric measurement of the amount of porphobilinogen formed when a preparation of hemolyzed red blood cells is incubated at 37°C for a predetermined time in the presence of ALA [4]. Blood is collected over heparin, and centrifuged at 0°C and 3,000 rpm in a Sorvall RC₂ centrifuge. After eliminating the plasma, the red blood cells are washed by redispersion in an isotonic NaCl solution at 0°C and centrifuged again. This process is repeated two times. The red blood cells are then resuspended in saline solution, in which the hematocrit is read before hemolysis of the red blood cells by 4 rapid and successive freezings and thawings. This preparation of hemolyzed red blood cells is diluted 3 or 4 times (according to whether lead-exposed subjects are involved or not) with an Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ buffer (0.05 M, pH 7) and an aliquot (generally 0.5 ml, equivalent to 0.125-0.166 ml of total blood) is incubated at 37°C for 75 minutes in the presence of 0.5 ml of an aqueous ALA solution (27 mM) and 1 ml of phosphate buffer. We then followed Bonsignore's procedure: at the end of the incubation period, 2 ml of a 10% trichloroacetic acid solution containing 0.1 M HgCl₂ is added. After centrifugation, 2 ml of supernatant is mixed with 2 ml of Ehrlich's reagent.

After 15 minutes, the absorbency of the colored solution is read at 555 mμ with the aid of a Zeiss PMQ-II spectrophotometer. A tissue blank test is performed for each analysis. It consists of the standard incubation mixture in which the substrate has been replaced by an equivalent volume of buffer. The incubation time and blood volume are selected on the basis of preliminary experiments (Figures 2 and 3) conducted to determine the conditions under which the amount of porphobilinogen formed is linearly proportional to the volume of blood and the incubation time.

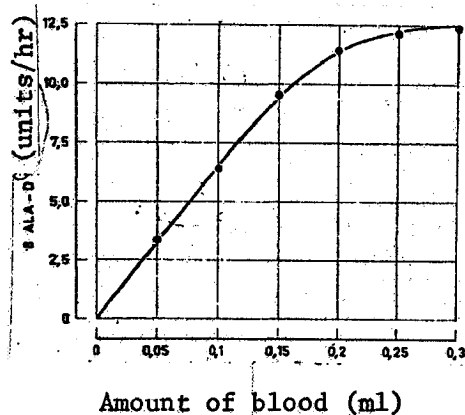


Figure 2. Influence of amount of blood on amount of porphobilinogen formed from ALA.

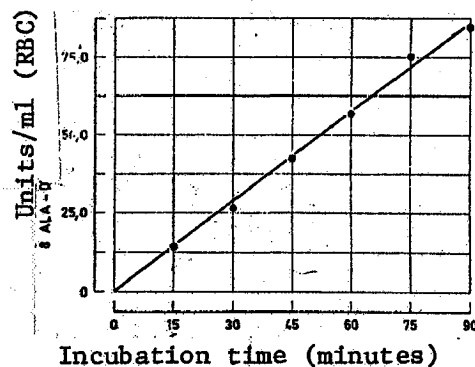


Figure 3. Influence of incubation time on amount of porphobilinogen formed from ALA (an amount of hemolyzed red blood cells equivalent to 0.125 ml of total blood was selected for this experiment).

In addition to the "conventional" method described above, enzyme activity also was determined in two samples of the same blood, one pre-incubated for 5 minutes at 60°C and the other pre-incubated for 20 minutes at 37°C in the presence of 10 mM of glutathione (GSH). Because of the considerable enzyme activation by heat and GSH, the volume of blood used was reduced respectively to 0.2 and 0.1 ml of blood diluted 3 or 4 times.

The results expressed in enzyme units per ml of red blood cells and per hour are calculated by applying the following formula:

$$\frac{(DO_{60} - DO_0) \times 1,000}{\text{hematocrit (\%)} \times \text{blood volume (ml)}}$$

where DO_{60} is the absorbency after 60 minutes of incubation and DO_0 is that of the blank.

Red blood cell ALA-D activity was measured during the 12 hours following blood sampling. Urinary coproporphyrins and ALA were determined during the 24 hours following urine collection. The urine specimens used for ALA determination were maintained acid by adding tartaric acid [34], whereas those used for coproporphyrin determination were stored under Na_2CO_3 [16]. The blood and urine samples were kept at 4°C until the moment of analysis.

II. Description of Populations

(1) Control Population

The control population consisted of 22 male subjects who had not been occupationally exposed to lead and whose age distribution was as follows: the youngest subject was 20 years old and the oldest was 53 years old. The mean and the median were identical: 33 years.

(2) Lead-Exposed Population

This population consisted of 53 workers from a storage-battery factory for whom only urine studies and stippled cell counts were performed, and 25 printing-plant workers for whom blood studies and some urine tests could be performed.

For certain technical reasons (unfresh urine, sample lost during analysis,

etc.), all the analyses anticipated were not performed for all the selected workers (see results).

RESULTS

I. Control Population

The averages and standard deviations of various parameters measured for subjects who had not been occupationally exposed to lead are presented below:

blood lead	34.1 ± 1.8 $\mu\text{g}/100$ ml of blood
	77.8 ± 4.3 $\mu\text{g}/100$ ml of red blood cells
urinary lead	35.2 ± 2.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ creatinine
urinary ALA	4.6 ± 0.3 g/g creatinine
urinary coproporphyrins	23 ± 2.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ creatinine
hematocrit	$44.5 \pm 0.5\%$
red blood cell ALA-D (standard method without activation)	59 ± 4 U/ml RBC/hour.

As was carefully pointed out by Van Houte and Cocle [33], it is more logical to express the blood lead level by the volume of red blood cells, rather than by the volume of total blood. Indeed, since more than 95% of the circulating lead is fixed to red blood cells, this form of expression accounts for hematocrit differences from subject to subject. On the other hand, we express the concentration of various urinary metabolites per gram of creatinine. A correction is then introduced for the variable degree of dilution of urine specimens collected at any time during the day. Comparison of the degree of scatter of the results expressed per volume of urine and per gram of creatinine (Figure 4) confirms the significance of this correction. This conclusion agrees with that made by Gibson [11].

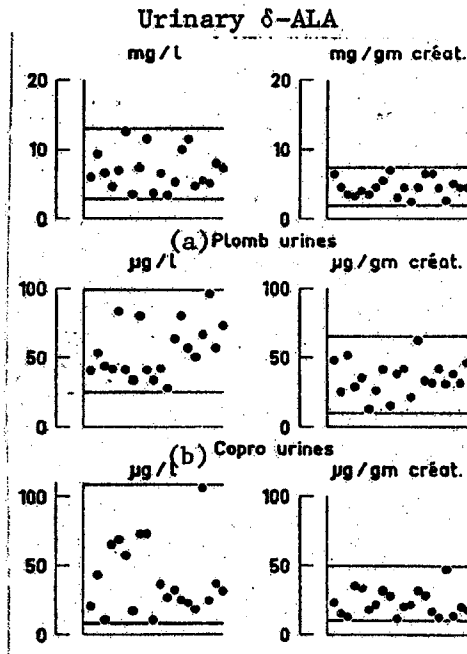


Figure 4. Comparison of urinary ALA, lead, and coproporphyrins expressed per liter of urine and per gram of urinary creatinine (control subjects). Key: (a) urinary lead; (b) urinary coproporphyrins.

II. Storage-Battery Plant Workers

The average values of the lead concentrations in the air determined monthly for three months at different working areas in the storage-battery plant are presented below:

plate stacking	0.321 mg/m ³
plate pasting and breaking	0.257 mg/m ³
soaking	0.244 mg/m ³
plate casting	0.232 mg/m ³
mixer tipping	0.125 mg/m ³
lead oxide storage	0.097 mg/m ³

Lead exposure is thus relatively considerable since 4 working areas where two-thirds of the selected workers are employed exhibit air lead levels that are above the tolerable limit (0.2 mg Pb/m^3 air, ACGIH 1969) [1].

The significance of this exposure is reflected in a distinct elevation of the average values of the various parameters of lead accumulation (Figure 5). Out of 47 blood lead levels measured, none was within normal limits ($< 50 \text{ } \mu\text{g/g creatinine}$) and 23 (50%) exceeded the permissible limit ($150 \text{ } \mu\text{g/g creatinine}$). Thirty-five out of 51 (68%) exhibited urinary ALA levels above the upper limit of the norm ($< \text{mg/g creatinine}$) and 16 subjects (31%) excreted an amount of ALA above the tolerable limit ($20 \text{ mg/g creatinine}$).

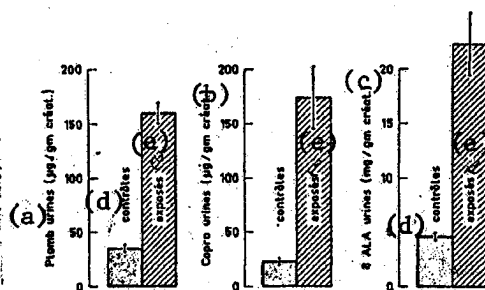


Figure 5. Comparison of urinary lead, coproporphyrins, and ALA in control subjects and storage-battery plant workers (the vertical line represents the standard deviation). Key: (a) urinary lead ($\mu\text{g/g creatinine}$); (b) urinary coproporphyrins ($\mu\text{g/g creatinine}$); (c) urinary δ -ALA (mg/g creatinine); (d) controls; (e) exposed.

Urinary coproporphyrins are abnormally increased (concentration greater than $100 \text{ } \mu\text{g/g}$ of creatinine) in 20 out of 53 selected workers (38%), but the maximum permissible value ($250 \text{ } \mu\text{g/g}$ of creatinine), however, is exceeded in only 11 subjects (21%). Finally, an elevation of stippled cells (over 4/40 fields) could be observed in only 13 subjects (25%).

We looked for the existence of a possible correlation between these various parameters and the air lead concentration. There is no significant correlation between the degree of exposure and stippled cells, ALA, and urinary coproporphylins (Figures 6, 7 and 8). The relationship between atmospheric lead and blood lead is better ($r = 0.364$), but it is not significant ($p > 0.10$) (Figure 9).

We also studied the relationship between urinary lead (which expresses the amount of absorbed lead) and the tests (ALA, coproporphyrins, stippled cells) which should, in principle, reflect the significance of metabolic alterations produced by lead (Figures 10, 11 and 12). Only the urinary ALA level exhibits a significant correlation with the urinary lead level ($p < 0.01$).

Moreover, we noted that the accuracy of the semi-quantitative method for evaluating urinary coproporphyrins was far from being excellent. Figure 13 illustrates the relationship between the results of semi-quantitative determination performed by the same person and those of a quantitative determination carried out with the same urine specimens. The transverse bar represents the average quantitative determination for each category of semi-quantitative determinations. It is noted that although these averages correspond to visual estimation, there is considerable overlapping of individual values.

III. Printing-Plant Workers

As Figure 14 indicates, the degree of lead accumulation is definitely less than that among the storage-battery plant workers.

The average blood lead level (50 $\mu\text{g}/100$ ml of blood or 115 $\mu\text{g}/100$ ml RBC), however, is above the norm (34.1 $\mu\text{g}/100$ ml of blood or 77.8 $\mu\text{g}/100$ ml RBC), but it is nevertheless within tolerable limits (70 $\mu\text{g}/100$ ml of blood or

160 $\mu\text{g}/100\text{ ml RBC}$). Urinary excretion of ALA is not significantly increased. Measurement of the activity of the globular enzyme ALA-D, however, indicates a definite reduction in enzyme activity among the exposed subjects (Figure 15) ($p < 0.01$). This inhibition is not totally irreversible. Indeed, enzyme activation by heat and glutathione permits a restoration of enzyme activity.

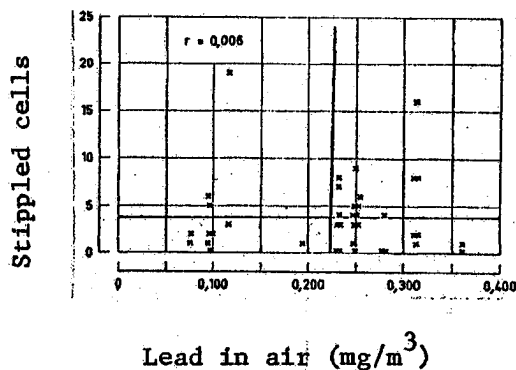


Figure 6. Correlation between number of stippled cells (per 40 fields) and air lead concentration.

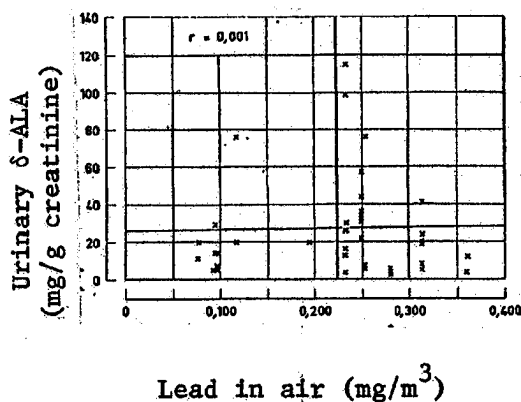
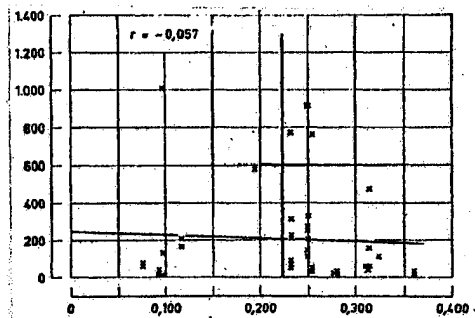


Figure 7. Correlation between urinary ALA and air lead concentration.

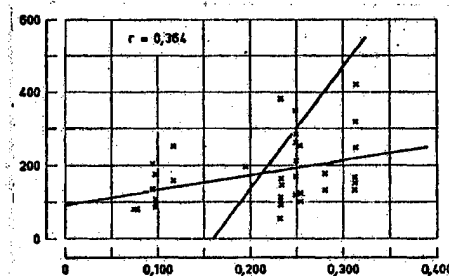
Urinary coproporphyrins
($\mu\text{g/g creatinine}$)



Lead in air (mg/m^3)

Figure 8. Correlation between coproporphyrinuria and air lead concentration.

Urinary lead
($\mu\text{g/g creatinine}$)



Lead in air (mg/m^3)

Figure 9. Correlation between urinary blood and air lead concentration.

Under these conditions, the difference between the control subjects and exposed subjects is definitely reduced. It is, however, significant ($p < 0.05$). The degree of ALA-D inhibition is proportional to blood lead. There is actually an excellent negative correlation ($r = -0.820$) between blood lead and the logarithm of enzyme activity (Figure 16). It should be emphasized that even among subjects who were not occupationally exposed to lead, enzyme activity is inversely proportional to blood lead.

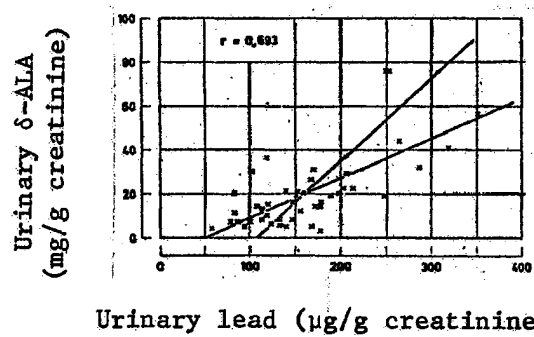


Figure 10. Correlation between urinary ALA and urinary lead.

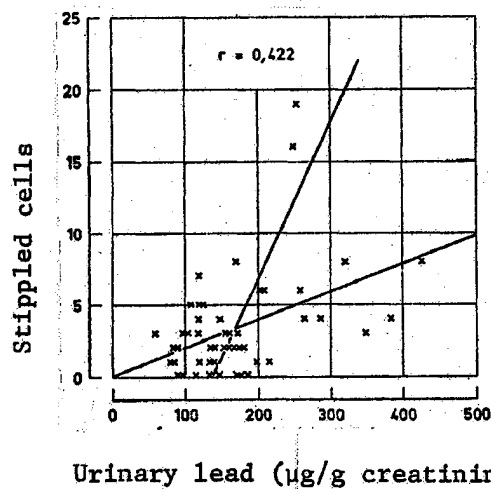


Figure 11. Correlation between number of stippled cells (per 40 fields) and urinary lead.

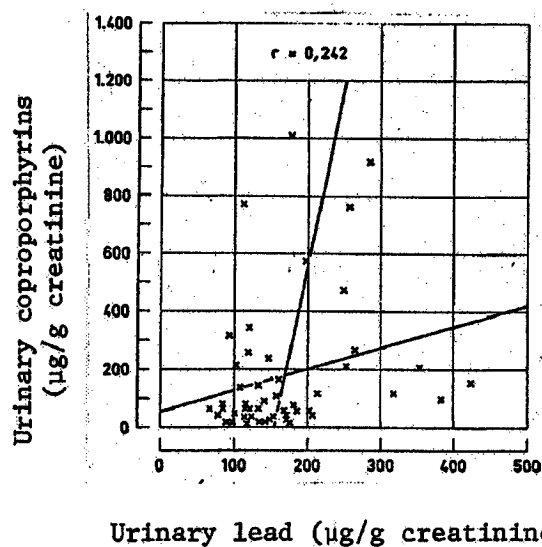


Figure 12. Correlation between coproporphyrinuria and urinary lead.

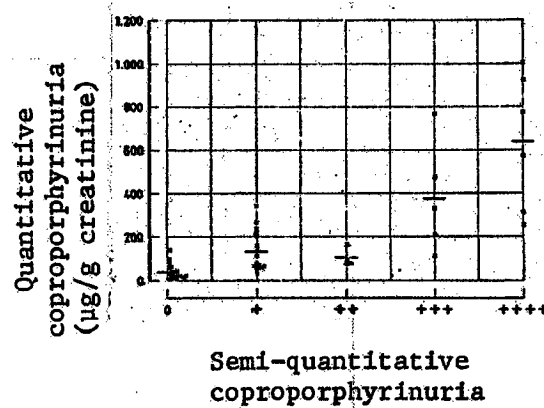


Figure 13. Correlation between quantitative and semi-quantitative determination of urinary coproporphyrins.

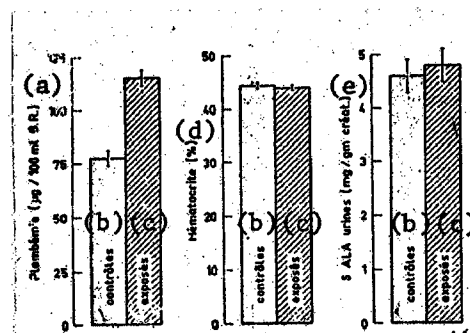


Figure 14. Comparison of blood lead, urinary ALA, and hematocrit in control subjects and printers. Key: (a) blood lead ($\mu\text{g}/100 \text{ ml RBC}$); (b) controls; (c) exposed; (d) hematocrit (%); (e) urinary δ -ALA (mg/g creatinine).

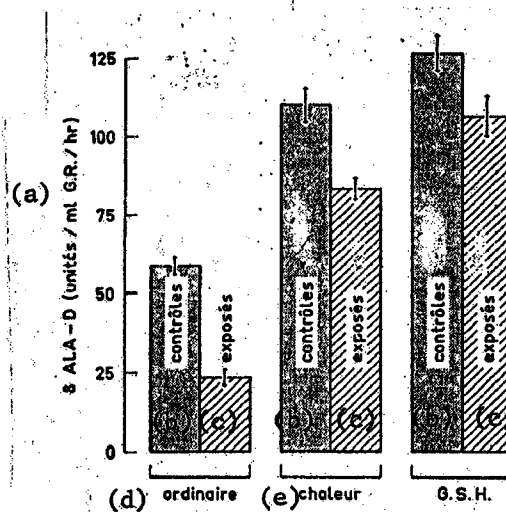


Figure 15. Comparison of ALA dehydratase activity in control subjects and printers. Key: (a) δ -ALA-D (units/ml RBC/hr); (b) controls; (c) exposed; (d) normal; (e) heat.

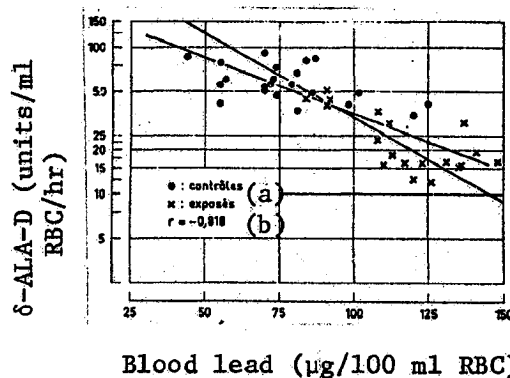


Figure 16. Correlation between blood lead (logarithmic scale) and ALA dehydratase activity. Key: (a) controls; (b) exposed.

DISCUSSION

In spite of the very strict preventive measures employed in the storage-battery plant, the toxic risk is still very considerable. It is inherent to the amount of lead handled in a form that readily releases lead dust.

The absence of a valid correlation between the air lead concentration in the working area and the various biological tests is not surprising. Indeed, during a study conducted in England among workers at a storage-battery plant, Williams [36] noted, by using individual samplers, that the exposure of workers performing the same task could vary in a 1 to 4 ratio. These variations could probably be attributed to differences in personal working habits.

In contrast to urinary excretion of ALA, coproporphyrinuria and the number of stippled cells are not a valid indication of the amount of lead absorbed. This agrees with the observations of other authors [2, 3, 6, 7, 20, 23, 33] who have emphasized the absence of specificity of these two tests and especially the lack of an early elevation in the number of stippled cells. Because of the numerous studies that confirm this conclusion, stippled cell studies for routine monitoring of lead workers should be abandoned in our opinion. The per-

formance of this insufficiently sensitive test provides a false sense of security. In Sweden, the law requires urinary ALA studies for regular monitoring of workers exposed to the risk of lead poisoning [15].

The analyses performed among the printers indicate, however, that a moderate exposure that is still insufficient for producing an exaggerated excretion of δ -aminolevulinic acid nevertheless can produce a biological alteration in the form of an inhibition of the erythrocyte enzyme, δ -ALA dehydratase. This enzyme is so sensitive to the action of lead that even subjects who are not occupationally exposed exhibit an enzyme activity that is inversely proportional to their blood lead. This observation, which confirms that made by Hernberg and Nikkanen [17], suggests that the determination of this enzyme activity perhaps may be a test that is too sensitive for monitoring lead-exposed workers.

This discovery, however, presents a significant problem: can it be concluded that individuals could be exposed to a contaminant that produces inhibition of enzyme activity even if the possible pathological consequences of this inhibition are ignored? It should be emphasized that this problem falls within the framework of industrial medicine. Lead is indeed a contaminant of our environment [12]. In addition, a toxic effect of lead among "normally exposed" individuals should not be excluded since this study demonstrates that a moderate amount of circulating lead is capable of inhibiting the synthesis of heme, i.e., a molecule that is indispensable for the production of numerous enzymes (catalase, tryptophan pyrrolase, etc.).

How can we immediately fail to conclude that these very biochemical alterations or others that are still unspecified are not reflected at the level of various organs by certain functional disorders? Some recent studies conducted

with individuals who were not occupationally exposed, and children in particular, tend to confirm the substantial foundation of such a hypothesis. Although injury to the central nervous system consecutive to acute lead poisoning in children has been known for a long time, the possible deleterious effect of low lead concentrations on brain development has been recently pointed out, specifically in reference to the observation of a slight elevation of blood lead in mentally retarded children [27, 28]. It is known, moreover, that lead can be transmitted from the mother to the fetus via the placenta and later to the child via the maternal milk [10, 30]. In addition, recent animal experiments have demonstrated that the administration of lead to lactating mothers may produce an inhibition of ALA-D in various tissues of newborn infants, including the brain.

REFERENCES

1. A.C.G.I.H.: Threshold limit values of airborne contaminants adopted by A.C.G.I.H. for 1969.
2. Albahary, C.: Porphyrin disorders in lead poisoning. *Arch. Mal. Prof.*, Vol. 25, p. 495, 1964.
3. Basin, B.: Determination of delta-aminolevulinic acid in lead poisoning. *Arch. Mat. Prof.*, Vol. 24, p. 638, 1963.
4. Bonsignore, D., P. Calissano and C. Cartasegna: A simple method for determining δ -aminolevulinic dehydratase in the blood: enzyme behavior in lead poisoning. *Med. Lavoro.*, Vol. 56, p. 199, 1965.
5. Danieli, G., M. Gadjos-Torok and A. Gadjos: A new biological test of lead poisoning: increase of urinary and plasma levels of delta-aminolevulinic acid. *Pathol. Biol.*, Vol. 9, p. 1481, 1961.
6. Davis, J. R. and S. L. Andelman: Urinary delta-aminolevulinic acid (ALA) levels in lead poisoning. *Arch. Environ. Health*, Vol. 15, p. 53, 1967.
7. De Bruin, A. and H. Hoolboom: Early signs of lead-exposure: a comparative study of laboratory tests. *Brit. J. Indust. Med.*, Vol. 24, p. 203, 1967.
8. De Bruin, A.: Effect of lead exposure on the level of delta-aminolevulinic dehydratase activity. *Med. Lavoro*, Vol. 59, p. 411, 1968.
9. Donath, W. F.: A simple portable apparatus for the semi-quantitative determination of the coproporphyrin content in urine. *Arch. Hig. Rada.*, Vol. 7, p. 77, 1956.
10. Fern, V. and S. J. Carpenter: Developmental malformations resulting from the administration of lead salts. *Exptl. Mol. Path.*, Vol. 7, p. 208, 1967.

11. Gibson, S. L. M., J. C. Mackenzie and A. Goldberg: The diagnosis of industrial lead poisoning. *Brit. J. Indust. Med.*, Vol. 25, p. 40, 1968.
12. Goldsmith, J. R. and A. C. Hexter: Respiratory exposure to lead: epidemiological and experimental dose. Response relationship. *Science*, Vol. 158, p. 132, 1967.
13. Grabecki, I., T. Haduch and H. Urbanowicz: Simple method for determining delta-aminolevulinic acid in the urine. *Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.*, Vol. 23, p. 226, 1967.
14. Haeger-Aronsen, B.: Studies on urinary excretion of delta-aminolevulinic acid and other haem precursors in lead workers and lead intoxicated rabbits. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Vol. 12, Supplement 47, 1960.
15. Haeger-Aronsen, B: Evaluation of two methods for measuring delta-aminolevulinic acid in urine. *Scand. J. Clin. Lab. Inv.*, Vol. 25, p. 19, 1970.
16. Henry, R. J.: *Clinical Chemistry -- Principles and Techniques*. Harper and Row Publishers, 1965.
17. Hernberg, S. and J. Nikkanen: Enzyme inhibition by lead under normal urban conditions. *The Lancet*, January, p. 63, 1970.
18. Hernberg, S., J. Nikkanen, G. Mellin and H. Lilius: Delta-aminolevulinic acid dehydrase as a measure of lead exposure. *Arch. Environ. Health*, Vol. 21, p. 140, 1970.
19. Keenan, R. G., D. H. Byers, B. E. Saltzman and F. L. Hyslop: The "USPHS" method for determining lead in air and in biological materials. *Amer. Indust. Hyg. Assoc. J.*, Vol. 24, p. 481, 1963.
20. Kehoe, R. A.: Industrial lead poisoning. In: *Industrial Hygiene and Toxicology*. Interscience Publishers, Vol. II, 1963, p. 941.

21. Kehoe, R. A.: Normal metabolism of lead. *Arch. Environ. Health*, Vol. 8, p. 232, 1964.
22. Kehoe, R. A.: Metabolism of lead under abnormal conditions. *Arch. Environ. Health*, Vol. 8, p. 235, 1964.
23. King, E. and A. R. Thompson: The measurement of lead absorption in industry. *Ann. Occup. Hyg.*, Vol. 3, p. 247, 1961.
24. Kolthoff, L. M. and J. J. Lingane: *Polarography*. Interscience Publishers, 2nd edition, New York.
25. Mauzeral, D. and S. Granick: The occurrence and determination of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.*, Vol. 219, p. 435, 1956.
26. Meek, S. F., T. Mooney and G. C. Harold: Urinary porphyrins in lead poisoning. *Indust. Med. Surg.*, Vol. 17, p. 469, 1948.
27. Millar, J. A., V. Battistini, R. L. C. Cumming, F. Carswell and A. Goldberg: Lead and delta-aminolevulinic acid dehydratase levels in mentally retarded children and in lead-poisoned suckling rats. *The Lancet*, October, p. 695, 1970.
28. Moncrieff, A. A., O. P. Koumides, B. E. Clayton, A. D. Patrick, A. G. C. Renwick and G. F. Roberts: Lead poisoning in children. *Arch. Dis. Childh.*, Vol. 39, p. 1, 1964.
29. Ornosky, M.: Coproporphyrinuria and urine-lead findings: fifteen years of experience. *Amer. Indust. Hyg. Assoc.*, Vol. 29, p. 228, 1968.
30. Rosenblum, W. F. and M. G. Johnson: Neuropathologic changes produced in suckling mice by adding lead to the maternal diet. *Arch. Path.*, Vol. 85, p. 640, 1968.

31. Selander, S. and K. Cramer: Interrelationship between lead in blood, lead in urine and ALA in urine during lead work. *Brit. J. Indust. Med.*, Vol. 27, p. 28, 1970.
32. Talman, E.L.: *Standard Methods of Clinical Chemistry*. Academic Press, Ed. Seligson, New York, Vol. 2, 1958, p. 137.
33. Van Houte, G. and P. Cocle: Proposal of a new, simple, and more reliable test for determining lead poisoning. *Arch. Mal. Prof.*, Vol. 30, p. 675, 1969.
34. Vincent, W. F. and W. W. Ullman: The preservation of urine specimens for delta-aminolevulinic acid determination. *Clinical Chemistry*, Vol. 16, p. 612, 1970.
35. Williams, M. K., E. King and J. Walford: Method for estimating objectively the comparative merits of biological tests of lead exposure. *Brit. Med. J.*, p. 618, 1968.
36. Williams, M. K., E. King and J. Walford: An investigation of lead absorption in an electric accumulator factory with the use of personal samplers. *Brit. J. Indust. Med.*, Vol. 26, p. 202, 1969.

ALA 1846

Étude comparative de divers tests biologiques d'exposition au plomb.

Par

J.-M. BASECQZ, R. LAUWERYS et J.-P. BUCHET (*)

(Unité de Toxicologie Industrielle, Université Catholique de Louvain,
avenue Chapelle-aux-Champs, 4, 1200 Bruxelles, Belgique.)

Bien que le plomb ait été l'un des toxiques industriels les plus étudiés, le diagnostic précoce d'une imprégnation saturnine avant l'apparition des manifestations cliniques d'intoxication reste un problème difficile.

La plombémie et la plomburie sont généralement considérées comme deux indices valables permettant d'apprécier le degré d'exposition [2, 21, 22, 35], mais certaines difficultés techniques limitent leur généralisation pour le contrôle de routine des travailleurs.

Depuis une dizaine d'années, plusieurs auteurs [5, 14, 31] ont souligné l'intérêt de la détermination de la concentration urinaire de l'acide δ -aminolévulinique (ALA) afin d'apprécier la réponse métabolique de l'organisme. Néanmoins, la recherche des hématies ponctuées constitue encore, la plupart du temps, la seule analyse pratiquée par les services médicaux du travail. Certains auteurs, toutefois, préconisent l'évaluation semi-quantitative de la coproporphyrinurie [29].

Nous avons jugé intéressant d'entreprendre une étude comparative de divers tests biologiques de contrôle d'exposition au plomb. Nous avons, en outre, étudié, de manière détaillée, l'action du plomb sur une enzyme érythrocytaire, l'acide δ -aminolévulinique déshydratase (ALA-D). Plusieurs travaux récents [4, 7, 8, 18] indiquent en effet que cette enzyme est facilement inhibée par le plomb.

Matériel et méthodes.

I. — Description des techniques de mesure. — 1) DOSAGE DU PLOMB DANS L'AIR. — Le prélèvement des poussières de plomb a été pratiqué sur filtres à l'aide d'un appareil *Staplex High Volume Air Sampler* modèle TFIA-2, muni de filtres TFA n° 41. Après minéralisation de l'échantillon, on effectua le dosage du plomb par polarographie [24].

2) LA PLOMBURIE et la PLOMBÉMIE furent déterminées par la méthode colorimétrique à la dithizone de Keenan et al. [19].

3) LA NUMÉRATION DES HÉMATIES PONCTUÉES fut pratiquée selon la technique classique de Manson-Schwarz.

4) LE TAUX DE CRÉATININE fut déterminé par la méthode de Jaffé [16].

5) DOSAGE DES COPROPORPHYRINES URINAIRES. — La recherche quantitative des coproporphyrines urinaires a été effectuée par fluorimétrie selon la méthode de Talman [32]. La méthode de Donath [9] a été utilisée pour le dosage semi-quantitatif.

(*) Chargé de Recherches, Fonds National de la Recherche Scientifique.

ARCH. MAL. PROF., 1971, 32, n° 6, Juin.

30

108-17

6) DOSAGE DE L'ACIDE δ -AMINOLÉVULINIQUE (ALA) DANS LES URINES. — Il fut réalisé selon une modification de la méthode de Grabceki [13]. Cette méthode consiste à complexer directement l'ALA avec l'acétylacétone pour former du pyrrole lequel donne un complexe coloré avec le réactif d'Ehrlich. Nous avons constaté que certains métabolites urinaux interfèrent avec le développement de la réaction colorimétrique et ce d'une manière variable d'une urine à l'autre. Ce phénomène diminuait ainsi la précision des lectures faites par référence à une courbe standard. L'addition à l'urine d'un standard interne d'ALA nous a permis de pallier cet inconvénient. Pour chaque échantillon d'urine, 3 mesures colorimétriques furent donc pratiquées :

- 1° sur un échantillon d'urine traité normalement selon Grabceki ;
- 2° sur un échantillon auquel on n'ajoute pas d'acétylacétone (blanc) ;
- 3° sur un échantillon auquel on ajoute 20 μ g d'ALA.

Après soustraction du blanc, il est aisé, par une simple règle de trois, de déterminer la concentration urinaire en ALA.

La technique est décrite ci-après.

Réactifs : acétylacétone, tampon acétate (1 M, pH 4,6) contenant par litre d'eau 136 g d'acétate de sodium CH_3COO^- et 57 ml d'acide acétique glacial, solution stock d'ALA : 10 mg d'ALA par 100 ml de tampon acétate ; cette solution est conservée à 0° C, à l'abri de la lumière, solution standard d'ALA (20 μ g/ml) préparée en diluant 5 fois la solution stock avec du tampon acétate, réactif d'Ehrlich : dans un ballon jaugé de 50 ml, on introduit 1 g de diméthylbenzaldéhyde et environ 30 ml d'acide acétique glacial ; on ajoute ensuite 8 ml d'acide perchlorique à 70 p. 100 et on porte à volume avec de l'acide acétique glacial.

Ces deux dernières solutions sont préparées avant l'emploi.

Procédé : Pour chaque échantillon d'urine, on prépare 3 tubes. Le tube A contient 1 ml d'urine, 0,2 ml d'acétylacétone et 5,8 ml de tampon acétate. Le tube B (blanc) contient 1 ml d'urine et 6 ml de tampon. Dans le tube C sont ajoutés 1 ml d'urine, 0,2 ml d'acétylacétone, 1 ml de solution standard d'ALA et 4,8 ml de tampon. Les tubes sont bien agités et placés au bain-marie à 100° C pendant 10 minutes. Après refroidissement, on ajoute 7 ml de réactif d'Ehrlich. On mélange à nouveau et après 15 mn, on lit l'absorbance à 555 m μ contre de l'eau. La quantité d'ALA exprimée en μ g/ml d'urine est égale à :

$$\frac{DO_A - DO_B}{DO_C - DO_B} \times 20.$$

Les résultats sont ensuite calculés en mg/g de créatinine.

Nous avons pu démontrer l'existence d'une excellente corrélation entre les résultats fournis par cette méthode et ceux obtenus par la technique de Mauzerall et Granick [25] (fig. 1).

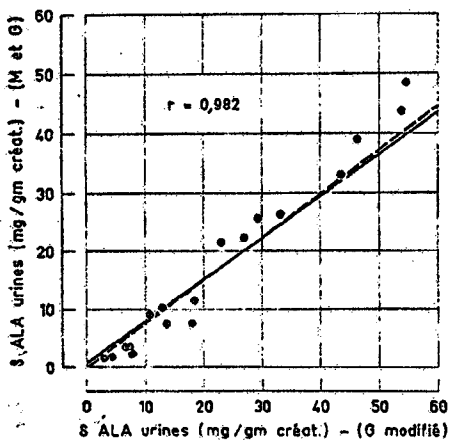


Fig. 1. — Détermination de l'ALA urinaire. Corrélation entre la méthode de Mauzerall et Granick (y) et celle de Grabceki modifiée (x).

2 ml du surnageant sont mélangés à 2 ml du réactif d'Ehrlich.

Après 15 mn, l'absorbance de la solution colorée est lue à 555 m μ à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss PMQ II. Un blanc-tissu est pratiqué pour chaque analyse. Il est constitué du mélange d'incubation

7) ACTIVITÉ DE L'ENZYME δ ALA-DEHYDRATASE (ALA-D) DES GLOBULES ROUGES. — L'activité de l'enzyme érythrocytaire ALA-D fut déterminée en mesurant colorimétriquement la quantité de porphobilinogène formée quand une préparation de globules rouges hémolysés est incubée à 37° C pendant un temps déterminé en présence d'ALA [4]. Le sang est recueilli sur héparine, centrifugé à 0° C à 3 000 t/mn dans une centrifugeuse Sorvall RC. Après élimination du plasma, les globules rouges sont lavés par redispersion dans une solution isotonique de NaCl à 0° C et centrifugés à nouveau. Ce procédé est répété deux fois. Les globules rouges sont ensuite resuspendus dans la solution saline dont on lit l'hématocrite avant l'hémolyse des globules rouges par 4 congelations et décongelations rapides successives. Cette préparation de globules rouges hémolysés est diluée 3 ou 4 fois (selon qu'il s'agit de sujets exposés au plomb ou non) avec du tampon Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , 0,05 M, pH 7 et un aliquot (en général 0,5 ml équivalent à 0,125-0,166 ml de sang total) est incubé à 37° C pendant 75 mn en présence de 0,5 ml d'une solution aqueuse d'ALA (27 mM) et de 1 ml de tampon phosphate. Nous avons ensuite suivi le procédé de Bionig et al. en terminant la période d'incubation par l'ajout de 2 ml d'une solution d'acide trichloroacétique à 10 p. 100 contenant du HgCl_2 0,1 M. Après centrifugation,

habituel dans lequel le substrat a été remplacé par un volume équivalent de tampon. La sélection du temps d'incubation et du volume de sang a été effectuée sur la base d'expériences préliminaires (fig. 2 et 3) déterminant les conditions dans lesquelles la quantité de porphobilinogène formée était linéairement proportionnelle au volume de sang et à la durée de la période d'incubation.

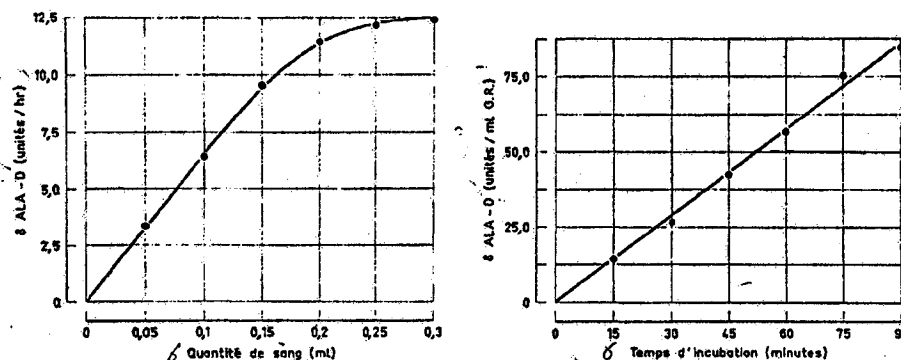


Fig. 2. — Influence de la quantité de sang sur la quantité de porphobilinogène formée à partir de l'ALA.

Fig. 3. — Influence du temps d'incubation sur la quantité de porphobilinogène formée à partir de l'ALA (une quantité de globules rouges hémolysés équivalente à 0,125 ml de sang total fut sélectionnée pour cette expérience).

En plus de la méthode « ordinaire » décrite ci-dessus, l'activité enzymatique fut aussi déterminée sur deux échantillons du même sang, l'un préincubé 5 mn à 60° C, l'autre préincubé 20 mn à 37° C en présence de glutathion (GSH) 10 mM. Vu l'importante activation de l'enzyme par la chaleur et le GSH, le volume de sang utilisé fut réduit respectivement à 0,2 et 0,1 ml de sang dilué 3 ou 4 fois.

Les résultats exprimés en unités d'enzyme par ml de globules rouges et par heure sont calculés en appliquant la formule suivante :

$$\rightarrow \frac{(DO_{60} - DO_0) \times 1.000}{\text{hématocrite (\%)} \times \text{volume sang (ml)}}$$

où DO_{60} est l'absorbance après 60 mn d'incubation et DO_0 celle du blanc.

L'activité de la ALA-D des globules rouges fut mesurée dans les 12 heures suivant la prise de sang. La détermination de l'ALA et des coproporphyrines urinaires fut pratiquée dans les 24 heures suivant la collecte des urines. Les urines servant au dosage d'ALA furent maintenues acides par addition d'acide tartrique [34], celles servant au dosage des coproporphyrines furent conservées sous Na_2CO_3 [16]. Les échantillons de sang et d'urine furent gardés à 4° C jusqu'au moment de l'analyse.

II. — Description des populations. — 1) POPULATION CONTRÔLE. — Elle comporte 22 sujets masculins non professionnellement exposés au plomb dont la distribution en fonction de l'âge est la suivante : le plus jeune a 20 ans et le plus âgé 53 ans. La moyenne et la médiane sont identiques : 33 ans.

2) POPULATION EXPOSÉE AU PLOMB. — Elle est composée de 53 ouvriers d'une usine d'accumulateurs où seuls ont pu être pratiqués les examens d'urine et la numération des hématies ponctuées et de 25 ouvriers d'une imprimerie où nous avons pu pratiquer les examens sanguins et certains tests urinaires.

Pour certaines raisons techniques (urines non fraîches, perte de l'échantillon durant l'analyse...), toutes les analyses prévues n'ont pas été pratiquées chez tous les ouvriers sélectionnés (voir résultats).

Résultats.

I. — Population témoin. — Les moyennes et erreurs standard des divers paramètres mesurés chez les sujets non professionnellement exposés au plomb sont présentés ci-dessous :

plombémie	$34,1 \pm 1,8$ $\mu\text{g}/100$ ml de sang
plomburie	$77,8 \pm 4,3$ $\mu\text{g}/100$ ml de globules rouges
ALA urinaire	$35,2 \pm 2,8$ $\mu\text{g}/\text{g}$ créatinine
coproporphyrines urinaires	$4,6 \pm 0,3$ $\mu\text{g}/\text{g}$ créatinine
hématocrite	$23 \pm 2,2$ $\mu\text{g}/\text{g}$ créatinine
ALA-D des globules rouges (méthode ordinaire sans activation)	$44,5 \pm 0,5$ %
	59 ± 4 U/ml G.R./heure.

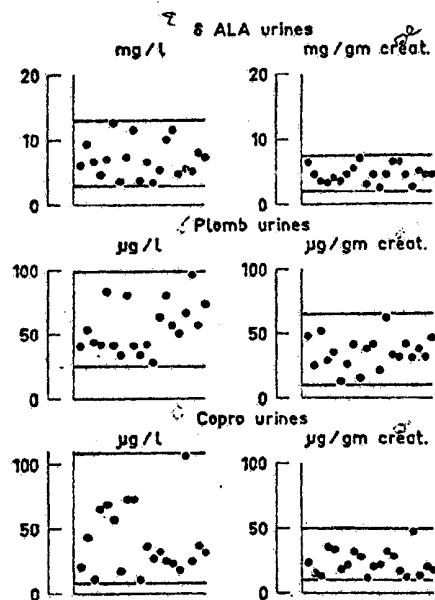


Fig. 4. — Comparaison des taux urinaires de l'ALA, de plomb et de coproporphyrines exprimés par litre d'urine et par g de créatinine urinaire (sujets contrôlés).

Ainsi que l'ont judicieusement souligné Van Houte et Cocle [33], il est plus logique d'exprimer le taux de plombémie par volume de globules rouges plutôt que par volume de sang total. En effet, comme plus de 95 p. 100 du plomb circulant sont fixés aux globules rouges, cette forme d'expression tient compte des différences d'hématocrite d'un sujet à l'autre. Nous exprimons d'autre part la concentration de divers métabolites urinaires par g de créatinine. Une correction est ainsi introduite pour le degré variable de dilution des urines recueillies à un moment quelconque de la journée. La comparaison du degré de dispersion des résultats exprimés par volume d'urine et par g de créatinine (fig. 4) confirme l'intérêt d'une telle correction. Cette conclusion rejoint celle de Gibson [11].

II. — Ouvriers de l'usine d'accumulateurs. — Les valeurs moyennes des taux de plomb dans l'air dosé mensuellement durant 3 mois à différents postes de travail de l'usine d'accumulateurs sont présentés ci-dessous :

tassage des plaques	0,321 mg/m ³
tartilage et cassage des plaques	0,257 mg/m ³
encuvage	0,244 mg/m ³
coulée des plaques	0,232 mg/m ³
bascelage des malaxeurs	0,125 mg/m ³
stockage des oxydes de plomb	0,007 mg/m ³

L'exposition au plomb est donc relativement importante puisque 4 postes de travail occupant deux-tiers des ouvriers sélectionnés présentent des taux de plomb dans l'air supérieurs à la limite tolérable (0,2 mg Pb/m³ air, A.C.G.I.H. 1969) [1].

L'importance de cette exposition se reflète dans une nette élévation des valeurs moyennes des divers paramètres d'imprégnation saturnine (fig. 5). Des 47 plomburies mesurées, aucune n'était dans les limites de la normale (< 50 µg/g créatinine) et 23 (50 p. 100) dépassaient la limite permmissible (150 µg/g créatinine). 35 sujets sur 51 (68 p. 100) présentaient des taux urinaires de l'ALA supérieurs à la limite supérieure de la normale (< 8 mg/g créatinine) et 16 sujets (31 p. 100) excrétaient une quantité d'ALA supérieure à la limite tolérable (20 mg/g créatinine).

Les coproporphyrines urinaires se trouvaient anormalement augmentées (taux supérieur à 100 µg/g de créatinine) chez 20 des 53 ouvriers sélectionnés (38 p. 100), mais la valeur maximale permmissible (250 µg/g de créatinine) n'était cependant dépassée que chez 11 sujets (21 p. 100). Enfin, une élévation des hématies à ponctuations basophiles (supérieur à 4/40 champs) ne fut observée que chez 13 sujets (25 p. 100).

Nous avons recherché l'existence d'une corrélation éventuelle entre ces divers paramètres et le taux de plomb dans l'air. Il n'existe aucune corrélation significative entre le degré d'exposition et les ponctuations basophiles, l'ALA et les coproporphyrines urinaires (fig. 6, 7 et 8). La relation entre plomb atmosphérique et plomburie est meilleur ($r = 0,364$), mais non significative ($p > 0,10$) (fig. 9).

Nous avons également étudié la relation entre le plomb urinaire (reflétant la quantité de plomb absorbée) et les tests (ALA, coproporphyrines, ponctuations basophiles) qui devraient, en principe, refléter l'importance des altérations métaboliques produites par le plomb (fig. 10, 11 et 12). Seul le taux de l'ALA urinaire présente une corrélation significative avec le taux de plomb urinaire ($p < 0,01$).

Nous avons, de plus, constaté que la précision de la méthode semi-quantitative d'évaluation des coproporphyrines urinaires était loin d'être excellente. La figure 13 illustre la relation entre les résultats du dosage semi-quantitatif pratiqué par la même personne et ceux du dosage quantitatif exécuté sur les mêmes urines. La barre transversale représente la moyenne des dosages quantitatifs pour chaque catégorie des dosages semi-quantitatifs. On constate que, si ces moyennes correspondent à l'appréciation visuelle, il existe un important chevauchement des valeurs individuelles.

III. — Ouvriers d'imprimerie. — Comme l'indique la figure 14, le degré d'imprégnation par le plomb est nettement moindre que celui des ouvriers de l'usine d'accumulateurs.

La plombémie moyenne (50 µg/100 ml sang ou 115 µg/100 ml G. R.) est cependant supérieure à la normale (34,1 µg/100 ml sang ou 77,8 µg/100 ml G.R.), mais reste néanmoins dans les limites tolérables (70 µg/100 ml sang ou 160 µg/100 ml G.R.). L'excrétion urinaire de l'ALA n'est pas significativement augmentée. Cependant, la mesure de l'activité de l'enzyme globulaire ALA-D met en évidence une nette réduction

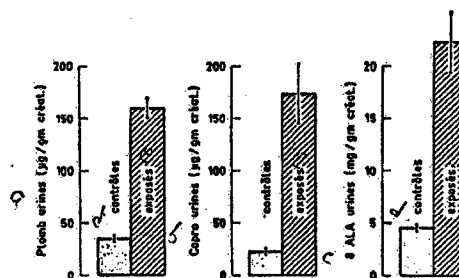
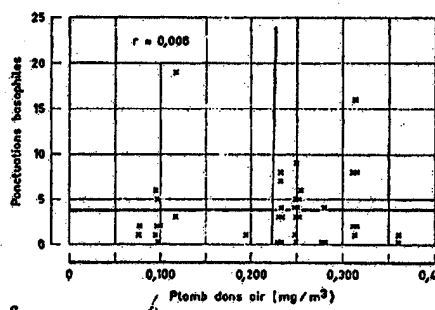
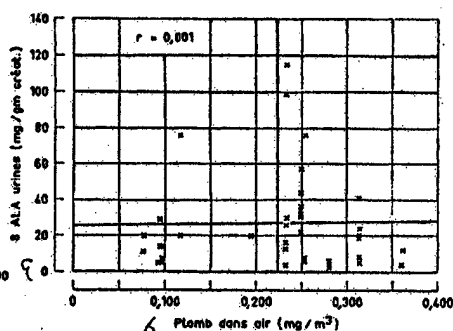


Fig. 5. — Comparaison des taux urinaires de plomb, coproporphyrines et de ALA chez les sujets contrôles et les ouvriers d'une usine d'accumulateurs (la ligne verticale représente l'erreur standard).

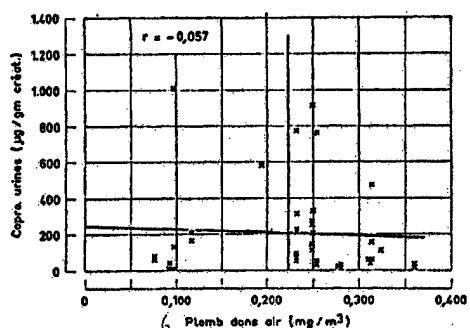


6



6

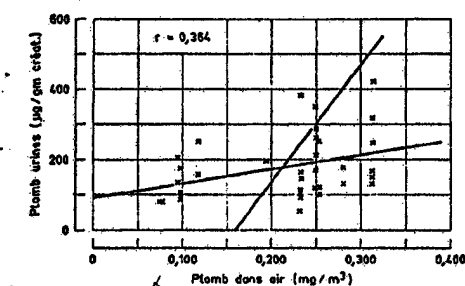
7



8

Fig. 6. — Corrélation entre le nombre d'hématies à ponctions basophiles (par 40 champs) et le taux de plomb dans l'air.

Fig. 7. — Corrélation entre l'ALA urinaire et le taux de plomb dans l'air.



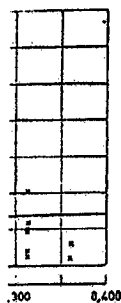
9

Fig. 8. — Corrélation entre la coproporphyrinurie et le taux de plomb dans l'air.

Fig. 9. — Corrélation entre la plomburie et le taux de plomb dans l'air.

tion de l'activité enzymatique des sujets exposés (fig. 15) ($p < 0,01$). Cette inhibition n'est pas totalement irréversible. En effet, l'activation de l'enzyme par la chaleur et le glutathion permet une restauration de l'activité enzymatique.

Dans ces conditions, la différence sujets contrôlés — sujets exposés est nettement réduite. Elle reste cependant significative ($p < 0,05$). Le degré d'inhibition de l'ALA-D est proportionnel à la plombémie. Il existe en effet une excellente corrélation négative ($r = -0,820$) entre la plombémie et le logarithme de l'activité enzymatique (fig. 16). Il importe de souligner que, même chez les sujets non professionnellement exposés au plomb, l'activité enzymatique est inversement proportionnelle à la plombémie.



7

nombre d'hé-
rophiles (par 40
mb dans l'air.

ALA urinaire
dans l'air.

coproporphyrine
dans l'air.

la plomburie
dans l'air.

ette inhibi-
me par la
ue.
nettement
ela ALA-D
ation nég-
zymatique
nnellement
à la plom-

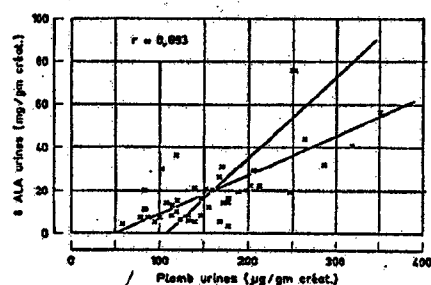


Fig. 10. — Corrélation entre l'ALA urinaire et la plomburie.

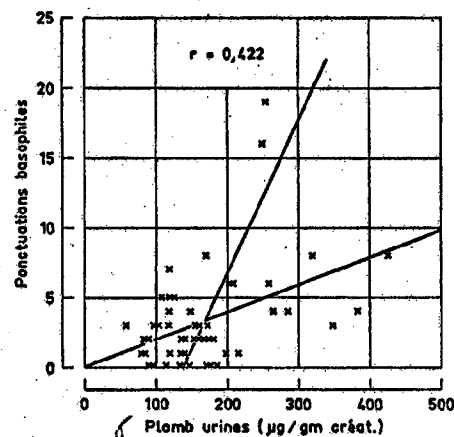
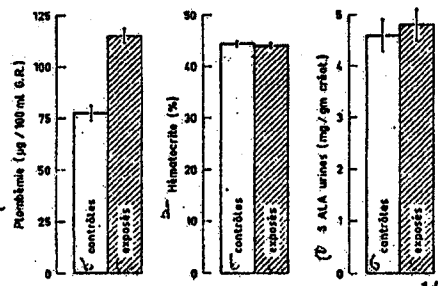
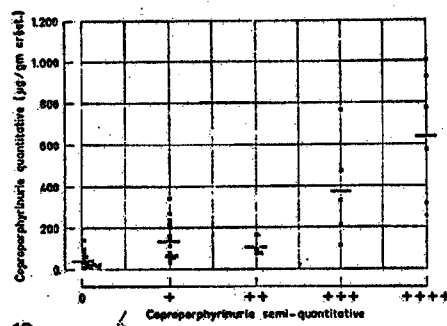
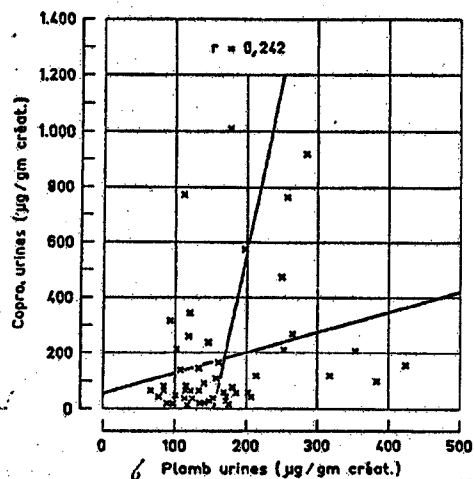


Fig. 11. — Corrélation entre le nombre d'hématies à ponctuations basophiles (par 40 champs) et la plomburie.

Fig. 12. — Corrélation entre la coproporphyrinurie et la plomburie.

Fig. 13. — Corrélation entre le dosage quantitatif et semi-quantitatif des coproporphyrines urinaires.

Fig. 14. — Comparaison de la plombémie, de l'ALA urinaire et de l'hématocrite chez les sujets contrôles et les imprimeurs.



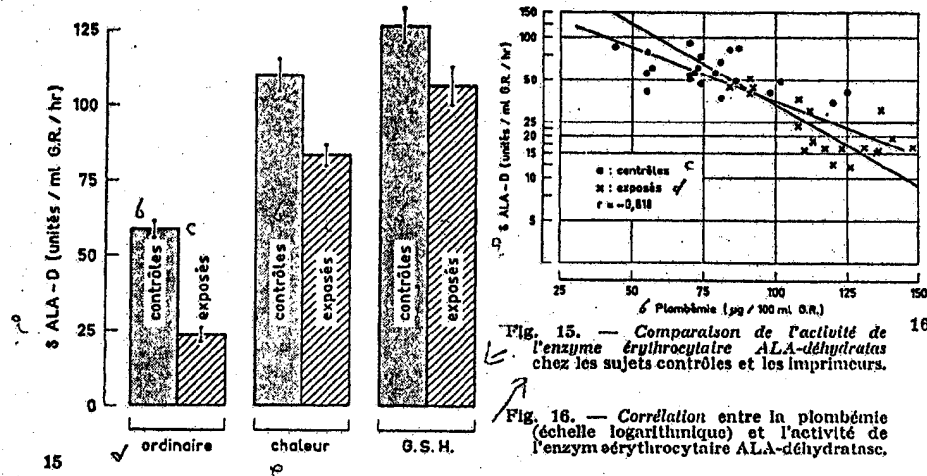


Fig. 15. — Comparaison de l'activité de l'enzyme érythrocytaire ALA-déhydratase chez les sujets contrôles et les imprimeurs.

Fig. 16. — Corrélation entre la plombémie (échelle logarithmique) et l'activité de l'enzyme érythrocytaire ALA-déhydratase.

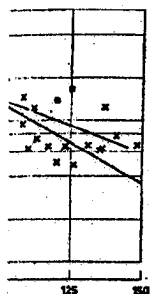
Discussion.

Malgré les mesures de prévention très rigoureuses appliquées dans l'usine d'accumulateurs, le risque toxique reste encore très important. Il est inhérent à la quantité de plomb manipulé sous une forme libérant facilement des poussières plombifères.

L'absence de corrélation valable entre la concentration de plomb dans l'air au niveau du poste de travail et les divers tests biologiques n'est pas surprenante. En effet, lors d'une étude pratiquée en Angleterre chez des ouvriers d'une usine d'accumulateurs, Williams [36] a constaté, par l'emploi d'échantillonneurs individuels, que l'exposition des ouvriers effectuant le même travail pouvait varier dans un rapport de 1 à 4. Ces variations étant probablement attribuables à des différences dans les habitudes personnelles de travail.

Contrairement à l'excrétion urinaire de l'ALA, la coproporphyrinurie et le taux d'hématies ponctuées ne sont pas un reflet valable de la quantité de plomb absorbée. Ceci rejoint les constatations d'autres auteurs [2, 3, 6, 7, 20, 23, 33] qui ont souligné l'absence de spécificité de ces 2 tests et surtout le manque de précocité de l'élévation du taux d'hématies ponctuées. Vu les nombreux travaux qui confirment cette conclusion, la recherche des hématies ponctuées pour le contrôle de routine des travailleurs du plomb devrait, à notre avis, être abandonnée. L'exécution de ce test trop peu sensible donne une fausse sécurité. En Suède, la législation exige la recherche de l'ALA urinaire pour le contrôle régulier des travailleurs exposés au risque saturnin [15].

Les analyses pratiquées chez les imprimeurs indiquent cependant qu'une exposition modérée encore insuffisante pour provoquer une excrétion exagérée d'acide δ -aminolévulinique peut néanmoins produire une altération biologique sous la forme



16
l'activité de
A-déhydratase
impriméurs.

plombémie
activité de
l'hydratase.

usine d'accu-
nt à la quan-
tières plombi-

dans l'air au
prenante. En
usine d'accu-
s individuels,
rier dans un
es différences

ie et le taux
mb absorbée.
ont souligné
de l'élévation
cette conclu-
s travailleurs
est trop peu
recherche de
risque satur-

qu'une expo-
gérée d'acide
sous la forme

d'une inhibition de l'enzyme érythrocytaire δ -ALA-déhydratase. Cette enzyme est tellement sensible à l'action du plomb que même les sujets non professionnellement exposés présentent une activité enzymatique inversement proportionnelle à leur plombémie. Cette observation, qui confirme celle de Hernberg et Nikkanen [17] suggère que la détermination de cette activité enzymatique constitue peut-être un test trop sensible pour le contrôle des travailleurs exposés au plomb.

Cette découverte pose cependant un problème important : peut-on tolérer que des individus soient exposés à un contaminant qui entraîne une inhibition d'une activité enzymatique même si on ignore encore les conséquences pathologiques éventuelles de cette inhibition ? Il faut souligner que le problème ainsi soulevé dépasse le cadre de la Médecine du travail. Le plomb est en effet un contaminant de notre environnement [12]. Aussi une action toxique du plomb chez les individus « normalement exposés » n'est pas à exclure puisque la présente étude démontre qu'une quantité modérée de plomb circulant est déjà capable d'entraver la synthèse de l'hème, molécule indispensable à l'élaboration de nombreuses enzymes (catalase, tryptophane pyrrolase...).

Comment, dès lors, ne pas émettre l'hypothèse que ces mêmes altérations biochimiques ou d'autres encore imprécisées ne se traduisent au niveau de divers organes par certains troubles fonctionnels ? Quelques études récentes pratiquées chez des personnes non professionnellement exposées, notamment des enfants, tentent de confirmer le bien fondé d'une telle hypothèse. Si l'atteinte du système nerveux central consécutive à l'intoxication saturnine infantile aiguë est connue depuis longtemps, l'influence délétère possible de faibles concentrations de plomb sur le développement du cerveau a été récemment soulevée, suite notamment à l'observation d'une légère élévation de la plombémie chez des enfants arriérés mentaux [27, 28]. On sait, en outre, que le plomb peut être transmis de la mère au fœtus via le placenta et plus tard à l'enfant via le lait maternel [10, 30]. De plus, des expériences animales récentes ont démontré que l'administration de plomb à des mères allaitantes pouvaient entraîner, chez les nouveau-nés, une inhibition de la ALA-D de divers tissus dont le cerveau.

Résumé.

Notre étude confirme la validité de la détermination de l'acide δ -aminolévulinique urinaire pour le contrôle des travailleurs exposés au plomb. Sa corrélation avec la plomburie est nettement supérieure à celle de la coproporphyrinurie. La recherche des hématies à ponctuations basophiles n'offre aucun intérêt.

Notre travail démontre cependant qu'une inhibition significative de l'enzyme globulaire acide δ -aminolévulinique déhydratase peut survenir sans élévation du taux urinaire de l'acide δ -aminolévulinique. La détermination de l'activité de cette enzyme constitue donc un test très sensible et très précoce d'exposition au plomb.

Même chez les sujets non professionnellement exposés au plomb, l'activité enzymatique est fonction de la quantité de plomb circulant. Cette observation confirme le rôle du plomb comme agent polluant de notre environnement.

Bibliographie.

- [1] A.C.G.I.H. : Threshold limit values of airborne contaminants adopted by A.C.G.I.H., for 1969.
- [2] ALBAHARY, C. : Les troubles porphyriques dans le saturnisme. *Arch. Mal. Prof.*, 1964, 25, 495.
- [3] BASIN, B. : Le dosage de l'acide delta-amino-lévéulinique dans le saturnisme. *Arch. Mal. Prof.*, 1963, 24, 638.
- [4] BONSIGNORE, D., CALISSANO, P. e CARTASEGNA, C. : Un semplice metodo per la determinazione della δ -aminolevulinico deidratasi nel sangue : comportamento dell'enzima nell'intossicazione saturnina. *Med. Lavoro*, 1965, 56, 199.
- [5] DANIELI, G., GADJOS-TOROK, M. et GADJOS, A. : Un nouveau test biologique du saturnisme : augmentation du taux urinaire et plasmatique de l'acide delta-amino-lévéulinique. *Pathol. Biol.*, 1961, 9, 1481.
- [6] DAVIS, J. R. and ANDELMAN, S. L. : Urinary delta-aminolevulinic acid (ALA) levels in lead poisoning. *Arch. Environ. Health*, 1967, 15, 53.
- [7] DE BRUIN, A. and HOOLBOOM, H. : Early signs of lead-exposure : a comparative study of laboratory tests. *Brit. J. Indust. Med.*, 1967, 24, 203.
- [8] DE BRUIN, A. : Effect of lead exposure on the level of delta-aminolevulinic dehydratase activity. *Med. Lavoro*, 1968, 59, 411.
- [9] DONATH, W. F. : A simple portable apparatus for the semi-quantitative determination of the coproporphyrin content in urine. *Arch. Hig. rada*, 1956, 7, 77.
- [10] FERN, V. and CARPENTER, S. J. : Developmental malformations resulting from the administration of lead salts. *Exptl. Mol. Path.*, 1967, 7, 208.
- [11] GIBSON, S. L.M., MACKENZIE, J. C. and GOLDBERG, A. : The diagnosis of industrial lead poisoning. *Brit. J. Indust. Med.*, 1963, 20, 40.
- [12] GOLDSMITH, J. R. and HEXTER, A. C. : Respiratory exposure to lead : epidemiological and experimental dose-response relationship. *Science*, 1967, 158, 132.
- [13] GRABECKI, J., HADUCH, T. and URBANOWICZ, H. : Die einfachen Bestimmungsmethoden der Delta-Aminolävulinäure im Harn. *Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.*, 1967, 23, 226.
- [14] HAEGER-ARONSEN, B. : Studies on urinary excretion of delta-aminolevulinic acid and oethaem precursors in lead workers and lead intoxicated rabbits. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1960, 12, suppl. 47.
- [15] HAEGER-ARONSEN, B. : Evaluation of two methods for measuring delta-aminolevulinic acid in urine. *Scand. J. Clin. Lab. Inv.*, 1970, 25, 19.
- [16] HENRY, R. J. : Clinical chemistry — Principles and Techniques, Harper and Row Publishers, 1965.
- [17] HERNBERG, S. and NIKKANEN, J. : Enzyme inhibition by lead under normal urban conditions. *The Lancet*, January 1970, 63.
- [18] HERNBERG, S., NIKKANEN, J., MELLIN, G. and LILIUS, H. : Delta-aminolevulinic acid dehydrase as a measure of lead exposure. *Arch. Environ. Health*, 1970, 21, 140.
- [19] KEENAN, R. G., BYERS, D. H., SALTZMAN, B. E. and HYSLOP, F. L. : The « USPHS » method for determining lead in air and in biological materials. *Amer. Indust. Hyg. Assoc. J.*, 1963, 24, 481.
- [20] KEHOE, R. A. : Industrial lead poisoning. In *Industrial Hygiene and Toxicology*, volume II, p. 941. Interscience Publishers, 1963.
- [21] KEHOE, R. A. : Normal metabolism of lead. *Arch. Environ. Health*, 1964, 8, 232.
- [22] KEHOE, R. A. : Metabolism of lead under abnormal conditions. *Arch. Environ. Health*, 1964, 8, 235.
- [23] KING, E. and THOMPSON, A. R. : The measurement of lead absorption in industry. *Ann. Occup. Hyg.*, 1961, 3, 247.
- [24] KOLTHOFF, L. M. and LINGANE, J. J. : Polarography, 2nd ed... Interscience Publishers Inc., New York.
- [25] MAUZERAL, D. and GRANICK, S. : The occurrence and determination of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.*, 1956, 219, 435.
- [26] MEEK, S. F., MOONEY, T. and HAROLD, G. C. : Urinary porphyrins in lead poisoning. *Indust. Med. Surg.*, 1948, 17, 469.
- [27] MILLAR, J. A., BATTISTINI, V., CUMMING, R. L. C., CARSWELL, F. and GOLDBERG, A. : Lead and delta-aminolävulinic acid dehydratase levels in mentally retarded children and in lead-poisoned suckling rats. *The Lancet*, October 1970, 695.
- [28] MONCRIEFF, A. A., KOUMIDES, O. P., CLAYTON, B. E., PATRICK, A. D., RENWICK, A. G. C. and ROBERTS, G. E. : Lead poisoning in children. *Arch. Dis. Childh.*, 1964, 39, 1.
- [29] ORNOSKY, M. : Coproporphyrinuria and urine-lead findings : fifteen years of experience. *Amer. Indust. Hyg. Assoc.*, 1968, 29, 228.
- [30] ROSENBLUM, W. F. and JOHNSON, M. G. : Neuropathologic changes produced in suckling mice by adding lead to the maternal diet. *Arch. Path.*, 1968, 85, 640.
- [31] SELANDER, S. and CRAMER, K. : Interrelationship between lead in blood, lead in urine and ALA in urine during lead work. *Brit. J. Indust. Med.*, 1970, 27, 28.
- [32] TALMAN, E. L. : Standard methods of clinical chemistry, (ed. Seligson) Academic Press, New York, 1958, vol. 2, 137.
- [33] VAN HOUTE, G. et COCLE, P. : Proposition d'un nouveau test simple plus fidèle de dépistage du saturnisme. *Arch. Mal. Prof.*, 1969, 30, 675.
- [34] VINCENT, W. F. and ULLMAN, W. W. : The preservation of urine specimens for delta-aminolevulinic acid determination. *Clinical Chemistry*, 1970, 16, 612.
- [35] WILLIAMS, M. K., KING, E. and WALFORD, J. : Method for estimating objectively the comparative merits of biological tests of lead exposure. *Brit. Med. J.*, 1968, 618.
- [36] WILLIAMS, M. K., KING, E. and WALFORD, J. : An investigation of lead absorption in an electric accumulator factory with the use of personal samplers. *Brit. J. Indust. Med.*, 1969, 26, 202.

Summary.

Comparative study of various biological lead exposure tests

by J.-M. BASECQZ, R. LAUWERYS and J.-P. BUCHET (Bruxelles, Belgique).

Our study confirms the validity of the determination of urinary δ -aminolevulinic acid for the control of lead-exposed workers. Its correlation with urine-lead is definitely superior to that of coproporphyrinuria. Stippled cells research offers no interest.

Our work shows however that a significant inhibition of the globular enzyme δ -aminolevulinic dehydratase can occur without increase in the urinary δ -aminolevulinic acid level. Therefore, the determination of the activity of this enzyme proves to be a very sensitive and very early test of lead exposure.

Even in subjects non occupationally exposed to lead, the enzyme activity depends on the amount of circulating lead. This observation confirms the part of lead as a factor of pollution.

(Arch. Mal. Prof., 1971, 32, 453-463).

G.I.I., for 1969.
1961, 25, 495.
In Mal. Prof., 1963,
La determinazione
nell'intossicazione

turnismo : augmen-
Patol. Biol., 1961,
vets in lead poison-

study of laboratory
hydratase activity.

ation of the copro-
the administration
rial lead poisoning.

logical and experi-
methoden der Delta-

61 and other haem
Invest., 1969, 12,

amino acid in urine.

publishers, 1965.
on conditions. The

acid dehydrase as

THIS is method for
J., 1963, 24, 481.
volume II, p. 841.

with, 1961, 8, 235.
Ann. Occup. Hyg.,

Inc., New York.
levulinic acid and

ang. Indust. Med.

: Lead and delta-
pol-poisoned suck-

ex, A. G. C. and

we. Amer. Indust.

suckling mice by

urine and ALA in

Press, New York,

postage du satur-

to-aminolevulinic

The comparative

on in an electric
1969, 26, 202.

[illegible]