

# Détection des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition aux substances génotoxiques de l'environnement

## *Detection of environmental carcinogens-DNA*

A. PFOHL-LESZKOWICZ (\*), G. GUILLEMAUT (\*\*), J.F. MASFARAUD (\*\*\*),  
B. RETHER (\*\*) et J.M. HAGUENOER (\*\*\*\*)

### RÉSUMÉ

De nombreux xénobiotiques ou leurs métabolites se lient de manière covalente à l'ADN et provoquent des modifications entraînant une altération de l'information génétique à l'origine de cancers. La méthode du postmarquage de l'ADN au phosphore 32 constitue un outil très performant permettant la détection et la quantification de ces adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition à diverses substances chimiques génotoxiques de l'environnement. Nous avons montré (i) qu'il était possible d'avoir une idée de l'état de pollution d'une rivière en recherchant les adduits sur l'ADN de foie de poissons ; (ii) que le dépérissement de certaines plantes était corrélé à la présence d'adduits à l'ADN provenant de la pollution par les gaz d'échappement et par des pesticides et (iii) que dans le cancer, des adduits pouvaient être détectés dans les organes cibles. Dans tous ces exemples, nous avons établi une corrélation avec le métabolisme de diverses substances.

### ABSTRACT

*It has been estimated that majority of human cancer is due to environmental factors including pollutants in air, soil, water and food, work places exposure and personal habits such as smoking. After penetration in organism, xenobiotics could be directly excreted or are biotransformed by oxidation or reduction in more hydrophilic compounds which could be conjugate and then eliminated in urine. But in some case, the biotransformation leads to electrophilic compounds which interact with macromolecules such as DNA, forming addition products named adduct.*

*The <sup>32</sup>P-postlabelling method, inspired by recent developments in the methodology for sequencing nucleic acids, is an extremely sensitive method for assessing and quantifying DNA adducts and is applicable to structurally diverse classes of chemicals.*

*In the assessment of genotoxic risks in environment, the measurement of carcinogen-DNA adducts, in aquatic system or in plants may have considerable implications.*

*In the first study, we have analysed hepatic DNA from fish living in the River Rhone downstream and upstream from a polychlorinated biphenyl incineration plant. Our results suggest that fish are exposed to genotoxic chemicals (which bind on DNA directly or after metabolic activation), with a specific contamination of the downstream site.*

*In another study, leave DNA from healthy and declining hop were analysed. As high level of heptachlor have been found in the soil where hop were declining, we search for DNA adducts. We can observed faint adduct in healthy hop and high quantity of specific adducts in declining hop. The total adduct level is 3 time higher in declining hop. A comparison between DNA adducts from several vegetal cells cultured in presence of heptachlor and DNA adduct in declining hop, confirmed the implication of heptachlor. In these examples, our data indicate the usefulness of the <sup>32</sup>P-postlabelling method to assess the contamination of the environment by genotoxic pollutants.*

*Epidemiological data suggested that increasing exposure to airborne PAH contributes to increase risk cancer in this population. Airborne levels of B(a)P were used to estimate exposure. Exposure-dependent adducts were detected in white blood cells in coke oven workers. The adduct levels is function of the level of pollutant. In the last example, we have analysed lung tissue from patient with cancer. We observed many adducts in peritumoral tissue, while few adducts could be detected in tumoral tissues.*

*In conclusion, this method is very useful to determine the genotoxicity of a substance. It give a quantitative approximation of distribution, bioactivation, detoxification and persistence of ultimate genotoxic metabolites in target tissues. The detection of covalent adducts has become increasingly important in the assessment of human exposure to carcinogens.*

*A limitation of the method is its capacity to furnish information as to the nature of adducts. Characterization of adducts has thus far depended upon chromatographic resemblance to reference adducts. The quantity of adducts conveniently obtainable from typical adduct maps is several orders of magnitude lower than the hundreds of nanograms of pure material required for even the highly sensitive mass spectroscopic techniques.*

(\*) Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSAT), Laboratoire de Toxicologie et Sécurité Alimentaire, 145, avenue de Muret, 31076 Toulouse.

(\*\*) IUT, rue de l'Argonne, 67000 Strasbourg.

(\*\*\*) CSE, 57040 Metz.

(\*\*\*\*) Institut Médecine du Travail, 59045 Lille.

L'homme et les êtres vivants en général sont soumis à de nombreux facteurs ou substances exogènes (xénobiotiques) comme les radiations ionisantes ou ultra-violettes (UV), les rejets industriels dans l'air et dans l'eau, les produits pétroliers, les fumées de tabac, les produits de pyrolyse des aliments, les mycotoxines ou les médicaments. L'exposition à des xénobiotiques peut être déterminée par la mesure des substances dans l'air ambiant ou bien par la détection de ces composés ou de leurs métabolites dans les liquides biologiques. Ces méthodes donnent des informations quant à l'exposition externe et interne mais ne renseignent en aucun cas sur les effets biologiques pouvant être à l'origine de cancers. En effet, il n'y a pas forcément de corrélation directe entre ces données et la teneur intracellulaire ou intranucléaire en cancérigène et son pourcentage de transformation en cancérigène ultime. La détection d'adduits macromoléculaires constitue une bonne méthode pour déterminer la dose de molécule réactive ayant atteint un tissu.

### Notion d'adduit

Lorsqu'un xénobiotique pénètre dans l'organisme, il est soit éliminé sous forme inchangée, soit métabolisé (ou biotransformé) par des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse suivies de réactions de conjugaisons. Dans la majorité des cas, les composés obtenus sont moins réactifs, moins toxiques et plus hydrosolubles, donc plus facilement éliminables. Néanmoins, l'oxydation de certaines substances donne des composés fortement électrophiles, capables de réagir avec les groupements nucléophiles des macromolécules biologiques que ce soit les protéines, les lipides ou les acides nucléiques [1]. Au niveau de l'acide désoxyribonucléique (ADN), le site d'attaque pré-

férentiel des cancérigènes est la guanine : l'azote en 7 est généralement modifié par les agents alkylants ( $C_2H_5$ ,  $CH_3$ ) et les mycotoxines comme l'aflatoxine ; alors que les amines aromatiques et les hydrocarbures aromatiques se fixent plutôt sur le carbone en 8 et/ou l'azote en 2 (fig. 1). Les autres bases de l'ADN peuvent être également modifiées, notamment l'azote en 1 et en 3 de l'adénine et l'oxygène en 4 de la thymine. Un nucléotide ayant fixé de manière covalente un xénobiotique (ou une partie de celui-ci) constitue ce qu'on appelle un adduit (fig. 2).

### Rôle biologique des adduits

Les adduits ont le potentiel de produire des effets biologiques néfastes, lors de la réplication du matériel génétique et ultérieurement au cours de sa traduction. Cette lésion primaire de l'ADN est une étape importante dans le phénomène d'initiation d'un cancer [2, 3]. En effet, si les adduits ne sont pas (ou mal) éliminés par les systèmes de réparation des cellules, l'information génétique va être modifiée, ceci pouvant conduire à des mutations au niveau des gènes ou oncogènes, à l'origine de développement de tumeurs.

### Etape technique du postmarquage de l'ADN au phosphore 32

La détection d'adduits par la méthode du postmarquage au phosphore 32 constitue une méthode extrêmement sensible et très fine pour déterminer le pouvoir génotoxique d'une substance. Elle a le triple avantage de ne pas nécessiter l'utilisation de cancérigène radioactif, de pouvoir être utilisée en épidémiologie et de permettre la détection de 1 adduit par  $10^{10}$  nucléotides (soit 1 adduit par génome) [4, 5].

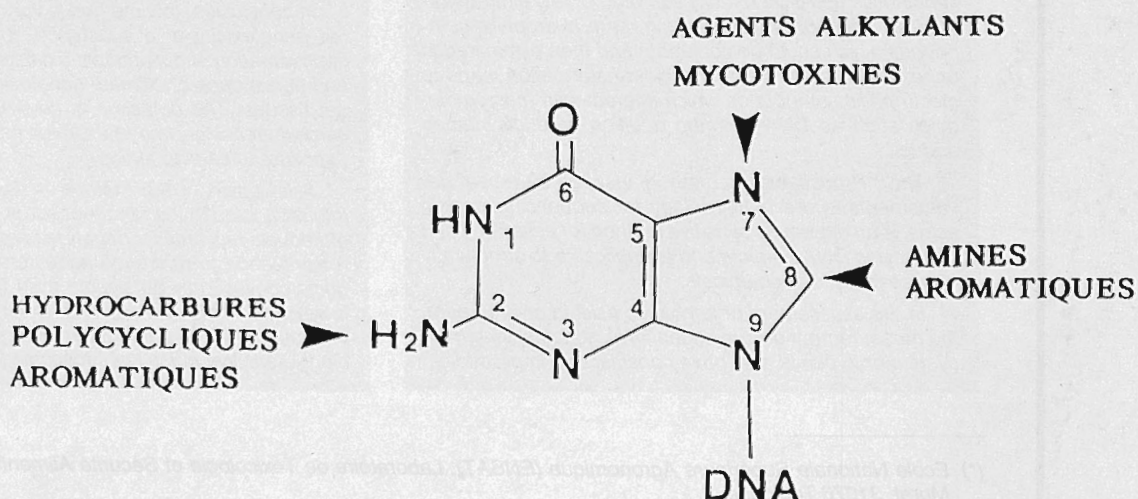


Figure 1.  
Site préférentiel de fixation de cancérigènes sur la guanine

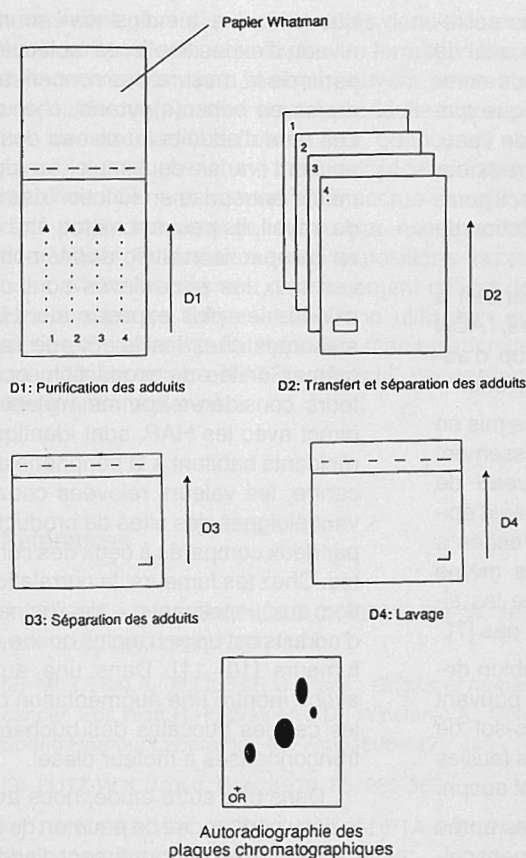


Figure 2.  
Séparation des adduits par chromatographies successives

L'ADN purifié susceptible de contenir des adduits est hydrolysé enzymatiquement par l'action conjuguée de la nucléase de staphylocoque et la phosphodiesterase de rate. Cette hydrolyse génère des 3'phosphodésoxynucléotides dNp, dXp, dYp (N correspondant à l'adénine, la guanine, la thymine, la cytosine, et la 5 méthylcytosine ; X et Y étant les bases modifiées).

Pour augmenter la sensibilité de détection, une étape d'enrichissement en adduits est introduite avant le marquage proprement dit. Celle-ci peut s'effectuer de 3 manières différentes (i) par une extraction par le butanol qui va extraire uniquement les adduits du fait de leur hydrophobicité (ii) par séparation en phase inverse sur chromatographie liquide haute performance (CLHP) où les adduits sont élués par un gradient linéaire en méthanol (iii) par action de la nucléase P1 : cet enzyme déphosphoryle les 3'-phosphoester au niveau des nucléotides normaux, mais pas au niveau des nucléotides modifiés. En effet, les grosses molécules fixées de manière covalente à l'ADN, du fait de l'encombrement stérique qu'elles engendrent, protègent cette liaison.

Seuls les 3'-phosphonucléotides sont substrats de la polynucléotide kinase qui transfère enzymatiquement le phosphate radioactif à partir du g ATP à la position 5' des nucléotides pour former des 3',5'-diphospho-nucléotides.

Les nucléotides marqués sont séparés par plusieurs chromatographies successives en couche mince de polyéthylène imine cellulose, en utilisant des solvants de migration contenant de forte concentration en urée afin de permettre la migration des adduits hydrophobes. Les adduits sont visualisés sur des films par des taches noires. Cette empreinte sert à les localiser sur la plaque de PEI cellulose et à les quantifier par récupération de la PEI cellulose (fig. 3).

## Applications

### Impact de la pollution sur la faune et la flore

Dans le but d'estimer la pollution du Rhône par des agents chimiques génotoxiques en amont et en aval d'une usine d'incinération de polychlorobiphényles, les adduits sur l'ADN de foie de poissons mâles et femelles vivants dans cette rivière ont été recherchés [6]. L'analyse des profils permet d'observer, quelle que soit la station de prélèvement,

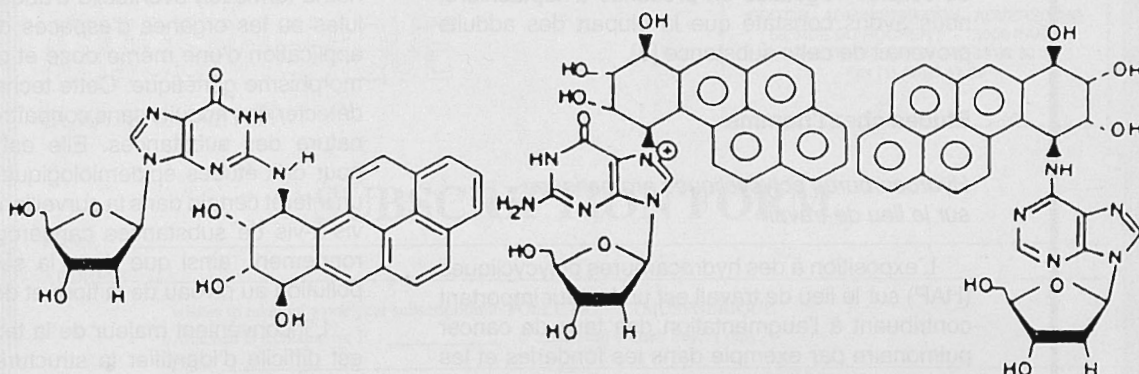


Fig. 3.  
Exemples d'adduits dus au benzo(a)pyrène

l'existence d'adduits. Néanmoins, certains se retrouvent exclusivement dans la station en aval de l'usine d'incinération. Le fait de retrouver de nombreux adduits dans les deux endroits indique que l'usine n'est pas le seul facteur polluant de l'eau. Par ailleurs, le poisson étant en tant que prédateur au bout de la chaîne alimentaire aquatique, il pourrait y avoir un phénomène de bioaccumulation de polluants divers.

Une étude le long du littoral méditerranéen a montré que dans les zones les plus polluées, l'ADN des foies de poissons contenait beaucoup d'adduits dont certains sont dus au benzo(a)pyrène.

Dans le même ordre d'idée, nous avons mis en évidence une corrélation entre le dépérissement forestier et l'apparition d'adduits au niveau de l'ADN de plante. L'étude de l'ADN d'aiguilles d'épicéa dans les forêts dépérissantes des Vosges a révélé la présence de nombreux adduits même dans les aiguilles encore vertes alors que les aiguilles des arbres sains n'en présentaient pas [7].

De même, l'analyse de feuilles de houblon dépérissant a montré de nombreux adduits pouvant être corrélés à l'existence dans le sous-sol de résidu époxyde d'héptachlore alors que les feuilles de houblon sain n'en présentent quasiment aucun.

Des cultures de houblon ont été établies après remembrement sur des terrains anciennement cultivés en betteraves sucrières. Ces dernières avaient été traitées pendant plusieurs années par un insecticide : l'héptachlore (produit interdit en France depuis 1969). Des symptômes de dépérissement du houblon sont rapidement apparus après 6 semaines de culture (phénomène de chlorose). Des analyses ont montré la présence d'héptachlore et de résidus époxydes en quantité importante et suffisante pour le suspecter du dépérissement. De ce fait, connaissant le rôle des époxydes, qui par leur forte réactivité contribuent à la formation d'adduits avec l'ADN, nous pensions qu'il pouvait être intéressant de vérifier si l'ADN des feuilles de houblon dépérissant possédait des adduits. Nous avons montré l'existence d'un grand nombre d'adduits dans les houblons dépérissants. Par comparaison avec des adduits obtenus en culture de cellules végétales en présence d'héptachlore, nous avons constaté que la plupart des adduits provenait de cette substance [8].

### Etudes chez l'homme

#### *Hydrocarbures polycycliques aromatiques sur le lieu de travail*

L'exposition à des hydrocarbures polycycliques (HAP) sur le lieu de travail est un facteur important contribuant à l'augmentation des taux de cancer pulmonaire par exemple dans les fonderies et les cokeries [9]. L'étude d'adduits à l'ADN dans les globules blancs de travailleurs a montré un taux significativement plus élevé d'adduits aromatiques

que chez les témoins non soumis au HAP. Le niveau d'exposition à ces molécules a été obtenu à partir de la mesure des concentrations atmosphériques en benzo(a)pyrène, chef de file des HAP. Les taux d'adduits au niveau des globules blancs peuvent varier du simple au double dans une même entreprise en fonction des différents postes de travail. Ils peuvent même être multipliés par 50 en comparaison avec des témoins non exposés. Les taux les plus élevés sont obtenus pour les salariés les plus exposés aux HAP. Les valeurs mesurées chez les agents de fabrication de ces mêmes unités de production, occupant des secteurs considérés comme n'étant pas en contact direct avec les HAP, sont identiques à celles des résidents habitant à la périphérie des cokeries. Par contre, les valeurs relevées chez les témoins vivant éloignés des sites de production, sont divisés par deux comparés à ceux des cohortes précédentes. Chez les fumeurs, la corrélation entre l'exposition aux « polluants » de l'usine et la présence d'adduits est un peu moins bonne que chez les non fumeurs [10, 11]. Dans une autre étude, nous avons montré une augmentation des adduits dans les cellules buccales des bûcherons utilisant des tronçonneuses à moteur diesel.

Dans une autre étude, nous avons montré que le tissu péri-tumoral de poumon de fumeur atteint de cancer contient énormément d'adduits, alors que la zone tumorale n'en contient presque plus. Il existe une corrélation entre la présence d'adduits dans ces tissus et la prolifération cellulaire.

### Intérêt et limites

En conclusion, cette méthode d'analyse est une méthode très sensible de détection d'adduits potentiellement cancérogènes. Elle permet la détection de quantité infime d'adduits (1 adduit par génome) avec seulement quelques microgrammes d'ADN. Ces études des liaisons à l'ADN peuvent compléter les dosages utilisés communément en toxicologie expérimentale pour prévoir le potentiel génotoxique d'une substance. De telles études peuvent être particulièrement utiles pour déterminer la formation éventuelle d'adduits dans les cellules ou les organes d'espèces différentes après application d'une même dose et d'étudier le polymorphisme génétique. Cette technique permet de détecter des adduits sans connaître au préalable la nature des substances. Elle est donc utilisable pour des études épidémiologiques. Elle présente un intérêt certain dans la surveillance des individus vis-à-vis de substances cancérogènes de l'environnement, ainsi que dans la surveillance de la pollution au niveau de la flore et de la faune.

L'inconvénient majeur de la technique est qu'il est difficile d'identifier la structure chimique d'un adduit inconnu. Les quantités infinitésimales ne permettent pas une analyse par spectre de masse par exemple. Néanmoins, comme le ou les pol-

luants sont généralement identifiés dans l'air ambiant ou dans le sol, des études de formation d'adduits provoqués chez l'animal peuvent permettre une étude comparative entre les adduits obtenus. Les niveaux d'adduits doivent être, quand cela est possible, évalués sur une base individuelle dans le but d'identifier une susceptibilité accrue en raison d'un polymorphisme génétique par exemple, ou pour attirer l'attention sur des expositions inconnues. Malheureusement, le maniement délicat de la technique en limite un peu son utilisation en routine. En effet, elle fait appel à la manipulation de quantité importante d'ATP radioactif, nécessitant une grande vigilance.

### Références

- [1] PARKES D.V., IOANNIDES C., LEWIS D.F.W. *Human toxicology*, 1988, 7, 397-404.
- [2] MILLER J.A., MILLER E.C., dans : *Origins of human cancer*. Eds Hiatt H.H., Watson J.D., Winsten J.A., Cold Spring Harbour Laboratory, 1977, pp. 605-627.
- [3] LUTZ W.K. *Mutat. Res.*, 1979, 65, 289-365.
- [4] RANDERATH K., REDDY M.V., GUPTA R.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 6126-6129.

[5] REDDY M.V., RANDERATH K. *Carcinogenesis*, 1986, 7, 1543-1551.

[6] PFOHL-LESZKOWICZ A., WEBER-LOTFI F., MAS-FARAUD J.F., DEVAUX A., LAOUEDJ A., GUILLEMAUT P., MALAVEILLE C., RETHER B., MONOD G., DIRHEIMER G. *Postlabelling Methods for detection of DNA adducts*, Eds Phillips D.H., Castegnaro M. et Bartsch H., IARC, 1993, 124, 373-378.

[7] WEBER-LOTFI F., PFOHL-LESZKOWICZ A., KEITH G., PILLAY D.N., DIETRICH A., RETHER B., GUILLEMAUT P. *Plant Sciences*, 1992, 86, 13-19.

[8] LAOUEDJ A., SCHENK C., PFOHL-LESZKOWICZ A., KEITH G., GUILLEMAUT P., RETHER B. *Environmental Pollution*, 1994, sous presse.

[9] ØVREBØ S., HAUGEN A., PHILLIPS D.H., HEWER A. *Cancer Res.*, 1992, 52, 1510-1514.

[10] DESCHAMPS F., PFOHL-LESZKOWICZ A., TRENQUE T. *Presse Médicale*, 1994.

[11] MARZIN D., PFOHL-LESZKOWICZ A., KLEIN F., HAGUENOER J.M. *Proceeding of International Congress of Mutagenesis*, Juin 1995.

### Mots-clés

*DNA-adducts, biomarkers, P 32 postlabelling, environmental pollutants.*

## POLLUTION ATMOSPHERIQUE

is the publication of the French Association for Air Pollution Prevention (APPA) and the only French journal dedicated to air pollution. The papers of all the principal researches in the field are published in its pages.

Wishing to interest readers who do not speak French, titles, summaries and captions of tables and figures will now also be published in English. Results of air quality research contracts managed by the Ministry of Environment will also be published in English.

The journal is available to specialists from other countries to release the results of their work to the French speaking community. Authors should send their papers, drafted either in English or in French, to the Managing Editor, who will submit them to the Editorial Committee. If selected, they will be published in French and English. The journal will take care of translation.

POLLUTION  
ATMOSPHERIQUE

QUARTERLY REVIEW

EDITOR - ADMINISTRATION - ADVERTISING  
58, RUE DU ROCHER F. - 75008 PARIS  
Tél. (1) 42 93 62 07 - 42 93 69 30  
Fax (1) 42 93 41 99

## SUBSCRIPTION FORM

NAME : \_\_\_\_\_

ADDRESS : \_\_\_\_\_

wishes to take out a one year subscription to POLLUTION ATMOSPHERIQUE.

Attached is a cheque for F. : \_\_\_\_\_ (Payment in French Francs only).

Date \_\_\_\_\_

Subscription 1996 (4 issues) = 680 F.F. Signature \_\_\_\_\_

For the Union European Enterprises, please to indicate your VAT number.

# CITEPA

CENTRE INTERPROFESSIONNEL TECHNIQUE D'ÉTUDES DE LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE

## JOURNÉE D'ÉTUDES DU CITEPA MARDI 21 NOVEMBRE 1995

UNION INTERNATIONALE DES CHEMINS DE FER

16, rue Joan Rey, 75015 PARIS

avec la participation de

L'ASSOCIATION POUR LA PRÉVENTION DE LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE

58, rue du Rocher, 75008 PARIS

### MÉTAUX LOURDS ET COMPOSÉS ORGANIQUES PERSISTANTS

Ces polluants n'ont pas beaucoup fait parler d'eux, du moins en France. Ils préoccupent sérieusement les pays Scandinaves, et la Commission pour l'Europe des Nations-Unies envisage un protocole à leur sujet dans le cadre de la Convention de Genève 1979. La Commission Européenne suit avec grand intérêt les travaux de Genève.

Le terme de « métaux toxiques » serait plus exact. De même les composés Organiques sont dit persistants, car ils ont une longue durée de vie dans le milieu naturel, ressemblant en cela aux métaux lourds.

Cette journée CITEPA sera pour certains participants une « initiation » à ce qui fait partie des polluants « de demain ». Tous les aspects de ces questions seront traités, notamment les définitions, les aspects toxicologiques, les aspects analytiques, les graves problèmes de dépôts et de transport à distance. Tous ces sujets seront traités par des scientifiques de haut niveau. L'industrie française n'est pas restée inerte devant ces problèmes et des industriels décriront des exemples de réduction des émissions et de récupération-valorisation des métaux lourds.

Enfin, les stratégies des Nations-Unies et les projets français seront décrits.

Nous pensons que cette journée CITEPA fera un point complet et précis de ces importantes questions.

## PROGRAMME

*Une traduction simultanée Anglais/Français et Français/Anglais est prévue pour l'après-midi*

8 h 15 - 9 h 00	Accueil des Participants	
9 h 00 - 9 h 10	Programme de la journée	<b>M. R. LEYGONIE</b> - Président du CITEPA

PRÉSIDENCE DE LA MATINÉE : **Monsieur DEFRANCE** (Directeur de la DEPPR)

9 h 10 - 9 h 25	Définitions - Sources - Contexte international	<b>R. BOUSCAREN</b> (CITEPA)
9 h 25 - 9 h 45	Transformation physique - Nucléation - Condensation - Enrichissement	<b>Prof. A. RENOUX</b> (Université Paris XII)
9 h 45 - 10 h 05	Spéciation chimique des métaux lourds	<b>Prof. SOULEAU</b> (Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry)
10 h 05 - 10 h 25	Technique d'échantillonnage, de prélèvement et d'analyse des émissions	<b>MM. Y. LERQUIER, P. MASNIÈRE, R. GROS-BONNIVARD</b> (EDF-DER-Département Environnement)
10 h 25 - 10 h 40	<b>Discussion</b>	
10 h 40 - 11 h 10	<b>Pause</b>	

11 h 10 - 11 h 30	Concentrations et dépôts à l'échelle locale (Région Parisienne)	<b>M. A. PERSON</b> (Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris)
11 h 30 - 12 h 10	Concentrations et Dépôts à l'échelle régionale et globale Pour les Métaux Lourds  Pour les Composés Organiques Persistants	<b>Prof. M. LEGRAND</b> (Laboratoire de Glaciologie et géophysique de l'Environnement) <b>Prof. M. MASCLET</b> (ESIGEC- Laboratoire de Chimie Atmosphérique)
12 h 10 - 12 h 20	<b>Discussion</b>	
12 h 20 - 13 h 50	<b>Déjeuner</b>	

PRÉSIDENCE DE L'APRÈS-MIDI : **Monsieur A. COLIN** (CNPFF)

13 h 50 - 14 h 30	Toxicité - Effets sur la santé Pour les Métaux Lourds  Pour les Composés Organiques Persistants, dioxines et furannes	<b>Prof. A. VIALA</b> (Laboratoire de toxicologie, Faculté de Pharmacie de Marseille), Président délégué du Comité Marseille-Provence de l'APPA <b>Dr W. DAB</b> (EDF-GDF/Service des Etudes Médicales)
14 h 30 - 14 h 45	<b>Discussion</b>	
14 h 45 - 15 h 25	Problématique Métaux Lourds/Composés Organiques Persistants en Suède	<b>M. L. LINDAU</b> (SEPA Swedish Environmental Protection Agency)
15 h 25 - 15 h 45	<b>Discussion</b>	
15 h 45 - 16 h 15	<b>Pause</b>	
16 h 15 - 17 h 05	Exemples de réduction des émissions : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Transformation du cuivre</li> <li>• Réduction des émissions de mercure lors de la fabrication du chlore par électrolyse</li> <li>• Emission de HAP on cokeries</li> <li>• Expérience de valorisation des métaux lourds en Usine d'incinération de déchets urbains</li> <li>• Recyclage des métaux non ferreux</li> </ul>	<b>M. Y. TRILLARD</b> (TRÉFIMÉTAUX) <b>M. M. MONZAIN</b> (Syndicat des Halogènes et Dérivés) <b>M. L. SOWA</b> (LECES) (Environnement) <b>M. C. FINET</b> (Conseiller scientifique à la Société TIRU S.A.) <b>M. FERQUEL</b> (METALEUROP S.A.)
17 h 05 - 17 h 25	Stratégie des Nations Unies (CEE) pour réduire les émissions de Métaux Lourds et de Composés Organiques Persistants dans l'Atmosphère	<b>M. H. WUESTER</b> (UNECE, Environment and Human Settlements Division - Economic Commission for EUROPE)
17 h 25 - 17 h 45	Stratégie et projets réglementaires en France	<b>M. Ph. LEDENVIC</b> (DEPPR)
17 h 45 - 18 h 00	<b>Discussion</b>	

Une intervention du Ministre de l'Environnement, Madame Corinne LEPAGE, est possible dans le courant de la journée.

Renseignements & Inscriptions	Lieu de la journée
CITEPA 3, rue Henri-Heine 75016 PARIS Tél. : (1) 44 30 41 90 - Fax : (1) 45 27 31 32	UNION INTERNATIONALE DES CHEMINS DE FER 16, rue Jean-Rey 75015 PARIS Tél. : (1) 44 49 20 20 - Fax : (1) 44 49 22 39