

AVIS
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

**relatif à « l'impact éventuel d'eau contaminée par la N-nitrosomorpholine (NMOR)
sur la qualité sanitaire de certains produits agricoles »**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 23 juillet 2012 par la direction générale de l'Alimentation (DGAI), la direction générale de la Prévention des Risques (DGPR) et la direction générale de la Santé (DGS) d'une demande d'avis relatif à la contamination de l'eau par la N-nitrosomorpholine (NMOR) et son impact éventuel sur la qualité sanitaire de certains produits agricoles.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Dans le cadre de la campagne nationale d'analyse des eaux destinées à la consommation humaine menée par le laboratoire d'hydrologie de Nancy (LHN) de l'Anses à la demande de la DGS, une pollution en N-nitrosomorpholine (NMOR) a été mise en évidence dans les eaux souterraines et superficielles du bassin de Bolbec et du Commerce en Seine Maritime.

Des mesures de restriction des usages de cette eau destinée à la consommation humaine (boisson, cuisson et préparation des aliments) ont été mises en œuvre dans la zone concernée. Une note de synthèse intermédiaire portant sur l'évaluation des risques liés à la présence de la NMOR dans les eaux destinées à la consommation humaine a été transmise par l'Anses à la DGS le 9 juillet 2012, en réponse à la saisine 2012-SA-0172. Cette note du 9 juillet 2012 ne préjuge pas des conclusions finales du rapport d'expertise qui devrait être rendu après validation des CES Chimie et Eaux.

Compte tenu de la présence d'une activité agricole importante en termes de productions végétales (cultures maraîchères, pomme de terre, céréales) et animales (élevages bovins laitiers et allaitants, ovins, porcins, poulets de chair et poules pondeuses, pisciculture) dans les secteurs potentiellement impactés par cette contamination des eaux, plus précisément *via* l'abreuvement des animaux, l'Anses a également été saisi d'une demande

d'avis relatif au risque de contamination de la chaîne alimentaire à partir d'activités agricoles utilisant des eaux contaminées en NMOR.

Il est demandé à l'Agence d'évaluer, à partir des données bibliographiques existantes, la présence potentielle de cette molécule dans les denrées animales et la contamination possible des productions végétales ainsi que leurs éventuelles conséquences sur la santé des consommateurs. Dans le cas de données bibliographiques insuffisantes, il est demandé à l'Agence de proposer un plan de prélèvements et d'analyse de denrées et une méthodologie d'interprétation des résultats afin d'évaluer le risque pour les consommateurs de ces denrées.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise » de mai 2003.

Dans un premier temps, une recherche bibliographique a été réalisée par les scientifiques de l'unité d'évaluation des risques chimiques liés aux aliments (UERCA) et l'unité d'évaluation des risques liés à la santé, à l'alimentation et au bien être des animaux (UERSABA), en collaboration avec les scientifiques de l'unité d'évaluation des risques liés à l'eau. Elle a été effectuée en consultant :

- (1) plusieurs bases de données :
 - Santé Animale : bases de données des écoles nationales vétérinaires, Scopus, PubMed
 - Toxicologie : ToxNet, HSDB, ChemIDPlus, Martindale (Micromedex), Répertoire des Spécialités Pharmaceutiques (ANSM), NTP Program
 - Santé des végétaux : CAB Abstracts (accès LSV)
 - Autres thématiques : JECFA, ECHA
- (2) des moteurs de recherche : Google / Google Scholar
- (3) des organismes référents : ATSDR, FDA, IARC, INRS, OEHHA, Santé Canada, US EPA.

Les principaux mots-clés utilisés sont recensés dans le tableau ci-dessous :

Substance (Numéro CAS : 59-89-2)	Nitrosamine, N-nitrosamines, nitrosomorpholine, N-nitrosomorpholine, NMOR, NDMA, Morpholine, drug containing morpholine
Toxicité / effets	Metabolism, toxicity, pharmacokinetic
Populations ciblées	Cattle, bovine, dairy cows, sheep, goat, pig, poultry
Produits	Dairy product, milk, cow milk, egg, meat, food (food survey, food contamination), vegetable
	Drinking water degradation, biodegradation, environment, environmental persistence, accumulation, transfer, half-life, photolysis, rumen, effluent treatment plants

Le document rédigé à partir de cette recherche bibliographique a été soumis, pour relecture, à des experts membres des CES « Résidus et contaminants chimiques et physiques » (CES RCCP) et « Alimentation animale » (CES ALAN), puis a été adressé aux tutelles le 9 août 2012. Il convient de souligner le manque de robustesse de certaines études qui ont toutefois été retenues étant donné le peu de données disponibles sur le sujet.

L'expertise collective a ensuite été réalisée par le groupe d'expertise collective d'urgence (Gecu) « N-nitrosomorpholine » créé le 22 août 2012. Le Gecu s'est réuni le 30 août 2012

afin de valider le projet d'avis préparé par l'UERCA et l'UERSABA qui reprend la synthèse bibliographique et propose un plan d'échantillonnage destiné à acquérir des éléments d'information sur les niveaux de contamination des produits issus d'animaux abreuvés ou de végétaux irrigués avec de l'eau contaminée en NMOR.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GECU

3.1. Données bibliographiques

3.1.1. Données générales concernant l'origine et les sources possibles de contamination de l'environnement et des denrées alimentaires par les composés N-nitrosés

Les composés N-nitrosés sont constitués essentiellement des N-nitrosamines et N-nitrosamides. La quasi-totalité des 300 dérivés N-nitrosés synthétisés et identifiés jusqu'à présent sont des N-nitrosamines.

A la différence des N-nitrosamides, les N-nitrosamines sont des composés stables qui nécessitent une activation métabolique pour présenter une toxicité. Ces dérivés peuvent être divisés en deux groupes, selon qu'ils sont volatils ou non.

Les composés N-nitrosés se forment par réactions chimiques et/ou enzymatiques à partir d'agents précurseurs ou substrats « nitrosables » dont les plus courants sont les amines (primaires, secondaires ou tertiaires) et les sels d'ammonium quaternaires. L'exposition humaine peut résulter d'un apport exogène (*via* la consommation d'aliments, de boissons ou du tabagisme) ou d'une synthèse endogène (formation dans l'estomac à partir de nitrites¹). Celle-ci peut varier sensiblement en fonction de l'âge, de la nature du régime alimentaire et de l'usage de tabac (Schothorst et Somers, 2005).

La morpholine est le précurseur de la N-nitrosomorpholine. En présence de nitrite, elle peut être transformée en N-nitrosomorpholine, aussi bien de manière exogène qu'endogène. La morpholine est notamment utilisée dans l'industrie pharmaceutique et phytosanitaire (comme intermédiaire de synthèse de nombreux principes actifs).

La N-nitrosomorpholine est une nitrosamine le plus souvent détectée à proximité de sites industriels (industries du cuir, de pneumatiques, de caoutchouc), mais aussi dans le tabac et dans les eaux usées (Zink, 2010). Sa présence a également été démontrée dans les émissions provenant de moteurs diesel (Hecht et Young, 1981).

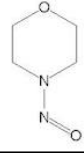
Elle a été détectée dans des produits cosmétiques (Robichova *et al.* 2004a). Toutefois, sa présence est peu décrite dans les denrées alimentaires (cf. paragraphe 3.1.6) à l'inverse de nombreux autres composés N-nitrosés (nitrosodiméthylamine, nitrosodiéthylamine, N-nitrosopipéridine, N-nitrosopyrrolidine) ayant pu être identifiés dans certains fruits, fromages, viandes (charcuterie notamment) ou boissons alcoolisées (Brunnemann *et al.*, 1982 ; Gangolli *et al.*, 1994).

3.1.2. Propriétés physico-chimiques de la N-nitrosomorpholine

La N-nitrosomorpholine est une nitrosamine se présentant sous forme de cristaux jaunes à température ambiante. Elle est totalement soluble dans l'eau et dans les solvants organiques polaires. Elle est stable à l'obscurité et dans une solution neutre ou alcaline pendant au moins deux semaines. Elle est sensible à la lumière et en particulier aux rayonnements UV (IARC, 1978). La NMOR est peu volatile à partir d'une phase liquide (constante de Henry : $2,45 \cdot 10^{-8}$ atm.m³/mole à 37 °C).

¹ Les nitrites sont eux-mêmes soit ingérés, soit formés à partir de nitrates sous l'action de la salive ou dans l'estomac

Tableau 1 : Principales données physico-chimiques de la N-nitrosomorpholine (NTP, 2011)

CASRN	59-89-2
Formule chimique brute	C ₄ H ₈ N ₂ O ₂
Formule développée	
Masse molaire	116,1
Point de fusion	29°C
Point d'ébullition	224-225°C (à 747 mm Hg)
log K _{ow}	-0,44
Solubilité dans l'eau	Très soluble (1000 g/L à 24°C)
Pression de vapeur	0,036 mm Hg à 25 °C
Constante de Henry	2,45.10 ⁻⁸ atm.m ³ /mole à 37°C

Certaines caractéristiques de la NMOR sont communes à d'autres nitrosamines, comme la N-nitrosodi-n-butylamine, la N-nitrosodiéthylamine (NDEA), la N-nitrosodiméthylamine (NDMA), la N-nitrosodi-n-propylamine et la N-nitrosopyrrolidine, notamment la faible masse moléculaire des molécules, la solubilité dans l'eau et les solvants organiques, la stabilité à l'obscurité et à pH neutre ou alcalin et la moindre stabilité à la lumière (NTP 2011).

3.1.3. Méthodes de dosages des nitrosamines dans les denrées alimentaires

Bien que quelques articles se référant aux méthodes d'analyse des nitrosamines dans l'eau et les denrées alimentaires aient été identifiées dans la littérature (Hedler *et al.* 1979 ; Dellisanti *et al.* 1996 ; Campillo *et al.* 2011 ; Jurado-Sanchez *et al.* 2011), aucune méthode normalisée n'est disponible à ce jour pour la détermination des concentrations de NMOR dans les denrées d'origine animale ou végétale.

Il existe toutefois une méthode normalisée relative aux nitrosamines et produits nitrosables dans les caoutchoucs et produits de puériculture, dont les tétines (NF EN 12868). Cette méthode s'appuie sur une chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur spécifique des nitrosamines fonctionnant sur le principe de la chimiluminescence (CPG-TEA). Son domaine d'application a été étendu à l'air, l'eau, l'alcool et certains aliments.

Une méthode par extraction assistée par micro-ondes et micro extraction liquide-liquide couplée à la GC-MS/MS a également été développée pour doser les nitrosamines volatiles dans les viandes (Campillo *et al.* 2011).

Enfin, compte tenu de la possible utilisation de la morpholine en tant qu'additif présent dans les cires de protection des fruits (agrumes, pommes, mangues, etc.) produits en dehors de l'Union Européenne, une méthode permettant la détection de trois nitrosamines issues de la morpholine (la N-nitrosomorpholine, la diéthanolamine et la triéthanolamine) dans certains végétaux a été développée. Toutefois le domaine d'application de cette méthode ne concerne pas les denrées d'origine animale et les performances de dosage de la N-nitrosomorpholine ne sont pas connues.

L'ensemble des méthodes utilisées pour rechercher des nitrosamines, que ce soit dans l'eau ou dans les fruits, repose sur un dosage de la forme libre, les éventuels produits hydroxylés, libres ou conjugués n'étant pas recherchés.

3.1.4. Stabilité et accumulation de la NMOR dans l'environnement

Les caractéristiques physico-chimiques de la NMOR ainsi que les quelques données bibliographiques disponibles sur le comportement des nitrosamines dans l'eau et dans l'environnement indiquent qu'il s'agit d'une molécule très hydrophile présentant une forte

mobilité dans l'environnement (HSBD, 2009 ; Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation [CSIRO], 2011 ; Xu *et al.* 2009 ; Nawrocki *et al.* 2011 ; NTP, 2011 ; Pitoi *et al.* 2011). Le coefficient de partage eau/carbone organique (Koc) a en effet été estimé à 14 pour la NMOR, ce qui indique qu'elle est très mobile dans les sols et que sa capacité d'adsorption sur la matière organique (sols, sédiments) est faible.

Avec un facteur de bioconcentration (BCF) estimé à 0,3 (HSBD, 2009), son potentiel d'accumulation dans les organismes vivants, notamment aquatiques, est également faible.

Par ailleurs, des travaux récents menés par la CSIRO (2011) sur le comportement des nitrosamines dans l'eau (biodégradation, hydrolyse et photolyse) confirment que les nitrosamines sont extrêmement sensibles à la lumière et qu'une exposition d'une heure aux rayons solaires (520 W/m²) dans de bonnes conditions (*i.e.* eau propre, durant l'été) conduit à la dégradation de plus de 90% de la NMOR initialement présente dans l'eau avec un temps de demi-vie estimé de 16 minutes. Cette photolyse est par ailleurs dépendante du pH (l'élimination à la lumière est généralement plus rapide en condition acide).

Ce même organisme a démontré que les nitrosamines sont peu hydrolysables. La NMOR est stable 5 jours à pH 4, 7 ou 9. La sensibilité de quelques nitrosamines à la dégradation microbienne a également été évaluée expérimentalement (CSIRO, 2011). Les résultats obtenus mettent en évidence que la NMOR est stable lorsqu'elle est mise en solution dans un inoculum bactérien relativement concentré semblable à ce qui est présent dans les stations d'épuration.

Toutefois, ces données expérimentales sont difficilement extrapolables à ce qui pourrait être observé à la surface des sols ou dans les eaux dont l'activité microbienne est probablement moins importante que celle utilisée pour réaliser ces expériences.

3.1.5. Métabolisme de la NMOR chez l'animal et dans les végétaux

3.1.5.1. Chez l'animal

Très peu de données bibliographiques existent sur le métabolisme de la NMOR chez l'animal. Les articles relatifs à cette substance (Hecht et Young, 1981 ; Tricker et Preussmann, 1991) portent principalement sur ses pouvoirs mutagènes et cancérigènes dans différents organes chez les rongeurs (hépatique et rénal chez le rat ; trachéal, au niveau des sphères nasales, et colique chez le hamster ; hépatique et pulmonaire chez la souris). Cette toxicité a été présentée dans la synthèse intermédiaire de la saisine 2012-SA-0172.

L'absorption de NMOR peut se faire par voie digestive, *via* l'eau d'abreuvement, voie utilisée expérimentalement dans de nombreuses études de toxicité.

L'existence d'une absorption cutanée de la NMOR a également été mise en évidence par Lijinsky *et al.* (1981), les résultats ayant démontré des niveaux d'absorption très variables en fonction du support utilisé pour l'application.

En ce qui concerne la distribution et l'excrétion de la NMOR, Stewart et Magee (1972) ont injecté à des rats, par voie intra péritonéale (IP), de la NMOR à la dose de 400 mg/kg. Ils ont observé une concentration de la substance similaire dans la plupart des organes, sans accumulation observée. De plus, durant les 32 premières heures suivant une injection de NMOR marquée au carbone 14 (¹⁴C), environ 80% de la radioactivité ont été retrouvés dans les urines, et moins de 5% de celle-ci ont été exhalés.

Dix-huit heures après administration (voie IP) à des rats de 400 mg/kg de NMOR marquée au ¹⁴C, la concentration dans les tissus représente moins de 10% de la valeur maximale (Stewart *et al.* 1974). En ce qui concerne l'excrétion, 3,3% de radioactivité ont été exhalés sur une période de 24 h et 81% ont été excrétés dans l'urine, dont 24% sous forme inchangée et 15% sous la forme d'un métabolite, la *N*-nitrosodiéthanolamine ; un troisième

composé n'a pu être identifié. Vingt-huit heures après injection, 1,5% de radioactivité injectée a été détecté dans le foie et 0,27% dans les reins.

Bien que ces études aient été réalisées en administrant des doses très élevées de NMOR, elles confirment une distribution et une excrétion rapides de la NMOR.

Löfberg et Tjälve (1985) ont montré que la NMOR pouvait passer librement à travers les membranes cellulaires et se distribuer dans la plupart des tissus du corps.

Chez le rat, le métabolisme de la NMOR fait intervenir des mécanismes d' α - et de β -hydroxylation (Hecht et Young, 1981 ; Zink, 2009) qui ont lieu essentiellement dans le foie et dont les catalyseurs sont les cytochromes P450.

- L' α -hydroxylation aboutit à la formation de 3-hydroxy-N-nitrosomorpholine, donnant elle-même plusieurs métabolites (notamment, acétaldéhyde, glycoaldéhyde, 2-hydroxy-éthoxy-acétaldéhyde ou sa forme cyclique) (Zink *et al.* 2010) ;
- La β -hydroxylation permet la synthèse de 2-hydroxy-N-nitrosomorpholine, en équilibre avec son aldéhyde. Ce dernier donne, par oxydation, la N-nitroso(2-hydroxy-éthyl)glycine et, par réduction, la N-nitrosodiéthanolamine. Ces trois métabolites ont été détectés dans les urines de rat (Zink, 2009).

Selon Löfberg (1985), chez le rat, le métabolisme de la NMOR a lieu essentiellement dans le foie, mais également dans les cavités nasales et l'œsophage, un développement de tumeurs ayant par ailleurs été observé dans ces organes.

Chez les animaux de rente (bovins, ovins, caprins, poules pondeuses et poulets de chair) et les carnivores domestiques, aucune étude n'a été identifiée dans la littérature sur l'absorption, la distribution, le métabolisme (notamment l'accumulation ou le transfert de molécules) et l'excrétion de la NMOR, ni sur sa toxicité aiguë ou chronique.

Les seules données de métabolisme disponibles concernent l'œuf : Joshi (2011) a étudié, sur un modèle d'œuf de poule, la stabilité, le transfert et l'impact sur le développement embryonnaire de trois nitrosamines, la NMOR, la NDMA et la N-nitrosoatrazine (NNAT) et ce, par inoculation expérimentale dans les fractions isolées ou dans la chambre à air de l'œuf.

- Stabilité : après 24 heures, les teneurs en NMOR dans le blanc et dans le jaune d'œuf sont restées quasiment inchangées, suggérant la stabilité de ce composés dans ces deux matrices ;
- Transfert entre différentes fractions : un transfert du blanc vers la membrane vitelline puis vers le jaune d'œuf a été observé. Sur une période de 120 heures, la teneur en NMOR du blanc diminue continuellement, alors que celle du jaune augmente. La teneur en NMOR de la membrane vitelline augmente pendant 24 heures puis se stabilise. A terme, la NMOR est distribuée à parts sensiblement égales entre le blanc et le jaune.
- Après inoculation dans la chambre à air d'œuf embryonné, des doses de NMOR supérieures à 2 500 μ g ont provoqué mortalités et malformations.

Compte tenu de l'absence d'études réalisées chez les animaux de rente, la recherche a été étendue à d'autres molécules de la même famille. Bien que ne concernant pas la NMOR, une étude a été conduite chez des chèvres laitières par Juskiwicz et Kowalski (1974) sur le passage de trois nitrosamines dans le lait, la NDMA, la NDEA et la nitrosodipropylamine (NDPA). Chaque nitrosamine a été administrée par voie orale à la dose de 30 mg/kg pc. La concentration maximale de NDMA et de NDEA dans le lait a été observée 2 heures après l'administration, et 30 minutes après administration dans le cas du NDPA. Vingt-quatre heures après administration, les concentrations mesurées dans le lait étaient très faibles pour la NDMA et la NDEA et à l'état de trace pour la NDPA. La quantité totale excrétée dans le lait varie, pour les 3 composés, entre 0,14 et 0,85% de la dose administrée.

Dans un autre essai, deux heures après administration orale de doses décroissantes de NDEA, les teneurs dans le lait étaient également décroissantes, de manière non proportionnelle.

Une autre étude (Van Broekhoven *et al.* 1984) portant sur la N-nirosoprolone, bien que ne concernant qu'une vache laitière, confirme le faible niveau d'excrétion de ces nitrosamines dans le lait après administration par voie orale (concentrations mesurées toutes inférieures à la limite de détection).

Ces deux expérimentations indiquent un passage rapide dans le lait après administration par la voie orale. De plus, seule une faible quantité de nitrosamines administrée est excrétée dans le lait.

3.1.5.2. Dans les végétaux

Aucune donnée relative au métabolisme de la NMOR dans les végétaux n'a été identifiée.

3.1.6. Présence de NMOR dans les denrées alimentaires d'origine animale et végétale

3.1.6.1. Dans les denrées alimentaires d'origine animale (DAOA)

La NMOR peut être retrouvée à l'état de traces dans la viande transformée par l'industrie agro-alimentaire (processus de cuisson et de fumage des viandes) ou dans certaines variétés de fruits (agrumes, pomme, mangue, etc.) en raison de l'usage de morpholine comme additif alimentaire dans les cires de protection de fruits importés.

Des études anciennes indiquent que l'origine principale de la contamination par la NMOR pourrait résulter d'une migration de la molécule à partir d'emballages de produits laitiers et de margarine. Sen et Baddoo (1986) ont montré la présence de NMOR dans trois échantillons sur les 19 analysés. Hotchkiss et Vecchio (1983) ont analysé 34 papiers d'emballage alimentaire, dont certains cartonnés. Dans neuf de ces emballages, des traces de NMOR, comprises entre 3 et 33 µg/kg, ont été mesurées. Des concentrations de l'ordre de 1,7-3,8 et de moins de 3,2 µg/kg dans la margarine et des produits laitiers, respectivement, ont également été mesurées (Tricker et Preussmann, 1991).

Une éventuelle présence de NMOR dans les DAOA consécutive à la consommation, par les animaux, d'eau contaminée et au transfert de la molécule dans les DAOA, n'a pas été identifiée dans la littérature.

Par ailleurs, la NMOR, comme les autres nitrosamines, n'est pas mentionnée dans une revue globale des substances toxiques présentes dans les aliments pour animaux et constituant un risque de contamination des DAOA (Kan et Meijer, 2007) ou dans des études portant sur les composés N-nitrosés dans l'alimentation (Lijinsky, 1999).

3.1.6.2. Dans les végétaux

Les études générales relatives aux nitrosamines dans l'alimentation humaine ne mentionnent pas les denrées d'origine végétale (Lijinsky, 1999 ; Tricker, 1997) comme source de contamination pour l'homme.

3.1.7. Conclusions

La recherche bibliographique conduite montre que les données relatives à la présence et au devenir de la NMOR dans l'environnement, les végétaux, les animaux et les denrées alimentaires sont parcellaires et sont issues d'études souvent anciennes et/ou peu robustes.

En raison du peu d'éléments bibliographiques disponibles, la possibilité d'extrapoler les données observées avec d'autres nitrosamines ou la morpholine, a été posée (*cf.* données complémentaires relatives à d'autres nitrosamines en annexe 1).

Il apparaît cependant que, compte tenu des différences de propriétés physico-chimiques, de toxicité et de métabolisme pouvant exister d'une nitrosamine à l'autre, cette extrapolation n'est pas envisageable dans la globalité. Néanmoins, les caractéristiques suivantes semblent être communes aux différentes nitrosamines : une cinétique d'élimination rapide et une absence de signes d'accumulation dans l'environnement et de bioaccumulation dans les organismes animaux.

Toutefois compte tenu : (1) des caractéristiques chimiques de la NMOR et (2) des données disponibles sur certaines nitrosamines, la présence de NMOR dans la viande, l'œuf ou le lait de vache ne peut être exclue. La question d'une possible contamination transitoire de la viande, du lait et des œufs des animaux abreuvés avec de l'eau contaminée, nécessiterait néanmoins d'être étayée par la réalisation d'analyses exploratoires dans la zone polluée.

En ce qui concerne le risque de contamination des végétaux, malgré les données suggérant une absence d'accumulation et une faible persistance dans les sols, celui-ci ne peut être estimé. A ce stade, une modélisation réalisée à partir de données de contamination des eaux d'irrigation et de contamination des sols, intégrant des paramètres de stabilité de la molécule aux rayonnements lumineux, qu'il conviendrait d'étayer avec des données analytiques pourrait permettre d'estimer le transfert de la NMOR aux plantes.

En ce qui concerne la pisciculture, au regard des caractéristiques physico-chimiques de la NMOR et notamment du faible pouvoir de bio accumulation dans les organismes vivants (facteur de bioconcentration (BCF) estimé à 0,3) la probabilité d'une contamination des organismes aquatique est estimée comme faible.

D'une manière plus générale, l'ensemble des données disponibles suggère que la contamination des produits animaux est susceptible de diminuer fortement dès l'arrêt d'utilisation des eaux contaminées.

3.2. Plan d'échantillonnage

L'objet de ce plan d'échantillonnage est d'acquérir des éléments sur les niveaux de contamination des produits issus d'animaux abreuvés ou de végétaux irrigués avec de l'eau contaminée par la NMOR. Il n'a pas vocation à combler le manque de données scientifiques concernant le comportement de cette molécule dans les produits animaux ou végétaux, mais vise à appréhender les niveaux d'exposition potentielle des consommateurs de certains de ces produits.

Les prélèvements seront réalisés au sein d'exploitations préalablement identifiées comme les plus exposées (n=10 par type de production quand cela est possible), c'est-à-dire au sein desquelles l'eau d'abreuvement ou d'irrigation présente les concentrations en NMOR les plus élevées.

Les matrices alimentaires retenues pour être analysées sont le lait et les œufs pour ce qui concerne les aliments d'origine animale et des légumes riches en eau (cucurbitacées, salades, épinards) pour les denrées végétales. Le choix de ces matrices est motivé : 1/ par la possibilité d'une contamination transitoire du lait et des œufs des animaux abreuvés avec de l'eau contaminée 2/ par la relative facilité d'obtention des prélèvements et 3/ par le caractère non invasif de ces prélèvements pour les animaux.

Le lait prélevé sera un lait de mélange (lait de tank) provenant d'animaux ayant été abreuvés avec l'eau potentiellement contaminée en NMOR. Les œufs et les légumes (dont l'analyse portera uniquement sur la partie consommée) seront « poolés » de façon à obtenir une quantité suffisante d'échantillon à analyser (environ une douzaine).

Parallèlement à ces prélèvements, un échantillon de l'eau, ayant servi à l'abreuvement des animaux ou l'irrigation des cultures, sera systématiquement prélevé et analysé. L'origine de l'échantillon d'eau (Eau du réseau, puits, forage....) sera identifiée.

Pour chacun des types d'aliment retenus (exploitation laitière, avicole de ponte et maraîchage), il est recommandé de prélever dans chacune des exploitations recensées :

- un échantillon d'eau (d'abreuvement et/ou d'irrigation),
- un échantillon de lait de tank,
- un « échantillon » d'œufs composé de 12 œufs qui seront « poolés » avant analyse,
- un échantillon de légume riche en eau (cucurbitacées, salades ou épinards),

soit un total de 10 échantillons maximum par matrice alimentaire.

Si cet effectif n'est pas atteignable, dans le cas du maraîchage et des élevages de poules pondeuses, il est recommandé de procéder à l'analyse de 3 échantillons différents au sein de la même exploitation.

Enfin, il est recommandé de réaliser les analyses concernant les matrices alimentaires dans un laboratoire en mesure de procéder à l'analyse de l'ensemble des échantillons. Les méthodes analytiques devront être validées pour chacune des matrices analysées et atteindre des limites de détection et quantification suffisamment basses pour éviter des cas de faux-négatifs.

3.3. Méthodologie d'interprétation des résultats du plan d'échantillonnage

Au regard des niveaux de contamination des eaux et des produits animaux et végétaux prélevés dans les exploitations à risque les apports journaliers théoriques pourront être calculés sur la base des résultats de l'étude INCA2² et de l'outil de calcul mis à disposition par l'Anses³.

Ces niveaux d'exposition seront à mettre en regard des données toxicologiques disponibles et notamment de la valeur toxicologique de référence en cours de validation par le CES chimie de l'Anses pour la NMOR.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions et recommandations émises par le GECU.

Le directeur général

Marc Mortureux

Mots-clés

N-nitrosomorpholine, nitrosamines, eau d'abreuvement, eau d'irrigation

² Afssa, 2009. Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires (INCA2) 2006-2007. Coordinateur : Lionel Lafay.

³ http://www.anses.fr/cgi-bin/countdocs.cgi?Documents/Consommation_INCA2.xls (voir aussi la notice explicative concernant son utilisation à l'adresse suivante : <http://www.anses.fr/Documents/AAAT2010sa0205-an1.pdf>)

BIBLIOGRAPHIE

- Campillo N., Vinas P., Martinez-Castillo N., Hernandez-Cordoba M. (2011): Determination of volatile nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction. *Journal of chromatography A* (1218), 1815-1821
- CSIRO (2011) Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. Biodegradation, Hydrolysis and Photolysis Testing of Nitrosamines in Aquatic Systems.
- Dellisanti A., Cerutti G., Airoldi L. (1996) Volatile N-nitrosamines in Selected Italian Cheeses. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (57), 16-21
- EPA 521 (2004) Determination of nitrosamines in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography with large volume injection and chemical ionization tandem mass spectrometry (MS/MS)
- Gangolli SD, van den Brandt PA, Feron VJ, Janzowsky C, Koeman JH, Speijers GJA, Spiegelhalter B, Walker R, Wishnok JS (1994) Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of Pharmacology Environmental Toxicology and Pharmacology Section* 292, 1-38
- Gombar CT, Mylypiw HM Jr, Harrington GW (1987) Pharmacokinetics of N-nitrosodimethylamine in Beagles. *Cancer research* 47, 343-347
- Gombar CT, Harrington GW, Pylypiw HM Jr, Bevill RF, Thurnon JC, Nelson DR, Magee PN (1988) Pharmacokinetics of N-nitrosodimethylamine in swine. *Carcinogenesis* 9(8), 1351-4
- Harrington GW, Magee PN, Pylypiw HM Jr, Kozeniauskas R, Bevill RF, Nelson DR, Thurmon JC (1990) The formation, disposition and hepatic metabolism of dimethylnitrosamine in the pig. *Drug metabolism and disposition* 18(5), 626- 631
- Hecht SS, Young R (1981) Metabolic α -hydroxylation of N-nitrosomorpholine and 3,3,5,5-tetradeutero-N-nitrosomorpholine in the F344 Rat. *Cancer Research* 41, 5039-5043
- Hedler L, Schurr C, Marquardt P. (1979): Determination of volatile N-nitroso compounds in various samples of edible vegetable oils and margarine (commercially available products). *J Am Oil Chem Soc.* 56(7):681-4.
- HSDB (Hazardous substances data base) (2009) N-nitrosomorpholine. National library of medicine. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+4308>
- IARC (1978) N-Nitrosomorpholine. In *Some N-nitroso Compounds*. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 17. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. pp. 263-280
- IARC (1989) Morpholine. In *Some Organic Solvents, Resin Monomers and Related Compounds, Pigments and Occupational Exposures in Paint Manufacture and Painting*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol 47. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. pp. 199-213
- Joshi (N) Assessing the stability, biological transfer and developmental impact of environmentally relevant nitrosamines using a chicken egg model. University of Nebraska-Lincoln. Toxicology Program Dissertations and Thesis. Paper 1. <http://digitalcommons.unl.edu/ehohtdiss/1>
- Jurado-Sanchez B, Ballesteros E, Gallego M. (2011): Gas chromatographic determination of N-nitrosamines, aromatic amines, and melamine in milk and dairy products using an automatic solid-phase extraction system. *J Agric Food Chem.* 59(13):7519-26.
- Juzskiewicz T, Kowalski B (1974) Passage of Nitrosamines from Rumen into Milk in Goats. IARC (International Agency for Research on Cancer) Scientific Publications 9, 173-76
- Kan CA, Meijer GAL (2007) The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Anim Feed Sci Tech* 133, 84-108

- Koissi N, Shah NH, Gineva, B, Eck WS, Roebuck BD, Fishbein JC (2012) Lactone metabolite common to the carcinogene dioxane, diethylene glycol and N-nitrosomorpholine: aqueous chemistry and failure to mediate liver carcinogenesis in the F344 rat. *Chemical research in toxicology* 25, 1022-1028
- Lijinsky W, Taylor HW (1975) Increased carcinogenicity of 2,6-dimethylnitrosomorpholine compared with nitrosomorpholine in rats. *Cancer Research* 35, 2123-2125
- Lijinsky W, Losikoff AM, Sansone EB (1981) Penetration of rat skin by N-nitrosodiethanolamine and N-nitrosomorpholine. *Journal of National Cancer Institute* 66(1) 125-127
- Lijinsky W (1999) N-nitrosocompounds in the diet. *Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis* 443(1-2), 129-138
- Löfberg B, Tjälve H (1985) Tissue specificity of N-nitrosomorpholine metabolism in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* 23(7), 647-54
- Nawrocki J, Andrzejewski P. (2011) : Nitrosamines and water. *J Hazard Mater.* 189(1-2):1-18.
- National Toxicology Program N-Nitrosamines (15 listings): N-nitrosomorpholine (2011) Report on carcinogens : carcinogen profiles / U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program (NTP), 12, pp. 319-320
- Pitoy MM, Patterson BM, Furness AJ, Bastow TP, McKinley AJ. (2011): Fate of N-nitrosomorpholine in an anaerobic aquifer used for managed aquifer recharge: a column study. *Water Res.* 2011 (8):2550-60.
- Sen NP, Baddoo PA (1986) Origin of N-nitrosomorpholine contamination in margarine. *Journal of food science* 51, 216-217
- Stewart BW, Magee PN (1972) Metabolism and some biochemical effects of N-nitrosomorpholine. *Biochem J*, 126(3), 21-22
- Stewart BW, Swann PF, Holsman JW, Magee PN (1974) Cellular injury and carcinogenesis. Evidence for the alkylation of rat liver nucleic acids in vivo by N-nitrosomorpholine. *Z Krebsforsch* 82, 1-12
- Tricker AR, Preussmann R (1991) Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutation research* 259, 277-289
- Underwood B, Lijinsky W (1982) Comparative metabolism of 2,6-dimethylnitrosomorpholine in rats, hamsters and Guinea pigs. *Cancer research* 42, 54-58
- Van Broekhoven LW, Davies JAR, Geurink JH (1984) :N-Nitrosoproline excretion in urine, feces and milk from cows in relation to feed composition. IARC Scientific publication 57: 205-12.
- Xu B, Chen Z, Qi F, Ma J, Wu F (2009) : Inhibiting the regeneration of N-nitrosodimethylamine in drinking water by UV photolysis combined with ozonation. *J Hazard Mater.* 168(1):108-14.
- Zink CN (2009) Synthesis and examination of nucleoside adducts formed by alpha-hydroxy-N-nitrosomorpholine. Doctoral thesis, 118p
- Zink CN (2010) Products of the direct reaction of the diazonium ion of a metabolite of the carcinogen N-nitrosomorpholine with purines of nucleosides and DNA. *Chem Res Toxicol* 23, 1223-1233

ANNEXE

Annexe 1

Données complémentaires relatives à d'autres nitrosamines

Underwood et Lijinsky (1982) ont comparé le métabolisme de la 2,6-diméthylnitrosomorpholine chez le rat, le hamster et le cobaye après administration orale de la molécule marquée. La pharmacocinétique diffère chez les trois espèces et les tumeurs se localisent différemment, mais une distribution rapide dans tous les tissus, sans signe d'accumulation de radioactivité observé dans les trois espèces. Le métabolisme est plus rapide chez le hamster. Parmi les 12 métabolites excrétés dans les urines, un métabolite majoritaire chez le hamster est absent chez le rat ou présent en petite quantité chez le cobaye.

La *N*-nitrosodiméthylamine (NDMA), autre nitrosamine, a fait l'objet d'études chez le porc (Gombar *et al.*, 1988 ; Harrington *et al.*, 1990) et chez le beagle (Gombar *et al.*, 1987). Ces études ont également montré une pharmacocinétique rapide chez ces deux espèces. Une biodisponibilité différente entre les deux espèces, ainsi qu'avec le rat, a été notée (porc : 67%, beagle : 93%, rat : 8-10%). Dans les urines, la NDMA a été retrouvée en très faibles quantités chez le porc ; elle était absente chez le beagle. Chez le rat, plus de 60% de NDMA ont été exhalés sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ et seulement 4% ont été excrétés dans les urines (Heath cité par Stewart *et al.*, 1974).

Des études conduites chez les animaux de laboratoire ont mis en évidence une élimination urinaire presque complète de trois composés nitrosés dans les 24 heures suivant une administration orale (Chu et Magee, 1981 ; Ohshima *et al.*, 1982 et 1984, cités par Tricker, 1997).

Ces études mettent toutes en évidence une distribution et une excrétion rapides des nitrosamines, en l'absence de signe d'accumulation, comme dans le cas de la NMOR.