

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 19 juillet 2019

AVIS

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

relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de morpholine dans les eaux destinées à la consommation humaine

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 à 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 publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 21 septembre 2017 par la Direction générale de la santé (DGS) pour la réalisation de l'expertise suivante : évaluation des risques sanitaires liés à la présence de morpholine (MOR) dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

En 2012, une contamination par la N-nitrosomorpholine (NMOR) des eaux superficielles et souterraines a été mise en évidence dans la Vallée du Commerce en Seine-Maritime. Elle résultait d'une pollution par une usine pharmaceutique utilisant de la morpholine (MOR) (précurseur de la NMOR) qui rejetait dans la rivière le Commerce de la MOR et de la NMOR. Cette pollution touchant des captages utilisés pour l'alimentation en EDCH, l'Anses a été saisie pour évaluer, en urgence, les risques sanitaires liés à la NMOR dans les EDCH. L'expertise a conclu que la consommation journalière d'eau de boisson présentant une concentration en NMOR inférieure à 100 ng.L⁻¹ n'entraînait pas d'excès de risque pour la santé des consommateurs supérieur à 10⁻⁵ (Anses 2012).

À la suite de cette pollution, un suivi de l'évolution des concentrations en MOR et en NMOR a été réalisé dans les eaux souterraines et superficielles de la zone impactée, notamment au niveau de captages en eaux souterraines assurant l'alimentation en EDCH de la communauté d'agglomération Caux vallée de Seine et de la Communauté de l'agglomération havraise. Cette zone, présentant des concentrations élevées en morpholine dans les eaux, est appelée « zone d'étude » dans cet avis.

Suite à un changement de laboratoire d'analyses fin 2016 et à l'abaissement des limites analytiques, la MOR a été quantifiée dans tous les captages situés en aval hydrogéologique du site de rejet des eaux industrielles avec des concentrations de 10 à 140 ng.L⁻¹. Selon l'Agence régionale de santé

(ARS) de Normandie, la population des communes impactées par la présence de morpholine dans ces eaux totalise environ 115 000 personnes.

La DGS sollicite l'Anses pour établir une valeur sanitaire maximale admissible pour la morpholine dans l'EDCH et évaluer les risques sanitaires liés à sa présence dans les EDCH.

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 (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences des comités d'experts spécialisés (CES) « Eaux » (pilote) et « Valeurs sanitaires de référence » (VSR). L'Anses a confié l'expertise au groupe de travail « Évaluation des risques sanitaires associés aux paramètres chimiques des eaux destinées à la consommation humaine » (GT ERS EDCH), rattaché au CES « Eaux », et la rédaction des parties relatives à la toxicité de la MOR et à la construction de la valeur toxicologique de référence (VTR) chronique par voie orale au CES VSR. Les travaux ont été présentés, tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques, au CES VSR entre le 30 novembre 2018 et le 9 mai 2019 et au CES « Eaux » entre le 9 avril 2019 et le 11 juin 2019. Les parties 3.5 et 3.6 et les annexes correspondantes du présent avis ont été adoptées à l'unanimité moins une abstention par le CES VSR réuni le 9 mai 2019. L'ensemble des travaux a été adopté à l'unanimité par le CES « Eaux » réuni le 11 juin 2019. L'annexe 1 présente les intervenants sur ce dossier.

L'expertise s'est basée sur la démarche d'évaluation des risques sanitaires (ERS) liés aux situations de dépassement des limites et références de qualité dans les EDCH présentée dans le rapport de l'Afssa (2007) et les directives pour la qualité de l'eau de boisson de l'OMS (2017). Le CES VSR a construit la VTR en suivant le guide d'élaboration des VTR publié par l'Anses (2017).

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet du ministère en charge des solidarités et de la santé (<https://dpi.sante.gouv.fr>).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT ERS EDCH

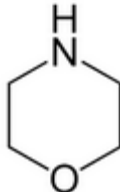
3.1. Propriétés physico-chimiques, origine et devenir de la morpholine dans les eaux

La morpholine (MOR) est un hétérocycle azoté saturé à six chaînons comprenant une fonction éther et une fonction amine secondaire (formule Tableau I). C'est un liquide incolore, huileux et volatil qui présente une odeur caractéristique d'amine.

3.1.1. Propriétés physico-chimiques

La MOR est une molécule de très faible masse moléculaire, totalement miscible dans l'eau et très polaire ($\log K_{ow} = -2,55$ à 25 °C et à pH 7 - OCDE 2013) (Tableau I). Elle existe majoritairement sous forme protonée à pH < pKa et sous forme neutre à pH > pKa ($pKa = 8,4 \pm 0,1$). Ne possédant pas de groupement chimique hydrolysable, elle est très stable dans l'eau à température ambiante. La morpholine absorbe uniquement les longueurs d'onde inférieures à 240 nm (Chaboune, Sarakha, et Catastini 2016).

Tableau I. Propriétés physico-chimiques de la morpholine.

Paramètre	Valeur(s)
Numéro CAS	110-91-8
Code SANDRE	7475
Formule	C ₄ H ₉ NO
Formule développée	
Classe chimique	Hétérocycle, amine secondaire
Masse molaire	87,122 g.mol ⁻¹
Point de fusion	- 5 à - 4,9°C ^{a, b}
Point d'ébullition	128 à 130°C ^{a, b}
Constante de Henry	0,118 Pa m ³ .mol ⁻¹
Tension de vapeur	1,1 kPa à 20°C ^a 8,3 kPa à 60°C ^a 40,9 kPa à 100°C ^a
Point d'ébullition	128 à 130°C ^a
Solubilité dans l'eau	Miscible
pKa	8,33 à 25°C
log K _{ow}	- 2,55 à 25°C à pH 7 ^a
K _{oc}	K _{oc} = 7,4 pour la molécule neutre ^c K _{oc} = 76 à pH 7,0 pour la forme protonée ^c

^a INRS 2007 ; ^b Lide 2007 ; ^c OCDE 2013

3.1.1. Sources

La MOR n'est pas présente à l'état naturel dans l'environnement. Elle est généralement produite à la suite de la réaction du diéthylène glycol avec l'ammoniac en présence d'hydrogène et de catalyseurs (CIRC 1989, IPCS OMS 1996). En Europe, entre 10 000 et 100 000 tonnes sont fabriquées et/ou importées par an (ECHA 2019a).

La MOR est utilisée (INRS 2007, ECHA 2019a) :

- Comme intermédiaire de synthèse en chimie organique, par exemple dans la fabrication de produits pharmaceutiques, de produits phytopharmaceutiques, d'anti-oxydants ou de plastifiants ;
- Comme inhibiteur de corrosion, en particulier dans les eaux de chaudières industrielles et les circuits secondaires de refroidissement des centres nucléaires de production d'électricité ;
- Dans la fabrication d'azurants optiques et d'accélérateurs de vulcanisation du caoutchouc ;
- Comme solvant pour des résines, colorants et cires.

L'Afssa (2005) a estimé que « l'utilisation de morpholine dans les chaudières fabriquant de la vapeur destinée à entrer au contact de l'aliment, doit être considérée, à des fins de protection du consommateur, comme susceptible de présenter un risque sanitaire. »

Dans certains pays, dont le Canada, la MOR est utilisée pour la solubilisation des additifs alimentaires (cires ou gommes) utilisés pour traiter la surface des fruits et légumes frais comme les pommes (Gouvernement du Canada 2002). Cet usage de la MOR n'est pas autorisé dans l'Union européenne (UE).

La MOR et ses sels font partie des substances interdites en Europe dans les produits cosmétiques (Annexe II du règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques).

Étant inscrite à l'annexe III du règlement (CE) n° 2032/2003 relatif aux produits biocides de la Commission européenne du 4 novembre 2003, la mise sur le marché de produits biocides contenant de la MOR est interdite sur le territoire de l'UE depuis le 1^{er} septembre 2006 (INRS 2007).

La MOR peut aussi être produite par photolyse dans l'ultraviolet (UV) de la NMOR. Les stations de traitement d'eaux usées industrielles mettant en œuvre un réacteur équipé de lampes à rayonnements UV pour dégrader la NMOR peuvent rejeter de la MOR dans le milieu naturel (Vrillet et Arcé 2014).

3.1.2. Présence et devenir dans les eaux

3.1.2.1. Devenir de la morpholine dans les eaux continentales

En raison de sa grande solubilité dans l'eau, la MOR peut être introduite dans l'environnement *via* les effluents industriels. De rares études mettent en évidence ce transfert : Di Marzio *et al.* (2005) ont décrit sa présence dans plusieurs échantillons issus d'effluents industriels et dans la rivière Lujàn (Argentine), en aval des rejets. Les autres rares études publiées sont en lien avec la remédiation de sites contaminés (Bae *et al.* 2002).

Comme la MOR n'absorbe pas les rayonnements UV ou visibles à des longueurs d'onde supérieures à 240 nm (Chaboune, Sarakha, et Catastini 2016), elle n'est pas dégradée par photolyse solaire directe.

Elle peut être biodégradée par certaines souches de bactéries présentes dans les boues activées après une phase d'acclimatation (Knapp, Callely, et Mainprize 1982). Le test de biodégradabilité de l'OCDE (2013) donne un rendement d'élimination de 92,6 % en 22 jours après une phase d'adaptation de 15 jours. La MOR peut être biodégradée en milieu aérobie à condition que les souches concernées soient présentes et puissent se développer (Knapp et Whytell 1990, Poupin *et al.* 1999). En effet, dans l'environnement, les bactéries capables de dégrader la MOR sont en faible nombre.

En conditions physiologiques et environnementales, les solutions diluées de MOR peuvent réagir avec des solutions de nitrites ou des oxydes d'azote gazeux et former de la NMOR (Di Marzio *et al.* 2005).

À l'inverse, Pitoi *et al.* (2011) ont montré une dégradation de la NMOR en MOR selon un processus de dénitrification et de réduction en colonne expérimentale simulant des conditions anaérobies, non stériles d'aquifère profond, contenant de la pyrite. Les résultats expérimentaux laissent présager une accumulation transitoire de MOR qui subit à son tour une lente dégradation par réduction.

3.1.2.2. Concentration en morpholine dans les eaux de surface

■ À l'international

Malgré sa présence possible dans les rejets industriels et sa résistance à la dégradation dans l'environnement, la morpholine est peu recherchée dans les eaux de surface continentales au niveau international. Des concentrations en MOR ont été rapportées dans les eaux de surface en Chine,

Turquie et Allemagne, dans des gammes de concentrations de 0,15 à 2,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Pietsch *et al.* 2001, Akyüz et Ata 2006, Wang *et al.* 2011, Ma *et al.* 2012). Pour chacune de ces études, les concentrations en MOR ont été attribuées à des rejets d'eaux usées municipales, industrielles ou d'une centrale de production d'électricité à charbon.

■ En France

Afin de caractériser la contamination des eaux de surface (ESU) par la MOR en France, une extraction des données de la base Naïades¹ a été effectuée pour la période de 2013 à 2018. Les caractéristiques de l'extraction sont décrites en annexe 3.

► Situation dans la zone d'étude

La base Naïades recense 256 mesures de MOR réalisées par le réseau de suivi de la qualité des rivières de la Communauté de Communes Caux-Vallée de Seine, située dans la zone d'étude faisant l'objet de cette saisine. Les résultats, mesurés entre janvier 2016 et novembre 2017 sur 12 stations, sont présentés dans le Tableau II.

Les 256 résultats sont supérieurs à la limite de quantification (LQ) de 0,02 $\mu\text{g.L}^{-1}$. La médiane des concentrations est de 0,66 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et le percentile 95 (P95) est de 2,40 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Tableau II. Concentration en morpholine (en $\mu\text{g.L}^{-1}$) dans les eaux de surface de la zone d'étude entre janvier 2016 et novembre 2017 (LQ = 0,02 $\mu\text{g.L}^{-1}$; données Naïades).

N	Fréquence de quantification	Distribution des concentrations en $\mu\text{g.L}^{-1}$						
		P5	P25	P50	Moyenne	P75	P95	Max
256	100 %	0,11	0,30	0,66	0,85	1,10	2,40	5,34

Sources : Naïades ; Traitement : Anses

► Situation en France en dehors de la zone d'étude

À partir de l'extraction de la base Naïades, 9 695 résultats d'analyses ont été obtenus pour la MOR dans les ESU en dehors de la zone d'étude. Les résultats proviennent de 692 stations de mesure réparties sur deux des sept bassins hydrographiques métropolitains : Seine-Normandie (1 836 résultats) et Rhône-Méditerranée-Corse (7 759 résultats).

Les LQ associées aux analyses sont de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour 7 750 résultats, de 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour huit résultats, de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour un résultat et de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour 1 936 résultats. Sur les 9 695 résultats, seuls six, sont supérieurs à une LQ et ont été mis en évidence avec une méthode permettant d'atteindre une LQ de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Ces six résultats ont été obtenus dans le bassin Rhône-Méditerranée-Corse avec des concentrations comprises entre 2,5 et 9 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Ils concernent cinq stations de mesure pour lesquelles une majorité de résultats inférieurs à la LQ a été constatée.

► Remarque sur les LQ

Le GT ERS EDCH et le CES « Eaux » soulignent que les LQ associées aux mesures de MOR dans les ESU sont élevées au regard des concentrations mesurées dans la zone d'étude. En effet, si la surveillance de cette zone avait été effectuée avec des méthodes analytiques présentant une LQ de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, seuls 17 résultats sur 256 auraient une valeur quantifiée.

¹ www.naiades.eaufrance.fr

3.1.2.3. Concentration en morpholine dans les eaux souterraines

À notre connaissance, aucune étude ne rapporte de concentration en morpholine dans des eaux souterraines, en dehors des données relatives aux ressources utilisées pour la production d'EDCH dans la zone d'étude, objet de cette saisine.

En France, aucune donnée relative au paramètre MOR n'était disponible *via* le portail national d'accès aux données sur les eaux souterraines Ades² en janvier 2019 (paramètre inexistant).

3.1.2.4. Traitements pouvant générer de la morpholine dans les filières d'EDCH

Chaboune, Sarakha, et Catastini (2016) ont mis en évidence une libération de MOR lors du traitement de la NMOR par irradiation UV et/ou ozonation.

La NMOR est facilement dégradée par photolyse directe à 254 nm ($\epsilon = 4\,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 254 nm ; rendement quantique de photolyse : 0,32 à pH 5,5 et 0,1 à pH 7 et λ 254-340 nm). La photolyse UV de la NMOR conduit principalement à la formation de MOR (0,11 mole/mole) et de 4-hydroxymorpholine (non quantifiée) comme produits finaux de réaction à 254 nm.

L'ozonation provoque également une dégradation très rapide de la NMOR avec une vitesse plus rapide à pH 8 qu'à 5,5. L'ozonation conduit à la libération de MOR comme intermédiaire réactionnel (0,23 mole/mole de NMOR dégradée) et à la formation de produits d'ouverture de cycle (CO_2 , NO_3^- et acides organiques) comme produits finaux de réaction.

3.2. Traitements réduisant les concentrations en morpholine dans les EDCH

Les informations présentées sont basées sur les rares données disponibles sur le devenir de la MOR dans les unités de production d'EDCH et sur ses propriétés physico-chimiques (solubilité dans l'eau, polarité, faible masse moléculaire).

3.2.1. Clarification

En raison de la forte polarité et de la forte solubilité de la MOR (voir § 3.1.1), les étapes de clarification (coagulation, floculation, décantation et filtration sur sable) ne l'éliminent pas de manière significative. Dans des essais de coagulation-floculation par du chlorure ferrique (5 mg Fe.L^{-1}) ou du sulfate d'aluminium (5 mg Al.L^{-1}), réalisés à pH = 7,2 avec une eau de nappe alluviale dopée à la concentration de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, Pietsch *et al.* (2001) confirment la très faible élimination de la MOR avec un rendement de 10 %.

3.2.2. Adsorption sur charbon actif

Aucune donnée n'a été identifiée sur l'élimination de la MOR par adsorption sur charbon actif. Avec une valeur de $\log K_{ow}$ de - 2,55, l'élimination ne pourrait être éventuellement envisagée qu'avec des procédés mettant en œuvre des taux de traitement très élevés en charbon actif en poudre.

3.2.3. Oxydation chimique

3.2.3.1. Oxydation par le chlore

Lors de la chloration (0,45 mg $\text{Cl}_2.\text{L}^{-1}$) d'une eau de nappe alluviale (pH = 7,2 ; carbone organique total (COT) = 2,7 mg L^{-1}) dopée (1 $\mu\text{g.L}^{-1}$), Pietsch *et al.* (2001) n'ont pas obtenu une élimination

² www.ades.eaufrance.fr

significative de la MOR (abattement : < 5 %) après 30 min de réaction. À notre connaissance, aucune valeur de constante cinétique de chloration de la MOR n'est actuellement disponible.

3.2.3.2. Oxydation par le dioxyde de chlore

Le traitement d'une eau de nappe alluviale (pH = 7,2 ; COT = 2,7 mg.L⁻¹) par du dioxyde de chlore (0,40 mg ClO₂.L⁻¹) dopée à une concentration de 1 µg.L⁻¹ de MOR, a conduit à un abattement de l'ordre de 20 % après 30 min de réaction (Pietsch *et al.* 2001).

3.2.3.3. Oxydation par l'ozone

La MOR est rapidement oxydée par l'ozone (Pietsch *et al.* 1999, Pietsch *et al.* 2001, Tekle-Röttering *et al.* 2016). Pietsch *et al.* (1999) ont montré que l'ozonation d'une solution aqueuse à la concentration de 1 µg.L⁻¹ à pH 7 (tampon phosphates) à une dose de 1 mg O₃.L⁻¹ conduit à une disparition totale de la MOR en trois minutes de réaction. Les valeurs des constantes cinétiques apparentes de réaction de l'ozone sur la MOR déterminées à pH 7 ((2,9 - 5,0) x 10³ M⁻¹.s⁻¹ ; Pietsch *et al.* 1999) et à pH 11,5 ((6,2 - 8,3) x 10⁵ M⁻¹.s⁻¹ ; Tekle-Röttering *et al.* 2016) indiquent que l'ozone réagit principalement sur la forme neutre (forme non protonée) de la MOR (pKa = 8,36). Pietsch *et al.* (1999) ont aussi montré que son ozonation à pH 7 conduit à la formation d'éthanolamine comme intermédiaire réactionnel par ouverture de la structure cyclique de la MOR. Avec des pH plus élevés (pH 9,5-12,5, MOR majoritairement sous forme non protonée), Tekle-Röttering *et al.* (2016) ont montré la formation de N-hydroxymorpholine, de formaldéhyde et d'hydroxylamine. Ils proposent le mécanisme réactionnel représenté dans la Figure 1 pour expliquer la formation de ces sous-produits.

En analysant la formation de neuf nitrosamines lors de la désinfection de sept eaux naturelles brutes par 11 procédés de désinfection, Zhao *et al.* (2008) n'ont observé la formation de la NMOR que lors de désinfection d'une eau de lac très chargée en matières organique (COT = 15,9 mg L⁻¹) par ozonation seule ([NMOR] = 12,3 ± 0,3 ng.L⁻¹) et par couplage ozonation et post-chloration ([NMOR] = 19,1 ± 0,1 ng.L⁻¹). La MOR n'a pas été analysée dans les eaux brutes.

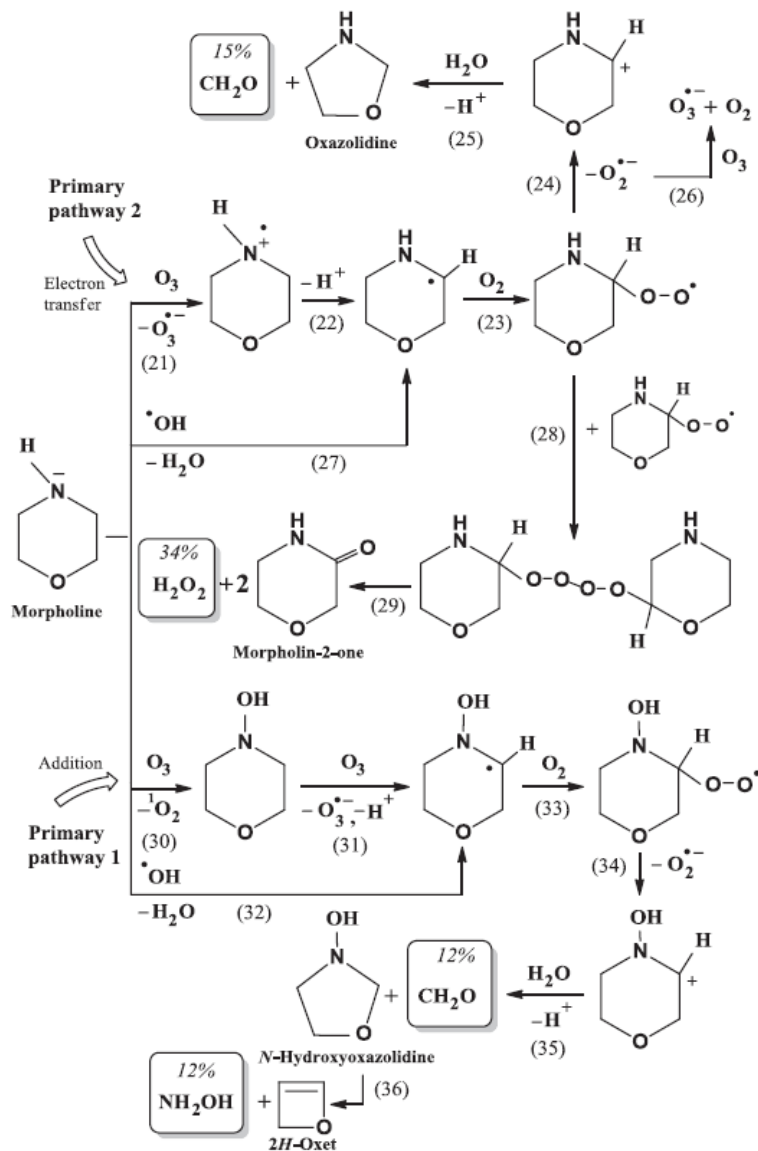


Figure 1. Mécanisme d'ozonation de la morpholine proposé par Tekle-Röttering *et al.* (2016).

3.2.4. Désinfection UV

La MOR n'absorbe pas les rayonnements lumineux à des longueurs d'onde supérieures à 240 nm (Chaboune, Sarakha, et Catastini 2016). La MOR ne sera donc pas dégradée par photolyse directe dans les réacteurs UV équipés de lampes à vapeur de mercure basse pression (émission à 253,7 nm) et par des lampes UV moyenne ou haute pression (rayonnements émis en dessous de 240 nm absorbés par les gaines de protection en quartz).

3.2.5. Filtration membranaire

Aucune donnée n'a été identifiée sur les performances des procédés membranaires comme la nanofiltration et l'osmose inverse pour la rétention de la MOR.

3.2.6. Conclusion

Ni la coagulation-floculation par un sel de fer ou d'aluminium, ni la désinfection par le chlore ou le dioxyde de chlore ne permettent d'éliminer la MOR de manière significative (rendements inférieurs à 20 %). De même, l'adsorption sur charbon actif ne semble pas être une solution pertinente pour l'élimination de ce micropolluant. Seule l'ozonation permet d'assurer son élimination totale, mais avec formation des sous-produits de dégradation tels que la N-hydroxymorpholine.

3.3. Méthodes d'analyse de la morpholine dans les EDCH

En France, dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux, aucun laboratoire n'est agréé pour le dosage de la MOR et deux laboratoires sont accrédités pour l'analyse de cette molécule selon les informations disponibles sur le site internet du Cofrac³, consulté en mai 2019.

3.3.1. Principe de l'analyse

Aucune méthode normalisée n'est disponible pour analyser la MOR dans les eaux. Au regard de ses propriétés physico-chimiques, la méthode la plus adaptée est la chromatographie en phase liquide couplée avec de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS-MS). Une pré-concentration des échantillons (par exemple sur cartouches cationiques de type Oasis[®] MCX à pH neutre) permet d'améliorer la sensibilité de la méthode et de s'affranchir de certaines interférences.

3.3.2. Conservation et prétraitement des échantillons

Il n'a pas été identifié de données bibliographiques présentant la stabilité de cette molécule dans les eaux naturelles. Des informations de stabilité sont néanmoins disponibles à travers une expertise réalisée par le Laboratoire d'Hydrologie de Nancy (LHN) concernant la fiabilité des analyses de MOR dans les eaux (document non publié). Ces travaux, réalisés par un des laboratoires effectuant le suivi de la qualité des eaux, à la suite de la pollution en NMOR, concluent à une stabilité des échantillons sur une durée d'une semaine à 4°C.

3.3.3. Performances

Les limites de quantification relevées auprès des trois laboratoires interrogés sont de l'ordre de 100 ng.L⁻¹ pour une analyse par injection directe en couplage de chromatographie liquide et spectrométrie de masse et de 10 ng.L⁻¹ avec une étape de pré-concentration sur cartouche cationique. Les incertitudes intra-laboratoires sont de l'ordre de 30 à 40 % et varient en fonction du niveau de concentration.

3.3.4. Interférences

Les interférences rencontrées dépendent de la méthode mise en œuvre. Elles sont principalement liées à un défaut de spécificité (coélution, *etc.*) en raison de la faible masse de la molécule ou de la dégradation en cas de conservation prolongée avant analyse. Le recours à un étalon interne analogue marqué (MOR D8 ou MOR D9) permet d'améliorer la robustesse de la méthode. Un contrôle qualité interne du laboratoire et une prise en charge rapide des échantillons permettent généralement de s'affranchir de ces difficultés.

³ www.cofrac.fr

3.4. Évaluation des expositions à la morpholine par les EDCH

3.4.1. Contamination des EDCH

Une extraction de la base de données du contrôle sanitaire des eaux (SISE-Eaux) a été demandée auprès du ministère en charge de la santé. Les caractéristiques de cette extraction sont exposées dans l'annexe 3. Ce paramètre ne faisant pas l'objet du contrôle sanitaire des EDCH⁴, les seules données relatives à la concentration en MOR disponibles dans la base concernent le département de la Seine-Maritime dans lequel est située la zone d'étude, objet de cette saisine.

■ Dans la zone d'étude

Les concentrations en MOR et NMOR dans les EDCH de la zone d'étude décrites dans cet avis sont celles qui ont été transmises à l'Anses par l'ARS de Normandie le 23 janvier 2019. Elles sont concordantes avec les données recensées dans la base SISE-Eaux.

Pour le suivi de la zone d'étude réalisé par l'ARS, la LQ dans les EDCH a été abaissée en mars 2017 de 200 à 10 ou 20 ng.L⁻¹. Avant cette date, la MOR n'était que ponctuellement quantifiée dans les EDCH avec, entre 2013 et février 2017 :

- 23 quantifications sur 893 analyses réalisées sur les ressources utilisées pour la production d'EDCH (captage : CAP), avec une concentration maximale de 2 100 ng.L⁻¹ ;
- 0 quantification sur 30 analyses réalisées à la sortie des installations de traitement des EDCH (TTP) ;
- 0 quantification sur 39 analyses réalisées sur les EDCH délivrées au robinet du consommateur (unité de distribution : UDI).

Les concentrations en MOR mesurées dans les EDCH depuis l'abaissement de la LQ sont présentées dans le Tableau III. Compte tenu de la présence concomitante de NMOR et de MOR dans les ressources utilisées pour la production d'EDCH dans la zone d'étude et du fait que les risques sanitaires liés à la présence de MOR sont évalués conjointement avec ceux liés à la présence de NMOR (voir § 3.7 ci-après), les données relatives à la présence de NMOR sont également présentées.

Afin de permettre l'exploitation des données, deux hypothèses de traitement des données « censurées à gauche » (c'est-à-dire exprimées sous la forme « < LQ ») ont été retenues :

- L'hypothèse basse (HB) selon laquelle les résultats non quantifiés ont été remplacés par 0,
- L'hypothèse haute (HH) selon laquelle les résultats non quantifiés ont été remplacés par la valeur de la LQ renseignée par le laboratoire.

Le suivi réalisé par l'ARS de Normandie porte majoritairement sur les captages. Toutefois, un suivi de deux mois a été réalisé au niveau des unités de distribution (UDI) en 2017 (Tableau III). La fréquence de quantification de la MOR est de 43 % dans les ressources utilisées pour la production d'EDCH (CAP), de 83 % dans les eaux en sortie d'installation de traitement (TTP) et de 60 % dans les eaux délivrées au robinet du consommateur (UDI).

Les liens entre les installations citées dans le Tableau III sont précisés. Les concentrations maximales en MOR ont été mesurées au niveau des captages à une période où les UDI n'étaient pas suivies.

⁴ Arrêté du 11 janvier 2007 relatif au programme de prélèvements et d'analyses du contrôle sanitaire pour les eaux fournies par un réseau de distribution, pris en application des articles R. 1321-10, R. 1321-15 et R. 1321-16 du code de la santé publique

Tableau III. Concentrations en morpholine (MOR) et en N-nitrosomorpholine (NMOR) dans la zone d'étude, mesurées dans les ressources (CAP), les installations de traitement (TTP) et au robinet du consommateur (UDI) depuis mars 2017.

	Remarque sur l'installation	MOR								NMOR							
		N	% N > LQ ^a	P50 en ng.L ⁻¹		P75 en ng.L ⁻¹		Max en ng.L ⁻¹		N	% N > LQ ^a	P50 en ng.L ⁻¹		P75 en ng.L ⁻¹		Max en ng.L ⁻¹	
				HB	HH	HB	HH	HB	HH			HB	HH	HB	HH	HB	HH
CAP 1	Alimentée à 50 % TTP 1	20	60 %	13	13	24	24	135	135	22	91 %	13	13	14	14	16	50
CAP 2	Hors service	22	45 %	0	10	15	19	70	70	23	91 %	57	57	93	93	210	210
CAP 3	Hors service	22	36 %	0	10	13	15	63	63	23	83 %	28	34	47	49	216	216
CAP 4	Alimente UDI 3	21	38 %	0	10	12	16	139	139	22	0 %	0	10	0	10	0	10
CAP 5	Hors service	21	24 %	0	10	0	19	61	61	23	100 %	89	89	120	120	185	185
CAP 6	Hors service	19	47 %	0	10	18	21	93	93	20	80 %	25	25	32	33	113	113
CAP 7	Hors service	41	54 %	12,0	13	22	22	60	60	44	100 %	146	146	171	171	212	212
CAP 8	Alimente UDI 2	20	40 %	0	10	10	16	79	79	20	0 %	0	10	0	10	0	50
CAP 9	Alimente UDI 4	20	45 %	0	15	16	20	405	405	21	0 %	0	10	0	10	0	50
CAP 10	Alimente UDI 4	21	38 %	0	11	18	20	422	422	22	0 %	0	10	0	10	0	50
CAP 11	Alimente UDI 5	21	38 %	0	13	13	20	421	421	23	0 %	0	10	0	10	0	50
CAP 12	Alimente partiellement une autre UDI	21	38 %	0	10	16	20	455	455	22	0 %	0	10	0	10	0	50
Total CAP		269	43 %	0	11	15	20	455	455	285	50 %	10	13	83	83	216	216
Total CAP en service		144	42 %	0	12	14	20	455	455	152	13 %	0	10	0	10	16	50
TTP 1	Alimentée à 50 % par CAP 1	9	100 %	29	29	31	31	35	35	10	100 %	12	12	13	13	14	14
TTP 2	Usage ALI ^c	21	76 %	30	30	37	37	64	64	22	95 %	188	188	269	269	304	304
Total TTP		30	83 %	29	29	35	35	64	64	32	97 %	170	170	249	249	304	304
UDI 1	Pas d'information sur l'origine de l'eau	2	50 %	-	-	-	-	69	69	2	0 %	-	-	-	-	0	10
UDI 2	Alimentée par CAP 8	2	100 %	-	-	-	-	22	22	2	0 %	-	-	-	-	0	10
UDI 3	Alimentée par CAP 4	2	50 %	-	-	-	-	69	69	2	0 %	-	-	-	-	0	10
UDI 4	Alimentée par CAP 9 et 10	2	50 %	-	-	-	-	24	24	2	0 %	-	-	-	-	0	10
UDI 5	Alimentée par CAP 11	2	50 %	-	-	-	-	47	47	2	0 %	-	-	-	-	0	10
Total UDI		10	60 %	17	21	41	41	69	69	10	0 %	0	10	0	10	0	10

^a LQ MOR = 10 ou 20 ng.L⁻¹ en fonction des dates d'analyse ; ^b LQ NMOR = 10 ng.L⁻¹ sauf pour un résultat pour les CAP 1, 2, 3, 6, 8, 10, 11 et 12 et deux résultats pour le CAP 9 où LQ NMOR = 50 ng.L⁻¹ ; ^c entreprise agroalimentaire.

Source : ARS Normandie - Traitement Anses

3.4.2. Exposition alimentaire

Peu de données sont disponibles sur la contamination des aliments par la MOR et celles-ci ne sont pas toutes représentatives de la situation française. En 1996, l'International programme on chemical safety (IPCS) de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estimait que la principale source d'exposition de la population à la MOR était les denrées alimentaires, elles-mêmes contaminées par (IPCS OMS 1996) :

- Le traitement direct des fruits avec des cires ou gommes contenant de la MOR,
- L'utilisation au contact des aliments de vapeur d'eau contenant de la MOR utilisée comme anti-corrosif,
- L'utilisation de matériaux d'emballage contenant de la MOR.

En France, l'utilisation de MOR au contact direct des denrées alimentaires est interdite dans les cires ou gommes enrobant les fruits et légumes frais, et est déconseillée dans les vapeurs d'eau destinée à entrer au contact de l'aliment. De plus, la réglementation relative aux matériaux au contact des aliments (MCDA) fixe des valeurs limites pour la MOR dans les plastiques et les cartons d'emballage.

Au regard des données disponibles, il n'est pas possible d'évaluer l'exposition de la population française à la MOR via l'alimentation.

3.5. Synthèse des effets sur la santé après exposition par voie orale

Le profil toxicologique complet de la MOR est présenté en annexe 4. Un résumé est présenté ci-après.

3.5.1. Toxicocinétique

Chez les rongeurs, la MOR est absorbée après exposition par voie orale, cutanée ou respiratoire. Elle est distribuée dans différents organes : estomac, intestins, foie, reins, muscles, poumons, *etc.* La MOR absorbée est principalement excrétée sous forme inchangée chez le rat, la souris, le hamster et le lapin, quelle que soit la voie d'administration. En revanche, chez le cobaye, la MOR est métabolisée par N-méthylation puis N-oxydation. La MOR est excrétée principalement *via* l'urine et très faiblement dans les fèces. Aucune donnée chez l'Homme n'est disponible.

3.5.2. Toxicité subchronique et chronique

Deux études de toxicité subchronique (Shibata, Kurata, Tamano, *et al.* 1987 ; Sander *et Bürkle* 1969 cité par IPCS OMS 1996) et une étude de toxicité chronique (Shibata, Kurata, Ogiso, *et al.* 1987) sont disponibles.

Des rats Sprague-Dawley, exposés à 500 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ *via* l'alimentation pendant 8 semaines, présentaient une infiltration graisseuse modérée au niveau hépatique (lipidose) (Sander *et Bürkle* 1969 cité par IPCS OMS 1996).

Chez les souris B6C3F1 exposées 13 semaines à 0 - 0,15 - 0,3 - 0,6 - 1,25 et 2,5 % d'oléate de MOR *via* l'eau de boisson, Shibata, Kurata, Tamano, *et al.* (1987) ont mis en évidence des effets rénaux chez les deux sexes (augmentation de la masse relative des reins dès 1,25 %), accompagnés de modifications histopathologiques (léger gonflement des tubules proximaux à 2,5 %). L'analyse d'urine a révélé une augmentation significative de la densité urinaire dès la dose de 0,6 % chez les mâles et aux deux plus fortes doses chez les femelles. Une augmentation de l'azote uréique plasmatique a été notée dès 0,6 % chez les femelles et aux deux plus fortes doses chez les mâles. Les auteurs concluent que l'oléate de MOR entraîne une néphrose au niveau des tubules rénaux à la plus forte dose.

Dans une étude de cancérogénicité (96 semaines) réalisée par la même équipe, les souris B6C3F1 ont reçu 0 - 0,25 ou 1,0 % d'oléate de MOR *via* l'eau de boisson (Shibata, Kurata, Ogiso, *et al.* 1987). L'alimentation et l'eau contenaient respectivement 0,6 et 21 ppm de nitrite et de nitrate de sodium. Une diminution significative du gain de masse corporelle a été notée à 1 % chez les mâles dès la 4^e semaine d'exposition et chez les femelles dès la 13^e semaine. Pour le groupe 0,25 %, seules les femelles ont montré ce changement dès la 26^e semaine. La consommation d'eau était également diminuée chez les deux sexes à la plus forte dose. Une augmentation significative de la concentration en azote uréique sanguin a été observée à la plus forte dose chez les mâles uniquement. Chez les femelles, la masse absolue des reins était significativement augmentée à 0,25 % et diminuée à 1 %. Des diminutions significatives des masses absolues du cœur et du foie ont été observées à la plus forte dose, dans les deux sexes pour le cœur et uniquement chez les femelles pour le foie. L'incidence de l'hyperplasie de l'épithélium du préestomac chez les souris mâles traitées avec 1 % d'oléate de morpholine *via* l'eau de boisson était statistiquement plus élevée que chez les témoins sans augmentation significative de l'incidence des lésions néoplasiques et non néoplasiques.

3.5.3. Reprotoxicité et toxicité sur le développement

Une étude sur le développement prénatal (OCDE 414) a été menée chez des rates Wistar gravides (n = 25/groupe) exposées par gavage à 0, 75, 250 ou 750 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de chlorhydrate de MOR (pureté : 97 %) du 6^e au 19^e jour de gestation (14 jours). Une toxicité maternelle a été observée avec des modifications hématologiques (légère anémie régénérative) et une augmentation de la masse du foie (NOAEL_{maternel} = 75 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹). Aucun effet sur les paramètres gestationnels n'a été observé. L'examen des fœtus n'a pas révélé d'effet sur le *sex-ratio*, ni sur la masse des fœtus et du placenta. Dès 250 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, des variations squelettiques (augmentation statistiquement significative du nombre moyen de fœtus présentant une ossification incomplète de l'os pariétal et du crâne) ont été observées en présence de toxicité maternelle. Selon BASF, ces variations sont des effets mineurs courants considérés transitoires, secondaires à la toxicité maternelle (BASF 2009 cité par OCDE 2013, NICNAS 2015, ECHA 2019b).

En 2017, lors de la vérification de conformité du dossier (« *compliance check* ») dans le cadre du règlement REACH⁵, l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) a demandé aux industriels de fournir d'ici février 2021 une étude de développement prénatal (OCDE 414) chez une seconde espèce (lapin), après administration par voie orale de chlorhydrate de MOR et une étude de reprotoxicité sur une génération étendue (OCDE 443) chez le rat avec du chlorhydrate de MOR (ECHA 2017).

3.5.4. Génotoxicité

Sur la base de résultats équivoques des études *in vitro* de mutation génique réalisées à fortes doses et des résultats négatifs des études *in vitro* et *in vivo* de clastogénicité, la MOR n'est pas considérée génotoxique.

3.5.5. Cancérogénicité

Le CIRC (1999) a considéré la MOR comme un agent cancérogène du groupe 3 (« *inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme* ») en raison de l'absence de donnée chez l'Homme et de données insuffisantes chez les animaux. Les études existantes chez la souris et le hamster (Greenblatt, Mirvish, et So 1971, Shank et Newberne 1976) ont été jugées inadéquates pour l'évaluation par le CIRC. À partir d'une autre lignée de souris, aucune augmentation significative du nombre de tumeur n'a été observée (Shibata, Kurata, Ogiso, *et al.* 1987, décrite § 3.5.2.). Chez le

⁵ Règlement (CE) no 1907/2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), et instituant une agence européenne des produits chimiques

rat Sprague-Dawley, quelques tumeurs du foie et des poumons ont été observées (Shank et Newberne 1976).

Plusieurs études ont également investigué les effets cancérigènes de la MOR ingérée en présence de nitrite de sodium (menant à la formation endogène de NMOR). Elles ont mis en évidence des tumeurs hépatiques et pulmonaires chez le rat et la souris (Greenblatt, Mirvish, et So 1971, Mirvish *et al.* 1976, Shank et Newberne 1976, Mirvish *et al.* 1983, Kitano *et al.* 1997).

3.5.6. Formation endogène de N-nitrosomorpholine

En présence de nitrites, nitrates et NOx, la MOR peut être convertie en NMOR, qui est génotoxique *in vitro* et *in vivo* (mutagène, clastogène, et formation d'altérations primaires de l'ADN) et induit des tumeurs hépatiques, pulmonaires, rénales et vasculaires chez le rat, la souris et le hamster après administration chronique par voie orale (Anses 2012). La NMOR est classée comme cancérigène possible chez l'Homme (groupe 2B) par le CIRC (1978).

Cette formation de NMOR a été observée *in vitro* dans la salive humaine (Tannenbaum *et al.* 1978 cité par IPCS OMS 1996) et dans un équivalent d'épithélium du tractus gastro-intestinal (Iijima *et al.* 2003). De nombreuses études se sont intéressées à la production de NMOR *in vivo* chez la souris (Edwards, Whong, et Speciner 1979, Epstein, Iqbal, et Johnson 1980, Iqbal, Dahl, et Epstein 1980, Van Stee *et al.* 1983, Norkus *et al.* 1984, Norkus *et al.* 1986, Van Stee *et al.* 1995), le rat (Leaf *et al.* 1991, Sander *et al.* 1968 cités par IPCS OMS 1996 ; Shank et Newberne 1976, Inui *et al.* 1978, Hecht et Morrison 1984, Piotrowski *et al.* 2014), le cobaye (Garcia Roche et Ziebarth 1987) et l'Homme (Winter *et al.* 2007).

Hecht et Morrison (1984) ont mis en évidence un taux de conversion de MOR en NMOR de 0,5 à 12 % de la dose de MOR chez des rats F344 gavés par de la MOR (0,92-38,3 µmol) et du nitrite de sodium (4,8-191 µmol) dilué dans une solution saline (n = 3-6/dose). Ces résultats ont été confirmés par Piotrowski *et al.* (2014) qui ont mis en évidence un taux de conversion de $10 \pm 1,6$ % chez des rats mâles Sprague-Dawley exposés par voie orale à 19,2 µmol de MOR et 96 µmol de NaNO₂ et de $13,3 \pm 1,2$ % chez les rats exposés à 0,48 µmol de MOR et 4 µmol de NaNO₂.

Chez des souris gavées séquentiellement avec de la MOR et des nitrites sous conditions acides (pH = 3,4), Edwards, Whong, et Speciner (1979) ont montré que 12 à 19 % de la MOR étaient convertis en NMOR en présence d'excès de nitrites.

Les études disponibles décrivant la formation de NMOR à partir de MOR ont été réalisées avec des apports contrôlés de nitrates, nitrites ou NOx. **Le CES « Valeurs sanitaires de référence » (VSR) retient le taux de conversion de MOR en NMOR le plus conservateur de 19 % obtenu chez des souris exposées à la MOR en présence d'un excès de nitrites (Edwards, Whong, et Speciner 1979).**

3.6. Détermination d'une valeur sanitaire de référence

3.6.1. Valeur sanitaire de référence existante

Seul le Gouvernement du Canada (2002) a retenu une valeur toxicologique de référence (VTR) chronique par voie orale pour la MOR de 0,48 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ à partir de l'étude de Shibata, Kurata, Ogiso, *et al.* (1987) dans laquelle aucun effet indésirable n'a été mis en évidence, avec une dose sans effet nocif observé (NOAEL) de 2 500 mg.L⁻¹ d'oléate de morpholine. Un NOAEL de 96 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ a été déterminé en supposant une dissociation complète du sel de MOR (Tableau IV).

Tableau IV. VTR chronique par voie orale retenue par le Gouvernement du Canada (2002).

Effet critique (Étude clé)	Dose critique	UF	VTR
Absence d'effet (Shibata, Kurata, Ogiso, <i>et al.</i> (1987) : étude de cancérogénicité par voie orale chez des souris B6C3F1)	NOAEL = 2 500 mg.L ⁻¹ = 96 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	200*	DJA = 0,48 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹

UF : Facteur d'incertitude ; DJA : Dose journalière admissible ; * Le détail des UF n'a pas été indiqué.

Du fait d'un manque de transparence dans la construction de cette VTR, en particulier concernant le choix de l'effet critique, le choix des facteurs d'incertitude (UF) et le calcul de la dose critique (transformation de mg.L⁻¹ en mg.kg pc⁻¹.j⁻¹), le **CES VSR ne retient pas la VTR existante (Gouvernement du Canada 2002) et propose d'élaborer une VTR chronique par voie orale.**

3.6.2. Élaboration d'une valeur sanitaire de référence

Dans un premier temps, le CES VSR a construit une valeur, conformément à la méthode d'élaboration des VTR de l'Anses (2017), à partir des données disponibles sur la MOR sous forme de sel, en présence de concentrations connues et faibles de nitrates et nitrites dans l'eau et l'alimentation. Une VTR de 0,12 mg.kg⁻¹.j⁻¹ a ainsi été établie à partir des effets néphrotoxiques mis en évidence dans l'étude 13 semaines de Shibata, Kurata, Tamano, *et al.* (1987) (augmentation de la masse relative des reins à 1,15 % ; NOAEL = 0,6 %, soit 236 mg.kg⁻¹.j⁻¹). Un facteur d'incertitude global de 225 a été appliqué à la BMD_{5%}L_{90%} après réalisation d'un ajustement allométrique pour prendre en compte la variabilité inter et intra-espèce, l'utilisation d'une étude subchronique et le manque de donnée (Tableau V). La construction de cette valeur est détaillée en annexe 5.

Tableau V. VTR chronique par voie orale pour la morpholine sous forme de sel.

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
Néphrotoxicité augmentation de la masse relative des reins (Shibata, Kurata, Tamano, <i>et al.</i> (1987) : étude 13 semaines chez des souris)	NOAEL = 0,6 % = 236 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ BMD _{5%} L _{90%} = 0,18 g.kg ⁻¹ .j ⁻¹ <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L = 0,026 g.kg ⁻¹ .j ⁻¹	225 UFA : 2,5 UFH : 10 UFS : 3 UFD : 3	VTR = 0,12 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹

Cependant, en présence de nitrates, nitrites ou de NO_x, la MOR forme, de manière endogène jusqu'à 19 % de NMOR (cf. § 3.5.6).

En 2012, l'Anses a établi une VTR sans seuil par voie orale pour la NMOR de 4,0 (mg.kg pc⁻¹.j⁻¹)⁻¹, en considérant comme effet critique l'augmentation de l'incidence des carcinomes hépatocellulaires (Tableau VI - Anses 2012).

Tableau VI. VTR sans seuil par voie orale pour la N-nitrosomorpholine (Anses 2012).

Effet critique (étude clé)	Dose critique	VTR
Carcinomes hépatocellulaires chez le rat F344 femelle (Lijinsky <i>et al.</i> (1988) : Étude de cancérogénèse chez le rat F344 femelle)	BMD _{10%} L _{95%} = 0,147 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ <u>Ajustement temporel</u> BMD _{10%} L _{95%} ADJ = 0,10 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{10%} L _{95%} HED = 0,025 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	Après extrapolation linéaire à l'origine ERU = 4,0 (mg.kg pc⁻¹.j⁻¹)⁻¹ 25 ng.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ pour un ERI de 10 ⁻⁴ 2,5 ng.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ pour un ERI de 10 ⁻⁵ 0,25 ng.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ pour un ERI de 10 ⁻⁶

ERI : excès de risque individuel

En considérant un taux de formation endogène de 19 %, une exposition à la MOR égale à la VTR de 0,12 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ équivaut à une exposition à 22,8 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de NMOR. En se basant sur l'excès de risque unitaire (ERU) construit par l'Anses (2012), cette valeur correspond à un excès de risque individuel (ERI) de cancer induit par la NMOR d'environ 10⁻¹. De ce fait, **le CES VSR n'a pas retenu la VTR de 0,12 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ établie à partir des données de la MOR.**

Plusieurs études ont investigué les effets cancérogènes de la MOR en présence de nitrite de sodium (pouvant induire la formation de NMOR) et ont mis en évidence des tumeurs hépatiques et pulmonaires (Greenblatt, Mirvish, et So 1971, Mirvish *et al.* 1976, Shank et Newberne 1976, Mirvish *et al.* 1983, Kitano *et al.* 1997). Par ailleurs, mole pour mole, les apports de nitrates et nitrites sont toujours excédentaires par rapport à ceux de MOR, ce qui constitue des conditions favorables à la formation de NMOR. Ainsi, malgré le fait que la MOR ne soit pas classée quant à son pouvoir cancérogène pour l'Homme (groupe 3) du fait de l'absence de donnée chez l'Homme et de données insuffisantes chez l'animal (CIRC 1999), **le CES VSR a décidé d'élaborer une valeur toxicologique indicative (VTi) sans seuil pour la MOR sur la base de la toxicité de la NMOR formée de manière endogène.**

« Une VTi est un repère toxicologique indicatif moins robuste qu'une VTR, présentant un niveau de confiance faible, et pouvant être utilisé pour l'évaluation des risques. À la différence d'une VTR, une VTi ne devra être utilisée que pour répondre à la situation et au contexte spécifiques qui ont justifié sa construction » (Anses 2017).

Ainsi, considérant une formation endogène de 19 % de NMOR et l'ERU de 4,0 (mg.kg pc⁻¹.j⁻¹)⁻¹ pour la NMOR, l'excès de risque unitaire indicatif (**ERUi**) pour la MOR est de **0,76 (mg.kg pc⁻¹.j⁻¹)⁻¹** (soit 19 % de l'ERU de la NMOR), ce qui correspond à des doses de :

- **132 ng.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour un ERI de 10⁻⁴,**
- **13,2 ng.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour un ERI de 10⁻⁵,**
- **1,32 ng.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour un ERI de 10⁻⁶.**

3.7. Évaluation des risques sanitaires liés à la présence de morpholine dans les EDCH

3.7.1. Valeurs guides dans les EDCH

3.7.1.1. Valeur guide indicative pour la morpholine dans les EDCH

À partir de l'ERUi après exposition par voie orale de $0,76 \text{ (mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1})^{-1}$ précédemment calculé pour la MOR, et considérant un scénario d'exposition correspondant à une consommation vie entière de 2 L.j^{-1} d'EDCH pour un individu adulte d'une masse de 70 kg, **les valeurs guides indicatives (VGi) dans l'EDCH sont de :**

- **46 ng.L⁻¹ pour un ERI de 10⁻⁶ ;**
- **460 ng.L⁻¹ pour un ERI de 10⁻⁵.**

3.7.1.2. Rappel sur la valeur guide de la N-nitrosomorpholine dans les EDCH

L'Anses (2012) indique : « À partir de l'ERU par voie orale de $4 \text{ (mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1})^{-1}$ précédemment calculé, et considérant un scénario d'exposition correspondant à une consommation vie entière de 2 L.j^{-1} d'EDCH pour un individu adulte d'une masse de 70 kg :

- *La valeur limite dans l'EDCH associée à un excès de risque individuel (ERI) de 10⁻⁶ qui est la valeur retenue habituellement par les agences nord-américaines, serait de 8,8 ng.L⁻¹, valeur arrondie à 10 ng.L⁻¹ ;*
- *La valeur limite dans l'EDCH associée à un ERI de 10⁻⁵ qui est la valeur retenue habituellement par l'OMS (OMS, 2011), serait de 88 ng.L⁻¹, valeur arrondie à 100 ng.L⁻¹. »*

Dans ses conclusions, l'Anses (2012) : « estime, au regard des données toxicologiques actuelles, que la consommation journalière d'eau de boisson présentant une concentration en N-nitrosomorpholine inférieure à 100 ng.L^{-1} n'entraîne pas d'excès de risque pour la santé des consommateurs supérieur à 10^{-5} [et] considère que de nouvelles données de toxicité chronique par voie orale pourraient utilement compléter et réactualiser les données actuellement disponibles. »

Cette valeur de 100 ng.L^{-1} est utilisée par l'ARS de la zone d'étude comme concentration maximale pour la NMOR dans les EDCH.

3.7.2. Évaluation des risques sanitaires en cas de présence concomitante de morpholine et de N-nitrosomorpholine dans les EDCH

En cas de présence concomitante de MOR et de NMOR dans l'EDCH, il est nécessaire d'évaluer les risques sanitaires en prenant en compte la NMOR présente dans l'EDCH et la NMOR formée de manière endogène à partir de la MOR présente dans les EDCH, en calculant la somme des ratios :

$$\frac{C_{\text{NMOR}}}{V_{\text{GNMOR}}} + \frac{C_{\text{MOR}}}{V_{\text{GiMOR}}}, \text{ ce qui équivaut à } \frac{C_{\text{NMOR}} + 19 \% C_{\text{MOR}}}{V_{\text{GNMOR}}}$$

Avec : C_{NMOR} = concentration en NMOR dans les EDCH,

C_{MOR} = concentration en MOR dans les EDCH,

V_{GNMOR} = valeur guide pour la NMOR dans les EDCH,

V_{GiMOR} = valeur guide indicative pour MOR dans les EDCH.

Le risque sanitaire peut être considéré comme tolérable lorsque cette somme est inférieure à 1.

3.7.3. Évaluation des risques sanitaires liés à la présence de morpholine et de N-nitrosomorpholine dans les EDCH de la zone d'étude

Compte-tenu du faible nombre de données disponibles de concentrations en MOR dans les eaux distribuées (UDI), les risques sanitaires ont été évalués pour toutes les installations en service de la zone d'étude. La somme des ratios a été calculée pour chaque prélèvement à partir des concentrations synthétisées dans le Tableau III (§ 3.4.1.1.). Pour les résultats inférieurs à la limite de quantification de la MOR ou de la NMOR, la concentration a été considérée comme égale à zéro (hypothèse basse) ou égale à la limite de quantification (hypothèse haute).

Sur la base des données disponibles et des valeurs guides associées à un excès de risques individuel de 10^{-5} , le risque sanitaire est considéré comme tolérable pour toutes les installations utilisées pour l'alimentation en EDCH de la zone d'étude (sommes des ratios toujours inférieures à 1, quelle que soit l'hypothèse de substitution des résultats inférieurs à la limite de quantification considérée).

Pour l'installation alimentant une industrie agroalimentaire (TTP 2 du Tableau III), sur les 22 prélèvements effectués sur ce site, 19 sommes des ratios sont supérieures à un, quelle que soit l'hypothèse considérée. Pour ces 19 prélèvements, les concentrations en NMOR sont supérieures à 100 ng.L^{-1} . Ainsi, sur la base d'un scénario d'exposition par l'eau de boisson, le risque sanitaire ne peut être écarté pour cette installation.

3.8. Conclusions et recommandations du GT ERS EDCH et du CES « Eaux »

Considérant un taux de formation endogène de N-nitrosomorpholine à partir de la morpholine ingérée de 19 %, et l'excès de risque unitaire de $4,0 (\text{mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1})^{-1}$ pour la N-nitrosomorpholine établi par l'Anses (2012), le GT ERS EDCH et le CES « Eaux » :

- Concluent que la valeur guide indicative pour la morpholine dans l'EDCH associée à un ERI de 10^{-6} est de 46 ng.L^{-1} et celle associée à un ERI de 10^{-5} est de 460 ng.L^{-1} ;
- Recommandent d'évaluer conjointement les risques sanitaires liés à la présence de morpholine et de N-nitrosomorpholine. Pour cela, en cas de présence de morpholine ou de N-nitrosomorpholine dans des EDCH, la surveillance conjointe de ces deux paramètres devra être effectuée ;
- Rappelent que la valeur guide pour la N-nitrosomorpholine dans l'EDCH associée à un ERI de 10^{-6} est de 10 ng.L^{-1} et celle associée à un ERI de 10^{-5} est de 100 ng.L^{-1} (Anses 2012) ;
- Estiment que le risque sanitaire est tolérable quand la somme des ratios $\left[\frac{C_{\text{MOR}}}{\text{VG}_{\text{MOR}}} + \frac{C_{\text{NMOR}}}{\text{VG}_{\text{NMOR}}} \right]$ est inférieure à 1 ;
- Estiment que, pour que les résultats soient interprétables d'un point de vue sanitaire, les limites de quantification des méthodes mises en œuvre pour analyser la morpholine dans toutes les eaux doivent être au maximum d'un tiers de la valeur guide indicative proposée pour l'EDCH ;
- S'interrogent sur la possible contamination par la morpholine d'autres ressources en France en raison de ses nombreux usages.

Concernant la zone d'étude, le GT ERS EDCH et le CES « Eaux » :

- Concluent, sur la base des données transmises et des valeurs guides associées à un ERI de 10^{-5} , à un risque tolérable pour toutes les installations utilisées pour la production d'EDCH. En revanche, pour l'installation alimentant une industrie agroalimentaire, sur la base d'un scénario d'exposition par l'eau de boisson, le risque sanitaire ne peut être écarté ;
- Constatent, et déplorent, le faible nombre d'analyses réalisées dans les eaux distribuées ;

- Recommandent la surveillance conjointe de la contamination des EDCH par la morpholine et la N-nitrosomorpholine dans les ressources utilisées pour la production d'EDCH et les eaux distribuées.

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 du GT ERS EDCH et du CES « Eaux », conclusions posées à partir de valeurs guides associées à un excès de risque individuel de 10^{-5} , valeur habituellement retenue par l'OMS.

S'agissant de la surveillance de la contamination des EDCH par la morpholine et la N-nitrosomorpholine, l'Anses souligne l'intérêt d'identifier les installations classées disposant d'autorisation de rejets de morpholine comme indicateur d'un besoin accru de surveillance des ressources potentiellement impactées.

S'agissant de l'examen de la situation de l'industrie agroalimentaire, elle indique que le présent avis, repose sur un scénario qui vise à conclure sur le risque lié à la consommation d'eau en tant qu'eau de boisson, scénario qui ne prend pas en compte les modalités propres aux usages de l'eau dans cette installation particulière (nettoyage en place, refroidissement d'éléments mécaniques, lavage manuel de l'atelier, etc.).

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Morpholine - N-nitrosomorpholine - Eaux destinée à la consommation humaine - Évaluation de risques sanitaires

Morpholine - N-nitrosomorpholine - Drinking water - Health risks assessment

BIBLIOGRAPHIE**Publications**

Afssa. 2005. Avis de l'Afssa relatif à l'emploi de diverses substances dans l'eau des chaudières fournissant de la vapeur d'eau destinée à entrer au contact direct avec les denrées alimentaires - Version précisée en mars 2009 (saisine 2002-SA-0137). Maisons-Alfort: Agence française de sécurité sanitaire des aliments.

Afssa. 2007. Rapport de l'Afssa relatifs à l'évaluation des risques sanitaires liés aux situations de dépassement des limites et références de qualité des eaux destinées à la consommation humaine - Tome I (saisine n° 2003-SA-0164). Maisons-Alfort: Agence française de sécurité sanitaire des aliments.

Akyüz, M., et Ş. Ata. 2006. "Simultaneous determination of aliphatic and aromatic amines in water and sediment samples by ion-pair extraction and gas chromatography–mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1129 (1):88-94. doi: 10.1016/j.chroma.2006.06.075.

Anses. 2012. Avis de l'Anses relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de N-nitrosomorpholine dans l'eau destinée à la consommation humaine (saisine n° 2012-SA-0172). Maisons-Alfort: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

Anses. 2017. Rapport d'expertise collective relatif aux valeurs toxicologiques de référence - Guide d'élaboration de l'Anses (saisine n° 2017-SA-0016). Maisons-Alfort: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

Bae, H.-S., Y.-G. Cho, S.-E. Oh, I.-S. Kim, J. M. Lee, et S.-T. Lee. 2002. "Anaerobic degradation of pyrrolidine and piperidine coupled with nitrate reduction." *Chemosphere* 48 (3):329-334. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00018-8.

Chaboune, R., M. Sarakha, et C. Catastini. 2016. Dégradation des polluants : La N-nitrosomorpholine (NMOR), le méthyl-terbutyl éther (MTBE) et l'éthyl terbutyléther (ETBE) par des procédés d'oxydation avancée (POA). Convention de recherche ANSES 2016-CRD-01.

CIRC. 1978. N-Nitrosomorpholine. Dans *Some N-nitroso Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Lyon: Centre international de recherche sur le cancer.

CIRC. 1989. Morpholine. Dans *Monographie*. Lyon: Centre international de recherche sur le cancer.

CIRC. 1999. Morpholine. Dans *Monographie*. Lyon: Centre international de recherche sur le cancer.

Cooney, R. V., P. D. Ross, et G. L. Bartolini. 1986. "N-nitrosation and N-nitration of morpholine by nitrogen dioxide: Inhibition by ascorbate, glutathione and α -tocopherol." *Cancer Letters* 32 (1):83-90. doi: 10.1016/0304-3835(86)90042-X.

Di Marzio, W. D., M. Sáenz, J. Alberdi, M. Tortorelli, et G. Silvana. 2005. "Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61 (3):380-391. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.10.002.

ECHA. 2017. Decision on a compliance check. Morpholine. Helsinki: Agence européenne des produits chimiques.

ECHA. 2019a. "Brief Profile - Morpholine ". Agence européenne des produits chimiques, Dernière modification 03/04/2019, Consulté le 18/04/2019. <https://echa.europa.eu/fr/brief-profile/-/briefprofile/100.003.469>.

ECHA. 2019b. "Registration dossier - Morpholine ". Agence européenne des produits chimiques, Consulté le 18/04/2019. <https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/13364>.

- Edwards, G., W.-Z. Whong, et N. Speciner. 1979. "Intrahepatic mutagenesis assay: A sensitive method for detecting N-nitrosomorpholine and *in vivo* nitrosation of morpholine." *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 64 (6):415-423. doi: 10.1016/0165-1161(79)90111-0.
- EFSA. 2017. "Update: Use of the benchmark dose approach in risk assessment." *EFSA Journal* 15 (1):4658. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4658.
- Elder, R. L. 1989. "Final report on the safety assessment of morpholine." *Journal of the American College of Toxicology* 8 (4):707-748. doi: 10.3109/10915818909010528.
- Epstein, S. S., Z. M. Iqbal, et M. D. Johnson. 1980. "In vivo nitrosation of morpholine in mice by inhaled NO₂." *IARC Scientific Publications* (31):195-206.
- Garcia Roche, M. O., et D. Ziebarth. 1987. "Nitrate as a precursor of the *in vivo* formation of N-nitrosomorpholine in the stomach of guinea-pigs." *IARC Scientific Publications* (84):319-21.
- Gouvernement du Canada. 2002. "ARCHIVÉE - Sommaire de l'évaluation du danger que représente pour la santé la morpholine utilisée dans la cire servant à enrober les pommes." Consulté le 18 avril 2019. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/salubrite-aliments/information-produit/sommaire-evaluation-danger-represente-sante-morpholine-utilisee-cire-servant-enrober-pommes.html>.
- Gouvernement du Canada. 2017. Ebauche d'évaluation préalable. Composés hétérocycliques. Numéro d'enregistrement du Chemical Abstracts Service 96-45-7, 100-97-0, 110-91-8, 4174-09-8.
- Greenblatt, M., S. Mirvish, et B. T. So. 1971. "Nitrosamine studies: Induction of lung adenomas by concurrent administration of sodium nitrite and secondary amines in Swiss mice." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 46 (5):1029-1034. doi: 10.1093/jnci/46.5.1029.
- Griffiths, M. H. 1968. "The metabolism of N-triphenylmethylmorpholine in the dog and rat." *The Biochemical journal* 108 (5):731-740. doi: 10.1042/bj1080731.
- Hecht, S. S., et J. B. Morrison. 1984. "A sensitive method for detecting *in vivo* formation of N-nitrosomorpholine and its application to rats given low doses of morpholine and sodium nitrite." *Cancer Research* 44 (7):2873-2877.
- Iijima, K., J. Grant, K. McElroy, V. Fyfe, T. Preston, et K. E. L. McColl. 2003. "Novel mechanism of nitrosative stress from dietary nitrate with relevance to gastro-oesophageal junction cancers." *Carcinogenesis* 24 (12):1951-1960. doi: 10.1093/carcin/bgg168.
- INRS. 2007. Morpholine - Fiche toxicologique n°265. Dans *Base de données Fiches toxicologiques*. Paris: Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles.
- Inui, N., Y. Nishi, M. Taketomi, et T. Yamada. 1978. "A short-term, simple method for detection of N-nitrosocompounds produced from sodium nitrite and morpholine in stomach." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 81 (2):310-314. doi: 10.1016/0006-291X(78)91534-6.
- IPCS OMS. 1996. Morpholine. Dans *Environmental health criteria N°179*. Genève: International programme on chemical safety - Organisation mondiale de la santé.
- Iqbal, Z. M., K. Dahl, et S. S. Epstein. 1980. "Role of nitrogen dioxide in the biosynthesis of nitrosamines in mice." *Science* 207 (4438):1475-1477. doi: 10.1126/science.7361099.
- Kitano, M., N. Takada, T. Chen, H. Ito, T. Nomura, H. Tsuda, C. P. Wild, et S. Fukushima. 1997. "Carcinogenicity of methylurea or morpholine in combination with sodium nitrite in a rat multi-organ carcinogenesis bioassay." *Japanese Journal of Cancer Research* 88 (9):797-806. doi: 10.1111/j.1349-7006.1997.tb00454.x.
- Knapp, J. S., A. G. Calley, et J. Mainprize. 1982. "The microbial degradation of morpholine." *Journal of Applied Bacteriology* 52 (1):5-13. doi: 10.1111/j.1365-2672.1982.tb04366.x.
- Knapp, J. S., et A. J. Whytell. 1990. "The biodegradation of morpholine in river water and activated sludge." *Environmental Pollution* 68 (1):67-79. doi: 10.1016/0269-7491(90)90013-3.
- Lide, D. R. 2007. *CRC Handbook of chemistry and physics 88th edition*. Traduit par. Edité. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Lijinsky, W., R. M. Kovatch, C. W. Riggs, et P. T. Walters. 1988. "Dose-response study with N-nitrosomorpholine in drinking water of F-344 rats." *Cancer Research* 48 (8):2089-95.

- Ma, F., Y. Wan, G. Yuan, L. Meng, Z. Dong, et J. Hu. 2012. "Occurrence and source of nitrosamines and secondary amines in groundwater and its adjacent Jialu river basin, China." *Environmental Science & Technology* 46 (6):3236-3243. doi: 10.1021/es204520b.
- Mirvish, S. S., A. F. Pelfrene, H. Garcia, et P. Shubik. 1976. "Effect of sodium ascorbate on tumor induction in rats treated with morpholine and sodium nitrite, and with nitrosomorpholine." *Cancer Letters* 2 (2):101-108. doi: 10.1016/S0304-3835(76)80018-3.
- Mirvish, S. S., S. Salmasi, S. M. Cohen, K. Patil, et E. Mahboubi. 1983. "Liver and forestomach tumors and other forestomach lesions in rats treated with morpholine and sodium nitrite, with and without sodium ascorbate." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 71 (1):81-85. doi: 10.1093/jnci/71.1.81.
- Newberne, P. M., et R. C. Shank. 1973. "Induction of liver and lung tumours in rats by the simultaneous administration of sodium nitrite and morpholine." *Food and Cosmetics Toxicology* 11 (5):819-825. doi: 10.1016/0015-6264(73)90140-5.
- NICNAS. 2015. Morpholine: human health tier II assessment. Dans *Inventory multi-tiered assessment and prioritisation (IMPA)*. Australie: National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme.
- Norkus, E. P., W. A. Kuenzig, J. Chau, W. J. Mergens, et A. H. Conney. 1986. "Inhibitory effect of α -tocopherol on the formation of nitrosomorpholine in mice treated with morpholine and exposed to nitrogen dioxide." *Carcinogenesis* 7 (3):357-360. doi: 10.1093/carcin/7.3.357.
- Norkus, E.P., S. Boyle, W. Kuenzig, et W. J. Mergens. 1984. "Formation of N-nitrosomorpholine in mice treated with morpholine and exposed to nitrogen dioxide." *Carcinogenesis* 5 (5):549-554. doi: 10.1093/carcin/5.5.549.
- OCDE. 2013. SIDS initial assessment report for morpholine. Dans *Screening Information DataSet Cooperative chemicals assessment meeting 5 (CoCAM)* - Organisation de coopération et de développement économiques.
- Ohsawa, K.-I., S.-Y. Nakagawa, M. Kimura, C. Shimada, S. Tsuda, K. Kabasawa, S. Kawaguchi, et Y. F. Sasaki. 2003. "Detection of in vivo genotoxicity of endogenously formed N-nitroso compounds and suppression by ascorbic acid, teas and fruit juices." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 539 (1):65-76. doi: 10.1016/S1383-5718(03)00156-6.
- OMS. 2003. Reliable evaluation of low-level contamination of food - Addendum of the report on GEMS/Food-EURO Second Workshop of the 26-27th May 1995. Genève: Organisation mondiale de la santé.
- OMS. 2005. Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability : guidance document for use of data in dose/concentration-response assessment. Genève: Organisation mondiale de la santé.
- OMS. 2017. Guidelines for drinking-water quality - Fourth edition incorporating the first addendum. Genève: Organisation mondiale de la santé.
- Pietsch, J., F. Sacher, W. Schmidt, et H.-J. Brauch. 2001. "Polar nitrogen compounds and their behaviour in the drinking water treatment process." *Water Research* 35 (15):3537-3544. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00086-0.
- Pietsch, J., W. Schmidt, H.-J. Brauch, et E. Worch. 1999. "Kinetic and mechanistic studies of the ozonation of alicyclic amines." *Ozone: Science & Engineering* 21 (1):23-37. doi: 10.1080/01919519908547257.
- Piotrowski, A., S. Ronga, N. Aubert, M. Boize, et P.-A. Cabanes. 2014. "Pharmacokinetics and excretion balance of morpholine and its main metabolite, N-Nitroso(2-hydroxyethyl) glycine, in rats." Poster.
- Pitoy, M. M., B. M. Patterson, A. J. Furness, T. P. Bastow, et A. J. McKinley. 2011. "Fate of N-nitrosomorpholine in an anaerobic aquifer used for managed aquifer recharge: A column study." *Water Research* 45 (8):2550-2560. doi: 10.1016/j.watres.2011.02.018.
- Poupin, P., J. J. Godon, E. Zumstein, et N. Truffaut. 1999. "Degradation of morpholine, piperidine, and pyrrolidine by mycobacteria: evidences for the involvement of a cytochrome P450." *Canadian Journal of Microbiology* 45 (3):209-216. doi: 10.1139/w99-002.
- SCOEL. 1999. Recommendation from the Scientific committee on occupational exposure limits for morpholine. European Commission.
- Shank, R. C., et P. M. Newberne. 1976. "Dose-response study of the carcinogenicity of dietary sodium nitrite and morpholine in rats and hamsters." *Food and Cosmetics Toxicology* 14 (1):1-8. doi: 10.1016/S0015-6264(76)80355-0.
- Shea, T. E. 1939. "The acute and sub-acute toxicity of morpholine." *Journal of industrial hygiene and toxicology* 21 (7):236-245.

- Shibata, M. A., Y. Kurata, T. Ogiso, S. Tamano, S. Fukushima, et N. Ito. 1987. "Combined chronic toxicity and carcinogenicity studies of morpholine oleic acid salt in B6C3F1 mice." *Food and Chemical Toxicology* 25 (8):569-574. doi: 10.1016/0278-6915(87)90016-0.
- Shibata, M. A., Y. Kurata, S. Tamano, T. Ogiso, S. Fukushima, et N. Ito. 1987. "13-week subchronic toxicity study with morpholine oleic acid salt administered to B6C3F1 mice." *Journal of Toxicology and Environmental Health* 22 (2):187-194. doi: 10.1080/15287398709531062.
- Smyth, H. F., Jr., C. P. Carpenter, C. S. Weil, et U. C. Pozzani. 1954. "Range-finding toxicity data: list V." *AMA Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine* 10 (1):61-8.
- Sohn, O. S., E. S. Fiala, C. C. Conaway, et J. H. Weisburger. 1982a. "Metabolism and disposition of morpholine in the rat, hamster, and guinea pig." *Toxicology and Applied Pharmacology* 64 (3):486-491. doi: 10.1016/0041-008X(82)90246-0.
- Sohn, O. S., E. S. Fiala, C. C. Conaway, et J. H. Weisburger. 1982b. "Separation of morpholine and some of its metabolites by high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 242 (2):374-380. doi: 10.1016/S0021-9673(00)81717-3.
- Tanaka, A., T. Tokieda, S. Nambaru, M. Ōsawa, et T. Yamaha. 1978. "Excretion and distribution of morpholine salts in rats." *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 19 (3):329. doi: 10.3358/shokueishi.19.329.
- Tekle-Röttering, A., K. S. Jewell, E. Reisz, H. V. Lutze, T. A. Ternes, W. Schmidt, et T. C. Schmidt. 2016. "Ozonation of piperidine, piperazine and morpholine: Kinetics, stoichiometry, product formation and mechanistic considerations." *Water Research* 88:960-971. doi: 10.1016/j.watres.2015.11.027.
- US EPA. 2006. Harmonization in interspecies extrapolation: Use of BW^{3/4} as a default method in derivation of the oral RfD - Risk assessment forum technical paper. Washington DC: U.S. Environmental protection agency.
- Van Stee, E. W., R. A. Sloane, J. E. Simmons, et K. D. Brunnemann. 1983. "In vivo formation of N-nitrosomorpholine in CD-1 mice exposed by inhalation to nitrogen dioxide and by gavage to morpholine." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 70 (2):375-9.
- Van Stee, E. W., R. A. Sloane, J. E. Simmons, M. P. Moorman, et K. D. Brunnemann. 1995. "Endogenous formation of N-nitrosomorpholine in mice from 15NO₂ by inhalation and morpholine by gavage." *Carcinogenesis* 16 (1):89-92. doi: 10.1093/carcin/16.1.89.
- Van Stee, E. W., P. C. Wynns, et M. P. Moorman. 1981. "Distribution and disposition of morpholine in the rabbit." *Toxicology* 20 (1):53-60. doi: 10.1016/0300-483X(81)90105-0.
- Vrillet, G., et J. Arcé. 2014. "Solution UVGEMMI pour lutter contre la pollution aux nitrosamines : cas de la nitrosomorpholine dans une STEP industrielle." Journées Information Eaux Poitiers.
- Wang, W., S. Ren, H. Zhang, J. Yu, W. An, J. Hu, et M. Yang. 2011. "Occurrence of nine nitrosamines and secondary amines in source water and drinking water: Potential of secondary amines as nitrosamine precursors." *Water Research* 45 (16):4930-4938. doi: 10.1016/j.watres.2011.06.041.
- Winter, J. W., S. Paterson, G. Scobie, A. Wirz, T. Preston, et K. E. L. McColl. 2007. "N-Nitrosamine generation from ingested nitrate via nitric oxide in subjects with and without gastroesophageal reflux." *Gastroenterology* 133 (1):164-174. doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.047.
- Zhao, Y.-Y., J. M. Boyd, M. Woodbeck, R. C. Andrews, F. Qin, S. E. Hrudey, et X.-F. Li. 2008. "Formation of N-Nitrosamines from eleven disinfection treatments of seven different surface waters." *Environmental Science & Technology* 42 (13):4857-4862. doi: 10.1021/es7031423.

Norme

NF X 50-110 (mai 2003) Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

Législation et réglementation

Arrêté du 11 janvier 2007 modifié relatif au programme de prélèvements et d'analyses du contrôle sanitaire pour les eaux fournies par un réseau de distribution, pris en application des articles R. 1321-10, R. 1321-15 et R. 1321-16 du code de la santé publique

Règlement (CE) n°2032/2003 de la Commission du 4 novembre 2003 concernant la seconde phase du programme de travail de dix ans visé à l'article 16, paragraphe 2, de la directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits biocides, et modifiant le règlement (CE) no 1896/2000

Règlement (CE) n°1907/2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), et instituant une agence européenne des produits chimiques

Règlement (CE) n°1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n o 1907/2006

Règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques

ANNEXE 1 - PRESENTATION DES INTERVENANTS

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GT ÉVALUATION DES RISQUES SANITAIRES ASSOCIES AUX PARAMETRES CHIMIQUES DES EAUX DESTINEES A LA CONSOMMATION HUMAINE (2017-2020)

Président

M. Yves LÉVI - Professeur, Université Paris Sud - Santé publique et environnementale, qualité des eaux

Membres

M. Edmond CREPPY - Professeur, Université de Bordeaux - Toxicologie

M. Fabrice DASSONVILLE - Ingénieur du génie sanitaire, ARS PACA - Réglementation sur l'eau - Santé environnementale - Gestion des risques sanitaires

M. Joseph DE LAAT - Professeur, Université de Poitiers - Chimie de l'eau, génie des procédés, chimie réactionnelle

Mme Laetitia KNOCKAERT Référente pharmacie, Collège des Hautes Études en Médecine - Toxicologie, hépatotoxicité

M. Patrick LEVALLOIS - Médecin spécialiste, Institut national de santé publique du Québec - Épidémiologie, santé environnementale, évaluation des risques sanitaires

M. Benjamin LOPEZ - Chef de projet, BRGM - Hydrogéologie, ressources en eau, modélisation.

M. Jean-Michel MAIXENT - Professeur, Université de Poitiers - Biochimie et mécanisme cellulaire, toxicocinétique

M. Daniel PERDIZ - Maître de conférences, Université Paris Sud - Toxicologie, génotoxicité

M. Christophe ROSIN - Laboratoire d'Hydrologie de Nancy, Anses - Chimie analytique, contrôle sanitaire des eaux

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT - Professeur, Université Clermont Auvergne - Santé publique, santé environnementale, épidémiologie

Mme Bénédicte WELTÉ - Retraitée - Produits et procédés de traitement de l'eau, filières, chimie de l'eau

RAPPORTEURS POUR LA PARTIE TOXICOLOGIE ET VALEUR TOXICOLOGIQUES DE REFERENCE AUPRES DU CES VSR

M. Marc BARIL - Professeur associé à l'Université de Montréal - Chimiste toxicologue, hygiène industrielle

M. Jean-Michel MAIXENT - Professeur, Université de Poitiers - Biochimie et mécanisme cellulaire, toxicocinétique

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

■ CES « Eaux » - 9 avril et 11 juin 2019

Président

M. Gilles BORNERT - Chef de service, Groupe vétérinaire des armées de Rennes - Microbiologie, réglementation, situations dégradées, water defense.

Membres

Mme Claire ALBASI - Directrice de recherche / Docteur ingénieur - UMR 5503, Laboratoire de génie chimique, CNRS-INPT-UPS, Toulouse - Produits et procédés de traitement de l'eau dont membranes, assainissement, chimie de l'eau, utilisation de ressources en eau alternatives.

Mme Sophie AYRAULT - Chef d'équipe / Docteur habilité à diriger des recherches, CEA, Gif-sur-Yvette - Géochimie des métaux dans l'environnement.

M. Jean BARON - Directeur adjoint de la Direction de la recherche & développement et de la qualité de l'eau / Ingénieur de recherche, Eau de Paris - Matériaux au contact de l'eau, produits et procédés de traitement de l'eau (filiales de traitement), corrosion.

M. Jean-Luc BOUDENNE - Professeur - Université Aix-Marseille - Métrologie des eaux, chimie et qualité des eaux. Laboratoire Chimie de l'environnement.

Mme Corinne CABASSUD - Professeure - INSA, Toulouse - Laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés, UMR INSA-CNRS-INRA - Produits et procédés de traitement de l'eau dont membranes, chimie de l'eau.

Mme Véronique CARON - Expert médical en santé au travail - INRS - Médecin du travail en charge du risque biologique (zoonotique) et milieu de travail.

M. Jean CARRÉ - Retraité, Docteur en sciences - Hydrogéologie, ressources en eau, périmètres de protection des captages et expérience terrain.

Mme Hélène CELLE-JEANTON - Professeure - Université Franche Comté - Hydrogéologie, hydrogéochimie.

M. Nicolas CIMETIÈRE - Enseignant chercheur - Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes - Analyse et traitement des eaux (EDCH, micropolluants organiques).

M. Christophe DAGOT - Directeur adjoint / Professeur - ENSIL, Limoges - Eaux usées, procédés de traitement, Antibiorésistance, environnement, utilisation de ressources en eau alternatives.

Mme Isabelle DUBLINEAU - Chargée de mission auprès du directeur de la radioprotection de l'Homme / Docteur habilité à diriger des recherches - IRSN, Fontenay-aux-Roses - Toxicologie, Radioéléments.

M. Johnny GASPÉRI - Chercheur - Université Paris Est Créteil - LEESU - Micropolluants organiques, eaux urbaines, eaux de surface, traitements des eaux usées.

M. Jean-Louis GONZALEZ - Chercheur HDR - IFREMER - Milieu marin, contaminants chimiques, spéciation, modélisation, échantillonnages passifs.

M. Jean-François HUMBERT - Directeur de recherche / Docteur habilité à diriger des recherches - UMR BIOENCO, INRA, Paris - Microbiologie de l'eau dont cyanobactéries, écologie microbienne.

M. Frédéric HUNEAU - Chef du département Géologie Hydrogéologie - Université de Corse - Hydrogéologie, hydrogéochimie.

M. Yves LÉVI - Professeur de santé publique et environnement - Université Paris Sud - Santé publique, Santé environnement, polluants émergents, évaluation de risques sanitaires, écologie microbienne.

M. Laurent MOULIN - Responsable recherche et développement - Eau de Paris - Microbiologie, virologie, traitements de désinfection, amibes.

M. Daniel PERDIZ - Maître de conférences / Pharmacien toxicologue - Université Paris 11 Sud - Toxicologie, génotoxicité, perturbateurs endocriniens dans l'eau.

Mme Fabienne PETIT - Enseignant chercheur / Professeur - Université de Rouen / UMR CNRS M2C - Écologie microbienne.

M. Mohamed SAKAKHA - Professeur - Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal - Produits et procédés de traitement de l'eau, photochimie, oxydation avancée, chimie réactionnelle de l'eau.

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT - Professeur, Université Clermont Auvergne - Santé publique, santé environnementale, épidémiologie

Mme Anne TOGOLA - Chef de projet de recherche, BRGM - Micropolluants organiques, chimie analytique, eaux souterraines

Mme Michèle TREMBLAY - Docteur en médecine spécialiste en santé communautaire / Médecin conseil en santé au travail et en maladies infectieuses - Institut de santé publique du Québec / Direction de santé publique de Montréal - Santé travail, microbiologie de l'eau.

Mme Michèle VIALETTE - Chef de service / Docteur habilité à diriger des recherches, Institut Pasteur de Lille - Microbiologie de l'eau dont virologie.

Mme Bénédicte WELTÉ - Retraitée, Docteur en sciences - Produits et procédés de traitement de l'eau (tous procédés, filières de traitement).

■ **CES « Valeurs sanitaires de référence » - 22 juin et 30 novembre 2018, 24 janvier, 21 mars et 9 mai 2019**

Président

M. Fabrice MICHIELS - Médecin du travail / toxicologue à l'Association Interentreprises pour la Santé au Travail 19 - Médecine du travail, toxicologie

Vice-président

M. Raymond VINCENT - Retraité (anciennement Chargé de mission à la Direction Déléguée aux Applications (INRS)) - Chimie, métrologie des polluants, évaluation des risques professionnels

Membres

M. Marc BARIL - Professeur associé à l'Université de Montréal - Chimiste toxicologue, hygiène industrielle

M. Stéphane BINET - Pharmacien toxicologue à la Direction des Études et Recherches à l'INRS - Toxicologie générale et industrielle

Mme Michèle BISSON - Responsable d'étude à l'INERIS - Pharmacien toxicologue, toxicologie générale

Mme Anne CHEVALIER - Retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire - Épidémiologie

Mme Fatiha EL-GHISSASSI - Scientifique, Section des Monographies du CIRC (IMO). Centre International de Recherche sur le Cancer - Biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

Mme Mounia EL-YAMANI - Responsable d'unité à Santé publique France - Biochimie, toxicologie

M. Claude EMOND - Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal - Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Rex FITZGERALD - Expert en toxicologie réglementaire au Centre Suisse de Toxicologie Humaine Appliquée - Toxicologie de la reproduction, neurotoxicité du développement, évaluation des risques humains

M. Robert GARNIER - Médecin toxicologue, Centre antipoison de Paris - Toxicologie médicale, médecine du travail

Mme Perrine HOET - Professeur à l'Université Catholique de Louvain. IREC - Médecine, toxicologie industrielle et environnementale

Mme Yuriko IWATSUBO - Médecin épidémiologiste à Santé publique France - Épidémiologie des risques professionnels

Mme Cécile KAIRO - Évaluateur de risques sanitaires à Santé publique France - Santé environnementale, toxicologie générale et évaluation des risques

Mme Laila LAKHAL - Ingénieur INRA unité Toxalim - Toxicologie, métabolisme, perturbateurs endocriniens

M. Frédéric LIRUSSI - Maître de Conférences des Universités- Praticien Hospitalier (MCU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé et CHU de Dijon - Toxicologie clinique, toxicologie analytique, immunité Innée, reprotoxicité

Mme Anne MAITRE - Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (PU-PH) au Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, CHU de Grenoble ; Responsable de l'équipe « Environnement et prédiction de la santé des populations », Laboratoire TIMC, Université Grenoble Alpes - Médecine, toxicologie, IBE, métrologie des polluants, hygiène industrielle

Mme Anne PLATEL - Maître de conférences à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille - Laboratoire de Toxicologie Génétique, Institut Pasteur de Lille - Toxicologie, génotoxicité, QSAR

M. Henri SCHROEDER - Professeur associé à la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lorraine- Laboratoire CALBINOTOX, EA 7488 - Pharmacien neurobiologiste - Neurotoxicité, polluants environne taux, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

M. Olivier SORG - Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève - Biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie

M. Jérôme THIREAU - Chargé de recherche au CNRS - Physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

M. Claude VIAU - Professeur titulaire retraité, actuellement Professeur associé du Département de santé environnemental et santé au travail, École de santé publique à l'université de Montréal - Toxicologie, indicateurs biologiques d'exposition, hygiène industrielle, métrologie des polluants

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifique

Mme Morgane BACHELOT - Coordinatrice d'expertise scientifique - Unité d'évaluation des risques liés à l'eau - Anses

Contribution scientifique

Mme Aurélie MATHIEU - Coordinatrice d'expertise scientifique - Unité d'évaluation des substances chimiques - Anses

Mme Pascale PANETIER - Chef de l'unité d'évaluation des risques liés à l'eau - Anses

Secrétariat administratif

Mme Virginie SADE - Anses

ANNEXE 2 - SIGLES ET ABREVIATIONS

AEP : Unité de distribution collective publique

Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

ALI : Entreprise agroalimentaire

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

ARS : Agence régionale de santé

CAP : Captage d'eau destinée à la consommation humaine

CES : Comité d'experts spécialisé

COT : Carbone organique total

DGS : Direction générale de la santé

DJA : Dose journalière admissible

DL50 : Dose létale médiane

ECHA : Agence européenne des produits chimiques (European chemicals agency)

EDCH : Eau destinée à la consommation humaine

ERI : Excès de risque individuel

ERS : Évaluation des risques sanitaires

ERS EDCH : Évaluation des risques sanitaires associés aux paramètres chimiques des eaux destinées à la consommation humaine

ERU : Excès de risque unitaire

ERUi : Excès de risque unitaire indicatif

ESO : Eau souterraine

ESU : Eau de surface

GT : Groupe de Travail

HB : Hypothèse « basse » selon laquelle les données censurées ont été remplacées par la valeur zéro pour un scénario dit « minimaliste »

HH : Hypothèse « haute » selon laquelle les données censurées ont été remplacées par la valeur de la LQ renseignée par le laboratoire pour un scénario dit « maximaliste »

INRS : Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles

IP : Intrapéritonéale

IV : Intraveineuse

LHN : Laboratoire d'hydrologie de Nancy (Anses)

LQ : Limite de quantification

MCA : Mélange de captages

MES : Matières en suspension

MOR : Morpholine

NMOR : N-nitrosomorpholine

NOAEL : Dose sans effet nocif observé (No observed adverse effect level)

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

OMS : Organisation mondiale de la santé

PRV : Unité de distribution collective privée

REACH : Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques (Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals).

SIDS : Screening information dataset

UDI : Unité de distribution d'eau destinée à la consommation humaine

UDL : UDI logique

UE : Union européenne

US EPA : United States environmental protection agency

UV : Ultraviolet

VGi : Valeur guide indicative

VSR : Valeur sanitaire de référence

VTi : Valeur toxicologique indicative

VTR : Valeur toxicologique de référence

ANNEXE 3 - CARACTERISTIQUES DES EXTRACTIONS

■ Caractéristiques de l'extraction Naïades

L'extraction de la base de données Naïades (www.naiades.eaufrance.fr) a été réalisée le 18 janvier 2019. Elle porte sur l'ensemble des données qualifiées de « correctes », quel que soit leur statut, disponibles dans la base pour le paramètre MOR (code sandre 7475) entre le 1^{er} janvier 2013 et le 31 décembre 2018.

L'extraction a fourni 9 951 résultats d'analyses, correspondant à 9 929 opérations de prélèvement, effectuées entre janvier 2014 et août 2018. Compte tenu de la date de la requête, les données produites en 2018 ne sont probablement pas toutes renseignées dans la base et/ou qualifiées lors de l'extraction.

L'ensemble des résultats obtenus concerne la matrice « eau ». 9 826 analyses ont été réalisées sur l'eau brute et 125 sur la « phase aqueuse de l'eau (filtrée, centrifugée...) ».

Les résultats proviennent de 707 stations de mesure réparties sur deux des sept bassins hydrographiques métropolitains : Seine-Normandie (2 092 résultats) et Rhône-Méditerranée-Corse (7 759 résultats).

■ Caractéristiques de l'extraction SISE-Eaux

Deux extractions de la base de données SISE-Eaux ont été réalisées, à la demande de l'Anses, par le Pôle d'Administration des Données sur l'Eau du ministère chargé de la santé (PADSE) afin d'obtenir les résultats d'analyse pour le paramètre MOR entre 2013 et 2017 dans :

- Les ressources utilisées pour la production des EDCH en France,
- Les EDCH distribuées en France.

Les caractéristiques de ces extractions sont présentées dans le Tableau VII.

L'extraction relative aux ressources utilisées pour la production des EDCH en France a fourni 1 302 résultats d'analyses de la MOR dans 22 captages (pas de mélange de captages). Celle relative à l'EDCH distribuée a fourni 48 résultats d'analyses relatifs à la MOR dans 12 unités de distribution. Les résultats proviennent tous de la Seine-Maritime, département où est située la zone d'étude objet de cette saisine. Ils concernent uniquement des unités de distribution collectives publiques produisant de l'EDCH à partir d'eau souterraine.

Tableau VII. Caractéristiques des extractions de la base SISE-Eaux demandées dans le cadre de cette saisine.

	Ressources utilisées pour la production des EDCH	EDCH distribuées
Zone	France (métropole et DROM)	France (métropole et DROM)
Période	2013 à 2017	2013 à 2017
Paramètre	Morpholine + N-nitrosomorpholine	Morpholine + N-nitrosomorpholine
Usage	Unités de distribution collectives publiques (AEP) + Unités de distribution collectives privées (PRV)	Unités de distribution collectives publiques (AEP) + Unités de distribution collectives privées (PRV)
Types d'installation	Captage (CAP) et mélange de captage (MCA)	Unité de distribution (UDI) ou à défaut, installation amont de niveau 1 (UDI logique : UDL)
Sélection des installations	Au moins une mesure de morpholine l'année considérée	Au moins une mesure de morpholine l'année considérée
État des installations	Actives l'année du prélèvement	Actives l'année du prélèvement
Type d'eau	Eau brute souterraine (B), eau brute superficielle de catégorie A1 (A1), eau brute superficielle de catégorie A2 (A2), eau brute superficielle de catégorie A3 (A3)	Eau distribuée sans désinfection (S), eau distribuée après désinfection (T), eau distribuée après traitement (T1, T2, T3)*
Motif du prélèvement	Tous	Tous
Date de l'extraction	21/08/2018	21/08/2018
Représentativité	Tout sauf non	Tout sauf non

* T1 : eaux souterraines provenant de milieux fissurés ou non et ne présentant pas de turbidité périodique importante et supérieure à 2 NFU en sortie de production ; T2 : eaux souterraines et superficielles provenant de milieux fissurés et présentant une turbidité périodique importante et supérieure à 2 NFU pour lesquelles le débit de production est supérieur à 1000 m³.j⁻¹; T3 : eaux souterraines et superficielles provenant de milieux fissurés et présentant une turbidité périodique importante et supérieure à 2 NFU pour lesquelles le débit de production est inférieur à 1 000 m³.j⁻¹.

■ Traitement de données

Selon les recommandations établies par l'OMS dans le cadre des évaluations du risque sanitaire, deux hypothèses de traitement de la censure « à gauche »⁶ ont été considérées : l'hypothèse basse (HB) et l'hypothèse haute (HH) (OMS 2003).

Dans le scénario HB, les données censurées ont ainsi été remplacées par zéro (scénario minimaliste) tandis que dans le scénario HH, elles ont été remplacées par la limite analytique annoncée par le laboratoire ayant pratiqué l'analyse (limite de détection (LD) ou limite de quantification (LQ)) (scénario maximaliste).

⁶ Les données dites « censurées à gauche » correspondent à des concentrations inférieures à la limite analytique du laboratoire, donc non quantifiées voire non détectées.

ANNEXE 4 : PROFIL TOXICOLOGIQUE DE LA MORPHOLINE

La synthèse des données toxicologiques a été rédigée par le CES VSR sur la base des rapports publiés par des organismes reconnus au niveau international (CIRC 1989, IPCS OMS 1996, CIRC 1999, Gouvernement du Canada 2002, OCDE 2013, Gouvernement du Canada 2017) et de revue (Elder 1989) complétés par une recherche bibliographique sur Scopus et Pubmed en utilisant les mots clés « *morpholine* » et « *effect* ».

Dans le profil toxicologique, le terme morpholine correspond à la morpholine sous forme de base.

1. Toxicocinétique**a. Absorption**

Chez les rongeurs, la MOR est absorbée après exposition par voie orale, cutanée ou respiratoire (CIRC 1989, IPCS OMS 1996). D'après les concentrations en chlorhydrate de MOR retrouvées dans l'urine suite à une exposition par voie orale chez des rats Wistar, l'absorption devrait être d'au moins 90 % (Tanaka *et al.* 1978).

b. Distribution

Chez le rat, la MOR est distribuée dans différents organes (estomac, intestins, foie, reins, muscles, poumons, *etc.*).

Tanaka *et al.* (1978) ont étudié la distribution de ¹⁴C-morpholine-HCl chez des rats Wistar mâles (n = 3/groupe) après administration par voie orale (200 mg.kg⁻¹) et par voie intraveineuse (IV) (150 mg.kg⁻¹). Chez des rats sacrifiés 2 h après une administration orale de morpholine-HCl, 29 % de la radioactivité est retrouvée dans l'intestin et 26 % dans le muscle. De même, 2 h après l'injection IV, 19 et 27 % de la dose ont été retrouvés, respectivement dans l'intestin et le muscle (Tanaka *et al.* 1978).

Chez des rats exposés par voie orale à la dose de 250 mg.kg⁻¹, 24 heures après l'exposition, la MOR se distribue dans l'estomac, l'intestin, le foie, les reins et le sang selon des % de radioactivité respectivement de 1,1 %, 0,49 %, 0,05 %, 0,05 % et 0,64 % (Ohnishi 1984 cité par Elder 1989).

Van Stee, Wynns, et Moorman (1981) ont injecté à six lapins mâles New Zealand par voie IV 435 mg.kg⁻¹ de ¹⁴C-morpholine. Après 30 minutes, les concentrations les plus élevées se trouvaient dans les reins (zone médullaire : 36 µmol.g⁻¹ et zone corticale : 15,4 mmol.g⁻¹), suivis des poumons (5,1 µmol.g⁻¹), du foie (4,7 µmol.g⁻¹) et du sang (2,3 µmol.L⁻¹). La MOR n'était pas liée aux protéines sériques.

Des lapines New Zealand (nombre non indiqué) ont été exposées à la MOR (905 mg.m⁻³) pendant 5 h par inhalation (« nose only ») (Tombropoulos 1979 cité par IPCS OMS 1996). À la fin de l'exposition, les animaux ont été sacrifiés et les tissus et liquides corporels ont été analysés. Les concentrations de MOR étaient les plus élevées dans l'urine (324 mg.L⁻¹) et les reins (118 mg.kg⁻¹), les autres tissus ayant des concentrations inférieures à 40 mg.kg⁻¹.

c. Métabolisme

La MOR absorbée est principalement excrétée sous forme inchangée chez le rat, la souris, le hamster et le lapin, quelle que soit la voie d'administration (Griffiths 1968, Tanaka *et al.* 1978, Van Stee, Wynns, et Moorman 1981, Sohn *et al.* 1982a). Plusieurs études rapportent que la MOR est lentement métabolisée chez le rat (Maller *et Heidelberg* 1957, Ohnishi 1984 cités par Elder 1989 ; Tanaka *et al.* 1978, Sohn *et al.* 1982a), le chien (Rhodes *et Case* 1977 cité par Elder 1989) et le lapin (Van Stee, Wynns, et Moorman 1981). En revanche, chez le cobaye, la MOR est métabolisée par N-méthylation puis par N-oxydation (Sohn *et al.* 1982b, a). Après injection intrapéritonéale (IP)

de 125 mg.kg⁻¹ de ¹⁴C-morpholine, un métabolite urinaire représentant 20-46 % de la dose administrée a été identifiée, le N-méthylmorpholine-N-oxyde (Sohn *et al.* 1982b, a). La MOR est métabolisée dans une moindre mesure par N-méthylation chez le rat et le hamster : la N-méthylmorpholine-N-oxyde représente 1-6 % de la dose administrée (Sohn *et al.* 1982b). Cependant, le cycle de la MOR peut être clivé chez les mammifères comme le montrent plusieurs études chez le rat sur le métabolisme des dérivés de la MOR (Tatsumi *et al.* 1975, Hecht *et Young* 1981, Kamimura *et al.* 1987 cités par IPCS OMS 1996).

d. Excrétion

La principale voie d'excrétion de la MOR est urinaire. Chez des rats Wistar mâles, plus de 85 % d'une dose orale ou IV de morpholine-HCl est excrétée dans l'urine dans les premières 24 h, et ensuite jusqu'à 5 % dans les 3 jours suivants. L'élimination du palmitate de ¹⁴C-morpholine est plus lente, mais l'excrétion urinaire dans les 3 jours suivant l'administration orale a atteint 90 % de la dose (Tanaka *et al.* 1978). L'administration de MOR radioactive chez le rat par voie orale montre qu'entre 62 à 77,5 % de MOR sont excrétés dans l'urine après 24 h (Griffiths 1968, Ohnishi 1984 cité par Elder 1989, IPCS OMS 1996). Après administration IP de MOR à des rats, l'excrétion urinaire dans les 24 heures était de 87,8 % de la dose (Maller *et Heidelberger* 1957 cité par Elder 1989, IPCS OMS 1996). Chez le chien, 70-80 % de la MOR radioactive ont été excrétés dans l'urine (Rhodes *et Case* 1977 cité par IPCS OMS 1996).

La vitesse d'excrétion varie selon l'espèce animale. Sohn *et al.* (1982b) ont comparé l'évolution temporelle de l'excrétion urinaire par des rats Sprague-Dawley, des hamsters dorés syriens et des cobayes traités à la ¹⁴C-morpholine. Bien que chez les trois espèces, plus de 80 % aient été excrétés en 3 jours, le taux d'excrétion urinaire au cours des 6 premières heures était le plus élevé chez le hamster, suivi du rat et le moins élevé chez le cobaye.

La vitesse d'excrétion varie également en fonction du pH : l'excrétion est augmentée si la molécule est neutralisée avant exposition par addition d'acide. Van Stee, Wynns, et Moorman (1981) ont perfusé par voie IV de la ¹⁴C-morpholine (5 mmol.kg⁻¹) neutralisée par HCl. Après 4h, 18,5 % de la dose était excrétée dans l'urine. Une diminution du pH de l'urine de 7,8-7,9 à 7,1-7,2 par administration de chlorure d'ammonium (10 g.L⁻¹) dans l'eau de boisson avant l'injection, double l'excrétion urinaire à 43 % (Van Stee, Wynns, et Moorman 1981).

La MOR est très faiblement éliminée dans les fèces. Les rats ayant reçu du chlorhydrate de MOR par voie orale ou par IV n'ont pas excrété plus de 1,9 % de la dose dans les fèces (Griffiths 1968, Tanaka *et al.* 1978, Sohn *et al.* 1982a). Jusqu'à 7 % de palmitate de MOR administré par voie orale a été excrété dans les fèces (Tanaka *et al.* 1978 ; Ohnishi 1984 cité par IPCS OMS 1996).

L'élimination de la MOR administrée par voie IP dans l'air expiré sous forme de CO₂ est faible : 0,5 % chez le rat et 0,0008 % chez le lapin (Van Stee, Wynns, et Moorman 1981, Sohn *et al.* 1982a).

Après injection IP de ¹⁴C-morpholine (125 mg.kg⁻¹ dans 0,9 % de NaCl), l'élimination plasmatique est biphasique chez le rat Sprague-Dawley, le hamster doré syrien et le cobaye. L'élimination est significativement plus faible chez le cobaye ($t_{1/2 \text{ élimination}} = 300 \text{ min}$) que chez le rat ($t_{1/2 \text{ élimination}} = 115 \text{ min}$) et le hamster ($t_{1/2 \text{ élimination}} = 120 \text{ min}$) (Sohn *et al.* 1982a).

2. Toxicité aiguë

a. Effets aigus et subaigus

i. Données chez l'Homme

Aucune donnée chez l'Homme n'a été identifiée.

ii. Données chez l'animal

- **Toxicité aiguë**

Suite à une administration par voie orale, la DL₅₀ était de 1 - 2 g.kg pc⁻¹ chez des rats (Shea 1939, Smyth *et al.* 1954 ; BASF 1967, Huntsman 1981 cités par Elder 1989, IPCS OMS 1996, ECHA 2019b) et de 0,9 g.kg pc⁻¹ chez des cobayes (Shea 1939) (Tableau VIII).

Dans une étude préliminaire, des doses uniques de 0,1 à 10 g.kg⁻¹ de MOR non diluée et non neutralisée ont été administrées par voie orale à des rats et des cobayes Shea 1939. Les animaux recevant les doses les plus fortes sont morts pendant ou après l'administration. Des hémorragies au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle ont été fréquemment rapportées. Des hémorragies nasales ont également été observées chez quelques animaux. Dans une seconde étude Shea 1939, la MOR a été diluée dans 4 volumes d'eau et administrée par voie orale à 57 rats et 33 cobayes. Tous les rats sont morts dans les 2 ou 3 jours après administration. Aux plus fortes doses (non indiquées), des hémorragies de l'estomac ont été observées tandis qu'à 1,6 g.kg pc⁻¹, les rats ne présentaient pas de modifications pathologiques marquées. Les cobayes décédés présentaient un collapsus complet, une prostration, une diarrhée et une hémorragie de l'estomac.

Aucun décès n'a été observé chez 7 rats mâles CFY exposés par gavage à 1 g.kg pc⁻¹ de MOR à un pH neutre (Börzsönyi *et al.* 1981 cité par IPCS OMS 1996, ECHA 2019b).

Une dose unique de 5 g.kg⁻¹ d'un cosmétique contenant 1 % de MOR et préparé sous forme de suspension à 25 % dans de l'huile de maïs a été administrée à 5 rats Harlan Wistar à jeun. Aucune toxicité n'a été observée pendant les 7 jours de l'étude (CTFA 1977 cité par Elder 1989).

Tableau VIII. DL₅₀ par voie orale (CIRC 1989, Elder 1989, IPCS OMS 1996).

Espèces	Nombre d'animaux	DL ₅₀ en g.kg pc ⁻¹	Effets rapportés	Référence
Rat Carworth-Wistar	5 femelles	1,05 (0,95 - 1,16)	Pas de donnée	Smyth <i>et al.</i> (1954)
Rat	5 mâles + 5 femelles	1,9	Dyspnée, hémorragie	BASF (1967)
Rat	57	1,6	Hémorragie gastro-intestinale	Shea (1939)
Rats Sprague-Dawley	4 mâles	1,68	Pas de donnée	Huntsman (1981)
Cobaye	33	0,9	Hémorragie gastro-intestinale, diarrhée	Shea (1939)

- **Toxicité subaiguë**

Des rats (n = 20/dose) ont été exposés par gavage, pendant 30 jours, à 0, 160, 320 et 800 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de MOR diluée (Shea 1939). À la plus forte dose, la moitié des rats étaient morts au bout de 20 administrations et présentaient une irritation intense du tractus intestinal, en particulier une congestion de l'estomac. Les rats présentaient une léthargie, des tremblements plus ou moins sévères et une perte de masse corporelle les deux semaines après la 1^{ère} administration. Les rats survivants présentaient des variations hétérogènes de la masse corporelle (gain pour la moitié et perte pour l'autre moitié), une congestion de l'estomac et des poumons et des modifications histopathologiques au niveau hépatique (dégénérescence granuleuse et congestion marquée avec augmentation du nombre de cellules de Kupffer, hémorragie et nécrose avec prolifération des cellules du tissu conjonctif), des tubules rénaux (dégénérescence et congestion, dégénérescence granuleuse, nécrose, desquamation de l'épithélium), de la rate (congestion, dépôts d'hémossidérine), de l'estomac (nécrose de l'épithélium muqueux et congestion) et des poumons (congestion, dilatation des vaisseaux sanguins et desquamation des cellules alvéolaires). À 320 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹,

les 12 rats survivants présentait une congestion de l'estomac et des poumons. À 160 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, 12 rats sur 20 avaient survécu et ne présentait aucune lésion macroscopique. Aux deux plus faibles doses, les survivants présentait des modifications des tissus similaires à celles observées à la plus forte dose mais à un moindre degré. Le CES VSR souligne la faible qualité de l'étude de Shea (1939) : souche non précisée, étude par gavage, etc.

Des cobayes (n = 20/dose, 6 témoins) ont été exposés par gavage pendant 30 jours à 0, 90, 180 et 450 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de MOR (Shea 1939). À la plus forte dose, les animaux présentait une prostration, des éternuements et de la toux, un gain de masse corporelle (n = 3) et une congestion au niveau de plusieurs organes (n = 3). Des lésions histopathologiques similaires à celles observées chez le rat ont été observées au niveau hépatique, rénal, pulmonaire et gastro-intestinal. À 180 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, les cobayes présentait des « irritations » (sans précision). Des lésions microscopiques similaires à celles observées à la plus forte dose ont été observées mais avec une sévérité moindre. À la plus faible dose, seules quelques lésions microscopiques (dégénérescence granuleuse au niveau des tubules rénaux et des hépatocytes) ont été observées.

Des rats mâles ont été exposés à 27,6 ; 93,1 et 323 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de MOR *via* l'alimentation pendant 4 semaines. Seule une augmentation de la masse des glandes surrénales et une faible augmentation du gain de masse corporelle moyenne ont été mis en évidence à 323 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (3 500 ppm). Aucune lésion grave n'a été observée après nécropsie (*Reinhart et Britelli 1981, Industrial Bio-test laboratories Inc. 1970* cités par Elder 1989).

b. Irritation

La MOR est classée corrosive pour la peau en catégorie 1B selon le règlement CLP (H314 - Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves).

i. Données chez l'Homme

Aucune donnée chez l'Homme n'a été identifiée.

ii. Données chez l'animal

La MOR sous forme base est un fort irritant cutané et oculaire chez le lapin et le cobaye.

• Irritation cutanée

Plusieurs études d'irritation cutanée ont été réalisées chez le lapin en conditions occlusives et semi-occlusives avec de la MOR diluée ou non :

- Une nécrose a été observée après 24 h⁷ après application d'une dose unique de 0,01 mL de MOR non diluée sur de la peau lésée de 5 lapins albinos (*Smyth et al. 1954*).
- La MOR (0,5 mL) appliquée, en conditions semi-occlusives, sur la peau rasée de lapins New Zealand (1/sexe) pendant 4 h a entraîné une nécrose irréversible au site d'application (*étude de 1986* cité par ECHA 2019b).
- Des lapins blancs New Zealand (n = 3/sexe) présentait un érythème grave, un œdème grave et une nécrose au bout des 3 minutes d'application de 0,5 mL de MOR sur la peau rasée en conditions occlusives. Les mêmes effets étaient encore observés 55 min après la fin de l'application (*Huntsman 1997* cité par ECHA 2019b).
- Des érythèmes et des œdèmes sévères et des nécroses ont été observés chez 6 lapins blancs New Zealand mâles après application de 0,5 mL de MOR sur la peau rasée en conditions semi-occlusives pendant 3 min, 60 min, 4 h et 24 h. Des fissures et/ou des

⁷ L'auteur ne rapporte que la plus sévère réaction et non les réactions de chaque lapin.

desquamations de la peau ont été observées au niveau du site d'application entre le 7^e et le 14^e jour post-application (*Huntsman 1997* cité par ECHA 2019b).

- La MOR (pureté : 99,2 %) appliquée sur la peau de deux lapins albinos pendant 1, 5, 15 min ou 20 heures en conditions occlusives a entraîné des zones hémorragiques, des œdèmes et des nécroses après 24 h (*BASF 1967* cité par ECHA 2019b).
 - Chez trois lapins albinos traités avec des solutions aqueuses de MOR à 2, 20, 40 et 60 %, les réactions cutanées ont été évaluées après 0,5, 24, 48 et 72 h (*Lodén et al. 1985* cité par IPCS OMS 1996). Une solution de MOR à 2 % a provoqué une irritation cutanée après 72 h, alors que des solutions à 40 % et 60 % ont immédiatement provoqué une rougeur de la peau.
 - *Wang et Suskind (1988)* cité par IPCS OMS 1996, SCOEL 1999, ont mesuré le potentiel irritant de la MOR en appliquant un mélange de 0,1 g (0,1 - 0,5 - 2 - 5 et 10 % de MOR dans de la vaseline) sur la peau de cobaye pendant 24 h. Aucun effet n'a été constaté 1, 24 et 48 h après l'arrêt de l'application.
 - Après 14 jours, aucune toxicité ou irritation cutanée n'a été observée chez des lapins albinos (n = 3/sexe) exposés à 0,5 mL d'un composite de mascara contenant 1 % de MOR appliqué sur la peau normale et abrasée pendant 14 jours (1 fois/jour). Les animaux portaient un collier pour les empêcher de lécher les zones traitées (*CTFA 1977* cité par Elder 1989).
- **Irritation oculaire**

Des nécroses sévères de la cornée ont été observées chez des lapins exposés à de la MOR non diluée ou diluée dans du propylène glycol, de l'eau ou du kérosène désodorisé⁸ (*Smyth et al. 1954*).

Deux lapins ont été exposés par application d'une goutte de MOR non diluée (50 µL, pureté 99,2 %) dans le sac conjonctival, répétée une fois après 5 minutes. Les animaux ont été observés 10 min, un et 3 heures après application et jusqu'à 8 jours après. Les yeux n'ont pas été lavés après 24 h. Un œdème, une opacité, un staphylome et une corrosion des muqueuses de l'œil ont été observés après 24 h d'application (*BASF 1967* cité par IPCS OMS 1996, ECHA 2019b).

Dans une étude d'irritation oculaire primaire, 100 µL de MOR non diluée (99 %) ont été instillés dans le sac conjonctival de l'œil gauche de lapins pendant 4 secondes, 30 secondes et 24 h (n = 3/temps d'exposition). Les yeux ont été lavés après 24 h. Les animaux ont été observés pendant 21 jours. Les trois expositions ont entraîné une irritation oculaire et une nécrose dans, et autour des yeux. Après 24 h, des brûlures (corrosion) ont été observées. Deux lapins présentaient également une corrosion dans, et autour des yeux après 30 secondes d'exposition. Les effets corrosifs n'étaient pas réversibles (*Koch et al. 1985* cité par ECHA 2019b).

Chez des lapins, une solution de MOR (0,02 mol.L⁻¹) neutralisée avec HCl a été appliquée en continu pendant 10 minutes après retrait de l'épithélium cornéen pour faciliter la pénétration. Aucun effet nocif n'a été observé. La MOR a également été neutralisée avec de l'acide salicylique pour former du salicylate de MOR. L'action irritative de la solution aqueuse de salicylate de MOR à 10-20 % a été réduite par rapport à la MOR non neutralisée (*Grant 1974* cité par Elder 1989, IPCS OMS 1996).

La MOR entraîne des lésions oculaires modérées avec ulcération de la conjonctive et opacification de la cornée après instillation d'une dose unique de 0,005 mL dans les yeux de lapin. Un score de 7 sur une échelle de 1 à 10 a été noté au bout de 24 h (*Grant 1974* cité par Elder 1989).

Chez des rats exposés jusqu'à 0,54 g.m⁻³ (150 ppm) de MOR, les examens cliniques ont révélé une incidence accrue d'inflammation de la cornée à la 103^e semaine (*Harbison et al. 1989* cité par IPCS OMS 1996). Une kératite, un œdème, une abrasion, et une ulcération, puis une cicatrisation avec ou sans néo vascularisation et hyperplasie épithéliale de la cornée ont été mis en évidence. Une

⁸ Le nombre d'applications et d'animaux testés n'était pas indiqué.

incidence élevée de dégénérescence rétinienne, probablement liée à l'âge, a été observée principalement chez les femelles.

Des lapins albinos (n = 3/sexe) ont été traités avec un composite de mascara contenant 1 % de MOR. Dans un œil de chaque lapin a été instillé 0,1 mL du produit cosmétique chaque jour pendant 14 jours. Avant l'application, l'œil était évalué pour l'irritation oculaire. Une légère rougeur de la conjonctive a été observée pendant toute la durée de l'étude, mais a disparu dans les 24 heures suivant la dernière instillation. Un test à la fluorescéine sodique effectué à la fin de l'étude n'a révélé aucune anomalie de la cornée ou de l'iris (*CTFA 1977* cité par Elder 1989).

c. Sensibilisation

i. Données chez l'Homme

Aucune donnée chez l'Homme n'a été identifiée.

ii. Données chez l'animal

Une étude de sensibilisation (test de Buehler modifié) sur peau de cobaye Hartley utilisant 2 % de MOR dans de la vaseline a donné des résultats négatifs (*Wang et Suskind 1988* cité par IPCS OMS 1996, OCDE 2013, ECHA 2019b).

3. Toxicité (sub)chronique

a. Données chez l'Homme

Aucune donnée chez l'Homme n'a été identifiée.

b. Données chez l'animal

Une infiltration graisseuse modérée au niveau hépatique (lipidose) a été observée chez 7 rats Sprague-Dawley après l'administration quotidienne de MOR (500 mg.kg pc⁻¹ ; seule dose testée) *via* l'alimentation pendant 8 semaines (*Sander et Bürkle 1969* cité par IPCS OMS 1996, SCOEL 1999, OCDE 2013, ECHA 2019b).

Shibata, Kurata, Tamano, *et al.* (1987) ont réalisé une étude de toxicité de 13 semaines chez des souris B6C3F1 (n = 10/sexe/dose) exposées à 0 - 0,15 - 0,3 - 0,6 - 1,25 et 2,5 % d'oléate de MOR (pureté 92 %) dans l'eau de boisson. L'oléate de MOR a été testé dans cette étude car utilisé comme tensioactif fongicide sur des agrumes. Durant ces 13 semaines, les souris ont été examinées deux fois par jour (état général, signes de toxicité). La masse corporelle, la consommation d'aliment et d'eau ont été mesurés toutes les semaines. Des mesures urinaires (à la bandelette urinaire : pH, protéine, glucose, bilirubine, cétones, hématurie microscopique, urobilinogène, densité urinaire) et des analyses sanguines (nombre de globules blancs et rouges, hématocrite, hémoglobine) ont été réalisées. Après sacrifice des souris, des analyses plasmatiques (ASAT, ALAT, phosphatase alcaline, cholestérol total, protéines totales, glucose, azote uréique), la masse des organes (cœur, rate, foie, reins, cerveau, testicules et ovaires) et un examen histopathologique ont été réalisés. A la plus forte dose, la masse corporelle était légèrement diminuée (non significatif) chez les mâles. Aux deux plus fortes doses, une augmentation de la masse relative des reins a été observée chez les mâles et les femelles. L'analyse histopathologique a montré un léger gonflement des tubules proximaux à la plus forte dose (dans les deux sexes). L'analyse d'urine a révélé une augmentation significative de la densité urinaire dès la dose 0,6 % chez les mâles et aux deux plus fortes doses chez les femelles. Aucune modification des paramètres hématologiques n'a été observée. Une augmentation de l'azote uréique plasmatique a été notée dès 0,6 % chez les femelles et aux deux plus fortes doses chez les mâles. Les auteurs concluent que l'oléate de MOR entraîne une néphrose au niveau des tubules rénaux chez les souris des deux sexes à la plus forte dose. Au vu des résultats

de cette étude, Shibata *et al.* ont sélectionné les doses à tester dans l'étude de cancérogénicité décrite ci-dessous (0,25 et 1 %). La concentration de nitrite ou de nitrate de sodium présents dans l'alimentation et l'eau de boisson n'est pas précisée dans la publication. Néanmoins, les experts font l'hypothèse que les concentrations en nitrites et nitrates dans l'eau de boisson ou l'alimentation ingérés par les souris dans l'étude de toxicité de 13 semaines sont similaires à celles indiquées dans l'étude de cancérogénicité réalisée par la même équipe.

Dans l'étude de cancérogénicité, des souris B6C3F1 (n = 50/sexe/dose) ont reçu de l'oléate de MOR à des doses de 0 - 0,25 ou 1,0 % *via* l'eau de boisson pendant 96 semaines, puis de l'eau du robinet pendant 8 semaines (Shibata, Kurata, Ogiso, *et al.* 1987). L'alimentation et l'eau contenaient respectivement 0,6 et 21 ppm de nitrite et de nitrate de sodium. Au cours de l'étude, l'apparence physique et le comportement général des souris ne semblaient pas affectés par le traitement. Aucune différence de mortalité n'a été observée entre les souris exposées à la MOR et les témoins. Une diminution significative du gain de masse corporelle de 1 % a été observée chez les mâles dès la 4^e semaine d'exposition et les femelles dès la 13^e semaine et de 0,25 % uniquement chez les femelles dès la 26^e semaine. La consommation d'eau était également diminuée chez les animaux des deux sexes à la plus forte dose. Aucune modification des paramètres hématologiques et urinaires évalués à la 104^e semaine n'a été mise en évidence. Seule une augmentation significative des concentrations en azote uréique sanguin a été observée à la plus forte dose chez les mâles uniquement. À la plus forte dose, une diminution significative de la masse du cœur a été observée chez les animaux des deux sexes, et du foie uniquement chez les femelles. Une augmentation significative de la masse des reins a été mise en évidence chez les femelles à 0,25 % et une diminution à 1 %. L'incidence de l'hyperplasie de l'épithélium du pré-estomac chez les mâles du groupe exposé à 1 % était statistiquement plus élevée que chez les témoins, mais aucune augmentation significative de l'incidence des lésions néoplasiques et non néoplasiques n'a été observée. Les effets cancérogènes observés dans cette étude sont décrits dans la partie précédente.

4. Effets sur la reproduction et le développement

a. Données chez l'Homme

Aucune donnée chez l'Homme n'a été identifiée.

b. Données chez l'animal

Une étude sur le développement prénatal non publiée (OCDE 414) a été menée chez des rates Wistar gravides (n = 25/groupe) exposées par voie orale (gavage) à 0, 75, 250 ou 750 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de chlorhydrate de MOR (97 %) du 6^e au 19^e jour de gestation (14 jours). Une toxicité maternelle a été observée avec des modifications hématologiques (légère anémie régénérative) et une augmentation de la masse du foie (NOAEL_{maternelle} = 75 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹). Aucun effet sur les paramètres gestationnels n'a été observé. L'examen des fœtus n'a pas révélé d'effet sur le sexe ratio, la masse des fœtus et du placenta. Dès 250 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, des variations squelettiques (augmentation statistiquement significative du nombre moyen de fœtus présentant une ossification incomplète de l'os pariétal et du crâne) ont été observées. Selon BASF, elles sont considérées comme des effets mineurs courants transitoires, étant secondaires à la toxicité maternelle (BASF 2009 cité par OCDE 2013, NICNAS 2015, ECHA 2019b).

En 2017, l'ECHA a demandé aux industriels de fournir d'ici février 2021 les études lors de la vérification de conformité du dossier (« compliance check ») dans le cadre du règlement REACH :

- une étude de développement prénatal (OCDE 414) chez une seconde espèce (lapin) par voie orale avec du chlorhydrate de MOR ;
- une étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération (OCDE 2013) chez le rat avec du chlorhydrate de MOR (ECHA 2017).

5. Génotoxicité

a. Études *in vitro*

i. Études sur levures et bactéries

La MOR n'est pas mutagène sur *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ou différentes souches de *Salmonella* Typhimurium (TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA92, TA94 ou TA100) avec ou sans activation métabolique, dont une étude réalisée avec un sel d'acide gras de MOR (*Harworth et al. 1983, Glatt et Oesch 1981, Texaco 1979a* cités par IPCS OMS 1996, ECHA 2019b ; *Ishidate et al. 1984* cité par CIRC 1989). Des résultats faiblement positifs dans un test d'Ames ont été notés dans une souche de *S. Typhimurium* (TA98 ou 100) avec ou sans S9 (*Glatt et Oesch 1981* cité par ECHA 2019b). La MOR n'a pas induit de mutation sur *S. Typhimurium* TA1590 utilisé comme indicateur dans un essai par passage sur hôte chez la souris NMRI, sur *S. Typhimurium* TA1530 chez des souris CD-1 ou sur *S. Typhimurium* TA1530 chez des souris CD-1 (*Braun et al. 1977* cité par CIRC 1989, IPCS OMS 1996 ; *Zeiger et Legator, 1971* cité par Edwards, Whong, et Speciner 1979, Elder 1989).

ii. Études sur cellules de mammifères

La MOR n'a induit aucune réparation de l'ADN dans les cultures primaires d'hépatocytes de rats (0,1 - 100 µg.mL⁻¹) (*Conaway et al. 1984a* cité par CIRC 1989, Elder 1989, IPCS OMS 1996, ECHA 2019b).

La MOR a induit de légères augmentations de la fréquence d'échanges de chromatides sœurs dans les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) observées à des concentrations de 50 et 100 nL.mL⁻¹ (environ 50 et 100 µg.mL⁻¹) en l'absence d'activation (S9) (*Litton Bionetics 1980* cité par Elder 1989, IPCS OMS 1996, SCOEL 1999).

Des doses de 0,625 à 1,25 µL.mL⁻¹ de MOR ont eu un effet faiblement positif sur l'induction de mutations dans des cellules de lymphome de souris L5178Y TK^{+/+}, sans activation métabolique (*Texaco 1979b, Conaway et al. 1982a et b* cités par CIRC 1989, Elder 1989, IPCS OMS 1996, ECHA 2019b).

Un sel d'acide gras de MOR n'a pas induit d'aberration chromosomique dans des fibroblastes de hamsters chinois (*Ishidate et al. 1984* cité par CIRC 1989).

La MOR (0,001-0,3 µL.mL⁻¹) a augmenté la fréquence de transformation morphologique de cellules BalbC/3T3, ce qui correspond à 78-52 % de survie dans le test de cytotoxicité (*Texaco 1979b, Litton Bionetics 1979 a et b, Conaway et al. 1982a et b* cités par CIRC 1989, IPCS OMS 1996, SCOEL 1999, ECHA 2019b).

Dans un autre test de transformation cellulaire dans des cellules Balb/3T3, avec et sans activation métabolique, la MOR a été neutralisée avant le test dans le milieu de culture (*Litton Bionetics 1982* cité par Elder 1989, IPCS OMS 1996). Aucune augmentation significative n'a été induite dans les foyers transformés aux concentrations testées (0,015 à 1,400 µL.mL⁻¹ sans activation ; 0,0175 - 0,7 µL.mL⁻¹ avec activation). La MOR a donc été considérée comme inactive dans ce test.

b. Études *in vivo*

i. Études chez l'Homme

Des aberrations chromosomiques ont été recherchées dans des lymphocytes de sang périphérique chez 24 travailleurs (16 hommes, 8 femmes) exposés à la MOR pendant 3 à 10 ans (*Katsova et al. 1991* cité par CIRC 1999). La concentration atmosphérique moyenne de MOR était comprise entre 0,53 et 0,93 mg.m⁻³, avec un maximum entre 0,74 et 2,14 mg.m⁻³. Le pourcentage de cellules avec des aberrations était de 1,61 ± 0,2 % chez les témoins et de 2,08 ± 0,2 % chez les exposés. Le pourcentage de cellules avec des délétions était de 0,69 ± 0,2 % chez les témoins et de 0,86 ± 0,2 % chez les exposés. Selon la base de données de l'institut de génétique médicale (Moscou, Russie), le pourcentage attendu de cellules avec des aberrations était de 1,19 (437 individus analysés). Le CIRC note le manque d'information concernant les autres expositions, les caractéristiques du groupe témoin et le type d'aberration constaté.

ii. Études chez les mammifères

Inui *et al.* (1978) ont administré par sonde gastrique 500 mg.kg pc⁻¹ de MOR (forme non précisée) et/ou 500 mg.kg⁻¹ de nitrite de sodium à des femelles de hamsters syriens au 11^e ou 12^e jour de gestation (Inui *et al.* 1978). Les embryons ont été retirés 24 h plus tard et les cellules embryonnaires examinées. Pour la détection des mutations induites, les cellules embryonnaires ont été cultivées en milieu normal pendant 72 h puis transférées dans un milieu contenant de la 8-azaguanine (10 ou 20 mg.L⁻¹) ou de l'ouabaïne (1 mM). Aucune aberration chromosomique, formation de micronoyaux ou mutation résistante à la 8-azaguanine ou à l'ouabaïne n'a été observée dans des cellules embryonnaires de hamsters syriens suite à l'administration de 500 mg.kg pc⁻¹ de MOR seule à la mère. En revanche, suite à l'administration de MOR et de nitrite de sodium à la mère, une augmentation marquée des mutants 8-azaguanine-résistants a été mise en évidence dans les cultures de cellules embryonnaires.

Dans une étude peu documentée, une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques, en particulier des « fragmentations », a été observée dans les cellules de moelle osseuse de rats et de cobayes exposés pendant 4 mois à 8 ou 70 mg.m⁻³ (*Migukina 1973* cité par IPCS OMS 1996, SCOEL 1999).

Chez la souris, la MOR (600 mg.kg⁻¹, voie orale) n'a pas augmenté le taux de lésions de l'ADN (test des comètes négatifs) quel que soit l'organe. En revanche, en présence de nitrite de sodium (100 mg.kg⁻¹, voie orale) et de l'acidité du suc gastrique, il apparaît une formation endogène de nitrosamine qui serait responsable de l'augmentation de lésions de l'ADN observée au niveau hépatique uniquement (*Ohsawa et al.* 2003).

Sur la base de résultats équivoques des études *in vitro* de mutation génique réalisées à fortes doses et les résultats négatifs des études *in vitro* et *in vivo* de clastogénicité, l'OCDE (2013) conclut que la MOR n'est pas considérée génotoxique. Le CES VSR est en accord avec la conclusion de l'OCDE.

6. Cancérogénicité

En 1999, le CIRC a considéré la MOR comme un agent cancérogène du groupe 3 (inclassable quant à son pouvoir cancérogène pour l'Homme) car aucune donnée chez l'Homme n'est disponible et les données indiquant un effet cancérogène chez les animaux sont insuffisantes. La MOR a été testée par voie orale sur deux souches de souris, une souche de rat et une souche de hamster. Les études sur une souche de souris et le hamster ont été jugées inadéquates pour l'évaluation par le CIRC (*Greenblatt, Mirvish, et So 1971, Shank et Newberne 1976*). Dans la seconde souche de souris, aucune augmentation significative de tumeur n'a été observée (*Shibata, Kurata, Ogiso, et al.* 1987). Chez le rat SD, quelques tumeurs du foie et des poumons ont été observées (*Shank et Newberne 1976*). Ces études sont décrites ci-dessous.

Plusieurs études ont également investigué les effets cancérogènes de la MOR en présence de nitrite de sodium (pouvant former de la NMOR) et ont mis en évidence des tumeurs hépatiques et

pulmonaires (Greenblatt, Mirvish, et So 1971, Mirvish *et al.* 1976, Shank et Newberne 1976, Mirvish *et al.* 1983, Kitano *et al.* 1997). Chez des rats mâles Wistar exposés pendant deux ans, les tumeurs hépatiques induites par la MOR (10 g.kg⁻¹ aliment) et le nitrite de sodium (2-3 g.L⁻¹ eau de boisson) présentaient en présence d'ascorbate de sodium une période d'induction plus longue, une plus faible incidence et l'absence de métastase pulmonaire (Mirvish *et al.* 1976, Mirvish *et al.* 1983). Ces résultats suggèrent une inhibition de la formation de NMOR *in vivo*.

La NMOR a été classée par le CIRC comme cancérigène 2B (cancérigène possible pour l'Homme) (CIRC 1978). Après administration chronique par voie orale, la NMOR induit des tumeurs hépatiques, pulmonaires, rénales et vasculaires chez le rat, la souris et le hamster (Anses 2012).

Des souris Swiss (n = 20/sexe) ont été exposées *via* l'alimentation à 6,33 g.kg⁻¹ de MOR purifiée (environ 900 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹) (solution fixée à pH = 7 grâce au HCl ou NaOH) avec et sans nitrite de sodium (0,1 %, *via* l'eau de boisson) pendant 28 semaines (Greenblatt, Mirvish, et So 1971). Le groupe témoin était composé de 80 souris de chaque sexe. Après 12 semaines supplémentaires d'observation, les animaux survivants ont été sacrifiés.

La proportion de souris présentant un adénome pulmonaire et le nombre total d'adénomes pulmonaires par souris étaient comparables dans les groupes traités par la MOR seule et non traités : 5/38 et 20/144 souris présentaient respectivement 5 et 26 adénomes (2 sexes regroupés). Quelques lymphomes malins (n = 2/35) ont également été observés chez les souris exposées uniquement à la MOR mais n'étaient pas liés au traitement selon les auteurs.

Le groupe exposé à la MOR et au NaNO₂ présentait une augmentation significative du pourcentage de souris présentant un adénome pulmonaire et du nombre d'adénomes pulmonaires par souris (p<0,001). Il faut néanmoins noter que la durée d'exposition de cette étude était plus courte que celle normalement utilisée dans une étude de cancérigénicité.

Des souris B6C3F1 (n = 50/sexe/dose) ont reçu de l'oléate de MOR à des doses de 0, 0,25 ou 1,0 % (correspondant à 0, 71 et 283 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ chez les mâles, et 0, 71 et 236 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ chez les femelles) *via* l'eau de boisson pendant 96 semaines, puis de l'eau du robinet pendant 8 semaines (Shibata, Kurata, Ogiso, *et al.* 1987). L'alimentation et l'eau contenaient respectivement 0,6 et 21 ppm de nitrite et de nitrate de sodium. Chez les mâles, des nodules blancs et des excroissances (taille < 1 mm) étaient visibles au niveau du pré-estomac à la plus forte dose. Aucune augmentation significative de l'incidence des lésions non néoplasiques ou néoplasiques n'a été observée hormis une augmentation de l'incidence d'hyperplasie de l'épithélium squameux du pré-estomac chez les mâles à la plus forte dose. Les effets non cancérigènes observés dans cette étude sont décrits dans le paragraphe 3.b.

Dans une étude préliminaire, des rates Sprague-Dawley gravides et leurs petits ont été exposés *via* l'alimentation à 0, 5, 50 ou 1 000 ppm de MOR et/ou des quantités variables de nitrite de sodium (0, 50 ou 100 ppm) ou à la NMOR (0, 5 ou 50 mg.kg⁻¹.j⁻¹) (Newberne et Shank 1973). Les animaux nourris avec la MOR et le nitrite de sodium présentaient des carcinomes hépatocellulaires et des angiosarcomes hépatiques, histologiquement identiques à ceux induits par la NMOR (Tableau IX). Aucun effet n'a été observé avec la MOR ou le nitrite de sodium seul.

Tableau IX. Tumeurs chez les rats exposés à la morpholine et le nitrite de sodium ou à la NMOR (Shank et Newberne 1976).

Additions to diet (ppm)			Tumour incidence*			
			Liver		Lung	
NaNO ₂	Morpholine	N-Nitrosomorpholine	Hepatocellular carcinoma	Angiosarcoma	Metastatic hepatocellular carcinoma	Angiosarcoma
0	0	0	0/169	0/169	0/169	0/169
1000	1000	0	156/159	38/159	109/159	37/159
1000	50	0	24/122	11/122	10/122	2/122
1000	5	0	3/160	0/160	0/160	0/160
50	1000	0	4/120	0/120	0/120	0/120
0	0	5	17/132	1/132	1/132	0/132
0	0	50	77/97	10/97	21/97	4/97

*No. of rats affected/no. observed.

* les tumeurs observées dans les différentes générations et les différents sexes ont été combinées car aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les sexes ou les générations.

Dans une étude multigénérationnelle réalisée pour investiguer la nitrosation de la MOR, des rates Sprague-Dawley gravides et leurs petits ont été exposés *via* l'alimentation à 0, 5, 50 ou 1 000 ppm de MOR (qualité analytique) et/ou des quantités variables de nitrite de sodium (0, 5, 50 ou 100 ppm) ou à la NMOR (0, 5 ou 50 ppm) (Tableau IX) (Shank et Newberne 1976).

Les générations F1 et F2 ont été nourries de la même manière pendant toute la durée de l'expérience. La durée de vie moyenne était de 117 semaines pour les animaux traités et de 109 semaines pour les témoins. Les survivants ont été sacrifiés à la 125^e semaine. L'alimentation ne contenait pas de nitrite ou de NMOR détectable et les rats n'ont bu que de l'eau distillée. Parmi les 104 rats exposés à la MOR seule, trois carcinomes hépatocellulaires et un angiosarcome pulmonaire ont été observés dans la génération F1, un angiosarcome pulmonaire dans la F2, et deux gliomes malins dans les générations F1 et F2 combinées. Ces tumeurs n'ont pas été observées chez les 156 témoins (F1 et F2 combinées). Les auteurs considèrent que les tumeurs du foie et des poumons pourraient être dues à la présence de NMOR formée à partir de nitrites d'origine inconnue. Les fortes doses de MOR et de nitrate de sodium (1 000 ppm chacun) présentent un potentiel cancérigène plus important que la NMOR (50 ppm) avec des tumeurs principalement au niveau hépatique et pulmonaire. L'incidence des tumeurs, en particulier des hépatocarcinomes, diminue avec l'augmentation de la dose de nitrite de sodium, à dose constante de MOR (1 000 ppm). En revanche, l'incidence des tumeurs est faible avec 1 000 ppm de MOR et de faibles doses de nitrite de sodium (Tableau X).

Tableau X. Niveaux de dose administrés et incidence des tumeurs observés chez les rats.

Exposition alimentaire (ppm)			Nombre rats*	Incidence (%)				
NaNO ₂	MOR	NMOR		Hépatocarcinome	Angiosarcome hépatique	Angiosarcome pulmonaire	Autre angiosarcome	Métastases à partir des tumeurs hépatiques
0	0	0	156	0	0	0	0	-
1 000	0	0	96	1	0	0	1	0
0	1 000	0	104	3	0	2	1	0
1 000	1 000	0	159	97	14	23	1	49
1 000	50	0	117	59	5	6	0	17
1 000	5	0	154	28	12	8	1	7
50	1 000	0	109	3	2	1	0	0
5	1 000	0	172	1	2	1	1	0
50	50	0	152	2	1	1	1	0
5	5	0	125	1	2	2	1	0
0	0	5	128	58	15	9	1	22
0	0	50	94	93	21	20	1	58

Dans une étude similaire, des femelles gravides de hamsters dorés syriens ont été exposées *via* l'alimentation à 0 ou 1 000 mg.kg⁻¹ de MOR (qualité analytique) à partir de la conception (Shank et Newberne 1976). Le temps de survie moyen était de 72 semaines pour les témoins et de 68 semaines pour les hamsters traités. Les survivants ont été sacrifiés à la 110^e semaine. Aucune tumeur hépatique n'a été observée chez les hamsters exposés à la MOR seule tandis qu'en présence de fortes doses de MOR et de nitrite de sodium, l'incidence des hépatocarcinomes étaient augmentée (Tableau XI).

Tableau XI. Niveaux de dose administrés et incidence des tumeurs observés chez les hamsters (Shank et Newberne 1976).

Exposition alimentaire en ppm			Nombre hamsters	Hépatocarcinome		Nombre d'angiosarcome	Nombre et autres types de tumeurs
NaNO ₂	MOR	NMOR		nombre	%		
0	0	0	23	1	4	4	0
1 000	0	0	30	0	0	1 (subcutanée)	0
0	1 000	0	22	0	0	0	0
1 000	1 000	0	16	5	31	0	1 adénome kystique pulmonaire
1 000	50	0	32	0	0	0	1 lymphome malin, 1 acanthome kératinisé de l'estomac, 1 adénome surrénale
1 000	5	0	40	0	0	0	1 adénome kystique hépatique
50	1 000	0	22	0	0	1 (rate)	1 tumeur du glomérule surrénalien
5	1 000	0	19	0	0	0	0
50	50	0	30	0	0	1 (rate)	1 lymphome malin
5	5	0	40	0	0	0	1 lymphome malin avec leucémie, 1 adénocarcinome ovarien, 1 adénome kystique du conduit biliaire
0	0	5	35	0	0	0	0
0	0	50	18	1	6	1 (foie)	0

Des rats Sprague-Dawley (n = 7/groupe) ont été nourris avec soit du nitrite de sodium et de la MOR à des concentrations de 0,5 % chacun, soit 0,5 % de MOR seule, soit 0,5 % de nitrite de sodium seul, pendant 8 semaines et ont été observés jusqu'à leur décès. Tous les animaux recevant la MOR et du nitrite de sodium présentaient des adénomes hépatocellulaires sauf un qui présentait un carcinome hépatocellulaire. Deux rats présentaient un hémangiosarcome au niveau hépatique, un rat une tumeur hépatique diagnostiquée comme un cyst-adénocarcinome et un rat un adénome rénal. La MOR seule n'entraînait pas de tumeur (*Sander et Buerkle 1969* cité par Elder 1989).

Des rats Fischer 344 mâles (n = 10 ou 20/groupe) ont été exposés *via* l'alimentation pendant 23 semaines à 0,5 % de MOR (~220 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹) (pureté > 97 %) seule ou en combinaison avec 0,15 % de nitrite de sodium dans l'eau de boisson après une phase d'initiation et en combinaison avec du nitrite de sodium sans phase d'initiation (*Kitano et al. 1997*). La phase d'initiation consistait en :

- une administration unique de diéthylnitrosamine (100 mg.kg pc⁻¹, IP, J1), suivie 14 jours après, d'une injection unique intragastrique de N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (100 mg.kg pc⁻¹) puis de 4 injections sous-cutanées de DMH (1,2-diméthylhydrazine) (40 mg.kg pc⁻¹) à J19, 55, 25 et 28 ;
- une exposition *via* l'eau de boisson de 0,01 % ENUR (éthylnitrosouréthane) + 0,05 % de BBN (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine) les deux premières semaines et de 0,1 % de DHPN (2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine) les deux semaines suivantes.

Des lésions prénéoplasiques et néoplasiques ont été observées dans plusieurs organes (duodénum : un adénocarcinome, gros intestin : deux adénocarcinomes, reins : un adénocarcinome et deux néphroblastomes, poumons : deux adénocarcinomes et deux adénomes, vessie : deux hyperplasies papillaires ou nodulaires, thyroïde : un adénome, cavité nasale : un carcinome et 3 hyperplasies papillaires ou nodulaires) sans modification significative entre les différents groupes d'exposition. Dans le groupe exposé à la MOR + nitrite avec phase d'initiation, l'incidence des tumeurs et des hyperplasies papillaires ou nodulaires au niveau du pré-estomac était augmentée par rapport au groupe témoin. Aucune tumeur n'a été induite par la MOR + nitrite de sodium en l'absence de phase d'initiation. Une augmentation importante du nombre et de la surface des foyers hépatiques positifs pour la glutathion S-transférase de forme P (GST-P) a été observée chez les rats exposés à la MOR et aux nitrite avec phase d'initiation indiquant que l'association MOR + nitrite de sodium, mais pas la MOR seule, a un effet promoteur de tumeur.

7. Mécanismes d'action

Les propriétés irritantes et corrosives de la MOR sous forme de base sont dues à son caractère basique (IPCS OMS 1996, SCOEL 1999).

Le mécanisme d'action des effets induits par la MOR sous forme de sel n'est pas connu.

8. Populations sensibles

Absence de donnée.

9. Formation de N-nitrosomorpholine

En présence de nitrites, nitrates et NOx, la MOR peut être convertie en NMOR.

La formation de NMOR a été étudiée *in vitro* (*Tannenbaum et al. 1978* cité par IPCS OMS 1996 ; *Iijima et al. 2003*) et *in vivo* chez la souris (*Edwards, Whong, et Speciner 1979, Epstein, Iqbal, et Johnson 1980, Iqbal, Dahl, et Epstein 1980, Van Stee et al. 1983, Norkus et al. 1984, Norkus et al. 1986, Van Stee et al. 1995*), le rat (*Leaf et al. 1991, Sander et al. 1968* cités par IPCS OMS 1996 ; *Shank et Newberne 1976, Inui et al. 1978, Hecht et Morrison 1984, Piotrowski et al. 2014*), le cobaye (*Garcia Roche et Ziebarth 1987*) et l'Homme (*Winter et al. 2007*).

a. *In vitro*

La nitrosation *in vitro* de la MOR a été constatée par la formation de NMOR lorsque la MOR a été ajoutée à la salive humaine (Tannenbaum et al. 1978 cité par CIRC 1989, IPCS OMS 1996). De plus, un autre métabolite, la N-cyanomorpholine, a été identifié dans la salive humaine (Wishnok et Tannenbaum 1976 cité par IPCS OMS 1996).

Iijima *et al.* (2003) ont étudié la formation *in vitro* de NMOR. Un tube a été utilisé pour représenter l'épithélium du tractus gastro-intestinal supérieur. La paroi du tube présentait la même perméabilité qu'une membrane épithéliale et permettait donc le passage de gaz, tel que l'oxyde nitrique, mais pas celui des ions hydrogène. Ce tube contenait un tampon phosphate de pH 7,4 représentant l'intérieur des cellules épithéliales (« compartiment épithélial »). La surface extérieure du tube représentait la lumière de la jonction gastro-oesophagienne lorsque la salive rencontre le suc gastrique acide (« compartiment luminal »). La MOR, a été ajoutée aux compartiments luminal et épithélial. Lorsque le compartiment luminal contenait des nitrites et de l'acide chlorhydrique, il y avait formation de NMOR uniquement dans le compartiment luminal. L'addition d'acide ascorbique au compartiment luminal a empêché la formation de NMOR dans le compartiment luminal, générant de fortes concentrations d'oxyde nitrique dans le compartiment luminal, et de fortes concentrations de NMOR dans le compartiment épithélial. Le monoxyde d'azote, généré par la réaction entre le nitrite acidifié et l'acide ascorbique, se diffuse dans le compartiment épithélial et réagit avec l'oxygène pour former du N_2O_3 , qui nitrose la MOR (Figure 2). L'ajout d'acide ascorbique ou de glutathion dans le compartiment épithélial ne pourrait réduire la production de NMOR que de 40 % au maximum (Iijima *et al.* 2003).

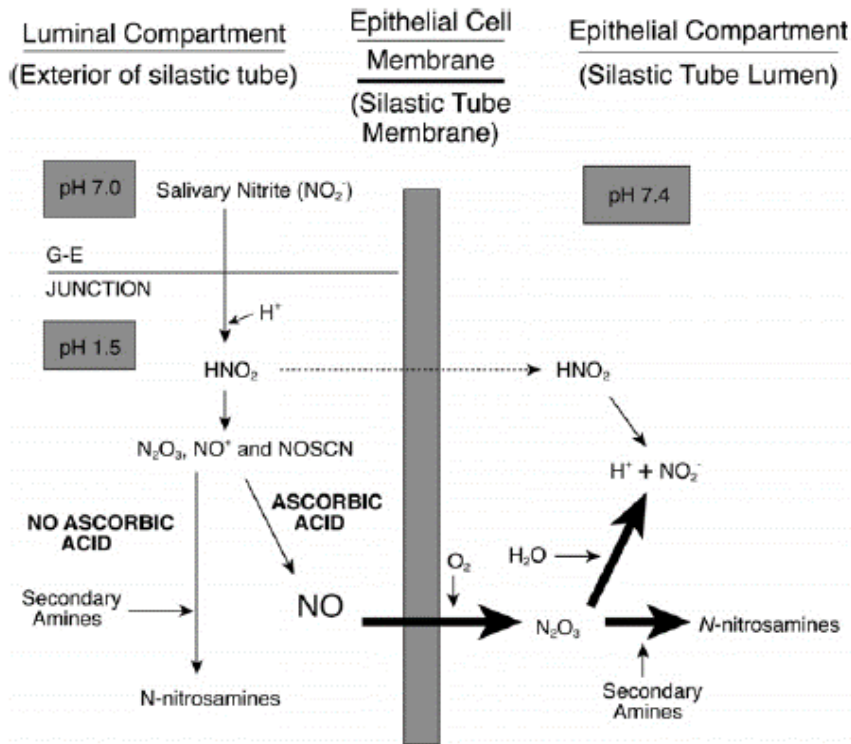


Figure 2. Réactions entre les nitrites salivaires entrant en contact avec l'acidité du suc gastrique (Winter *et al.* 2007).

b. Chez l'Homme

Winter *et al.* (2007) ont mis en évidence la formation *in situ* de NMOR à partir de nitrates ingérés chez 16 volontaires sains. Un tube en silicone, segmenté tous les 15 mm et contenant un tampon phosphate pH 7,4 et de la MOR, a été inséré dans le tractus gastro-intestinal supérieur. La paroi du tube présentait la même perméabilité qu'une membrane épithéliale et permettait donc le passage de gaz tel l'oxyde nitrique mais pas celui des ions hydrogène. Après 2 h, le tube a été retiré et les concentrations en nitrite et NMOR ont été mesurées dans chaque segment du tube. Les auteurs ont suivi des volontaires ayant ingéré ou non des ¹⁵N-nitrates. Chez les volontaires sains, la NMOR s'est formée dans les sections de tube exposées à l'acide gastrique et cette production a été multipliée par deux après ingestion de nitrate. La NMOR était enrichie par 77 % de ¹⁵N, confirmant ainsi sa formation à partir des nitrates ingérés.

c. Chez le rat

La NMOR a été trouvée dans l'estomac de rats nourris avec de la MOR et des nitrites (Sander *et al.* 1968 cité par Inui *et al.* 1978, IPCS OMS 1996).

Hecht et Morrison (1984) ont développé une méthode pour suivre la formation *in vivo* de NMOR en mesurant la quantité urinaire d'un métabolite urinaire principal de la NMOR, la N-nitro(2-hydroxyéthyl)glycine (NHEG). En moyenne, 52 % de la NMOR est transformée en NHEG chez le rat F344 (entre 42-60 %).

Chez des rats F344 gavés par de la MOR (38,3-0,92 µmol) et du nitrite de sodium (191 - 4,8 µmol) dilué dans une solution saline (n = 3 - 6/dose), la formation endogène de NMOR a été démontrée par la présence de NHEG dans l'urine, métabolite urinaire principal de la NMOR. Un fort degré de variabilité de formation de NMOR a été observé chez les rats. Ce métabolite représente 0,5 à 12 % de la dose de MOR (Tableau XII). La quantité de NMOR formée a été estimée en divisant la quantité de NHEG par 0,52 (facteur de conversion de NMOR en NHEG).

Tableau XII. Formation de N-nitro(2-hydroxyéthyl)glycine chez des rats gavés avec de la morpholine et du NaNO₂ (Hecht et Morrison 1984).

Dose (µmol)		Urinary NHEG ^a (µmol)	Estimated % of morpholine nitrosated ^b
Morpholine	NaNO ₂		
38.3	0	0.0016 ± 0.0017 ^c	
0	191	0.010 ± 0.0024	
38.3	191	1.01 ± 0.91	5 ± 5
19.2	95.7	1.20 ± 0.34	12 ± 3
3.83	19.1	0.072 ± 0.025	4 ± 1
1.92	9.6	0.0046 ^d ± 0.003	0.5 ± 0.3
0.92	4.8	0.0028 ^d ± 0.0026	0.6 ± 0.5

^a Mean recovery of internal standard [¹⁴C]NHEG, 33 ± 6%; n = 21.

^b The µmol of N-nitrosomorpholine formed was estimated by dividing µmol NHEG by 0.52.

^c Mean ± S.D.

^d A background peak corresponding to 0.0012 µmol was subtracted.

Les auteurs ont vérifié que la quantité de NHEG ne provenait pas de la métabolisation de la MOR (2-hydroxylation) puis de la nitrosation *in vivo* ou lors de l'expérimentation : Les urines de 24 h de rats traités par 38,3 µmol de MOR ont été incubées avec 14,5 mmol de NaNO₂. La quantité de NHEG détectée (0,013 µmol) était inférieure à 2 % de la quantité détectée dans l'urine de rats exposés à 38,3 µmol de MOR et 191 µmol de NaNO₂.

Piotrowski *et al.* (2014) ont réalisé une étude pour évaluer la robustesse du taux de formation endogène de NMOR à partir de la MOR de 12 % mis en évidence dans l'étude de Hecht et Morrison (1984). Des rats mâles Sprague Dawley ($n = 6/\text{groupe}$) ont été exposés par voie orale à de la MOR et du NaNO_2 . Le taux de conversion maximal était de $13,3 \pm 1,2 \%$ (Tableau XIII).

Tableau XIII. Taux de conversion de la morpholine en NMOR (Piotrowski *et al.* 2014).

Dose de MOR en μmol	Dose de NaNO_2 en μmol	Taux de conversion de MOR en NMOR			
		8 h	24 h	48 h	72 h
19,2	96	$10 \pm 1,6$	n.d.	n.d.	n.d.
19,2	4	n.d.	$9,8 \pm 2,7$	n.d.	n.d.
0,48	4	n.d.	$13,3 \pm 1,2$	n.d.	n.d.

La formation de NMOR a également été mesurée chez des rats exposés, 6 jours, *via* l'alimentation à 500 ppm de MOR et 1 000 ppm de NaNO_2 , régime qui avait induit précédemment des tumeurs hépatiques chez 58 % des animaux (Shank et Newberne 1976). La formation moyenne journalière de NMOR était estimée à $0,88 \pm 0,59 \mu\text{mol}/\text{rat}$ (Hecht et Morrison 1984).

L'immunostimulation de rats en IP avec du lipopolysaccharide d'*E. coli* (LPS : $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) a entraîné une forte augmentation des nitrates urinaires et des métabolites urinaires de NMOR lorsque la MOR ($80 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$) et la L-arginine ($400 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$) étaient injectées en IP. Le remplacement du LPS par du nitrate ($330 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ IP) n'a pas augmenté les métabolites urinaires du NMOR (Leaf *et al.* 1991 cité par IPCS OMS 1996). Ce résultat correspond à la nitrosation endogène de la MOR par l'oxyde d'azote (NO) à partir de l'oxydation du groupe guanido de l'arginine par la NO synthase induite (Hibbs 1992 cité par IPCS OMS 1996).

d. Chez la souris

Edwards, Whong, et Speciner (1979), utilisant *Salmonella* Typhimurium TA 1530 pour détecter des concentrations faibles de NMOR, ont montré que, chez la souris gavée séquentiellement avec de la MOR et des nitrites en milieu acide ($\text{pH} = 3,4$), 12 à 19 % de la MOR étaient convertis en NMOR en présence d'excès de nitrites (Tableau XIV) (Edwards, Whong, et Speciner 1979).

Tableau XIV. Estimation de la nitrosation *in vivo* de la morpholine en présence d'un excès de nitrites *via* un essai intra-hépatique par passage sur hôte (Edwards, Whong, et Speciner 1979).

Precursor		Amount of MOR nitrosated ($\mu\text{g}/\text{g}$)	% MOR nitrosated
MOR ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Sodium nitrite ($\mu\text{g}/\text{g}$)		
4	120	0.62	15.5
8	120	1.59	19.8
20	120	3.29	16.4
40	120	4.94	12.3

Une exposition unique de 2 mg de MOR (gavage) et de dioxyde d'azote (NO_2) (chambre d'inhalation) à des concentrations de 0,2 à 50 ppm pendant 30 min à 4 h maximum a entraîné la formation de NMOR chez des souris ($n = 3 - 4/\text{groupe}$) (Epstein, Iqbal, et Johnson 1980, Iqbal, Dahl, et Epstein 1980). La quantité de NMOR, allant jusqu'à environ $2,23 \mu\text{g}/\text{souris}$, dépendait de la durée de l'exposition au NO_2 et de la concentration de NO_2 . Chez les témoins (souris gavées de MOR ou d'eau distillée et exposées à l'air au lieu du NO_2), la quantité de NMOR était inférieure à 5 ng/souris.

Une administration unique de 2 mg de MOR (gavage ou IP) puis de 45 ppm de NO₂ en chambre d'inhalation pendant 2 h a entraîné la formation de NMOR *in vivo* chez des souris CD-1 à jeun ou non (n = 5 -8/groupe) (Norkus *et al.* 1984). Les mêmes auteurs ont mis en évidence qu'un prétraitement par l' α -tocophérol par gavage (2,5 - 100 mg.kg pc⁻¹ une fois par jour, 6 jours) avant l'administration de 2 mg de MOR (IP) suivie par 47 ppm de NO₂ pendant 2 h inhibait la formation *in vivo* de NMOR chez des souris CD-1 (Norkus *et al.* 1986). Cette inhibition serait maximale pour de faibles doses d' α -tocophérol (2,5 - 5 mg.kg pc⁻¹). D'autres antioxydants, tels que l'ascorbate et le glutathion, inhibent la réaction de la MOR avec le NO₂ et préviennent de la formation de NMOR aux pH 7,4 et 12,5 (Cooney, Ross, et Bartolini 1986).

Van Stee *et al.* (1983) ont exposé pendant 5 jours consécutifs des souris mâles CD-1 (n = 76) au ¹⁵NO₂ (16,5-20,5 ppm) pendant 5 - 6 h, à 1 g.kg pc⁻¹.j⁻¹ de MOR neutralisée par HCl par gavage ou aux deux substances simultanément. La NMOR a été retrouvée uniquement dans la carcasse des animaux exposés au NO₂ et à la MOR, dont 1/3 dans le tractus gastro-intestinal, principalement dans l'estomac. La NMOR n'a pas été détectée dans le cœur et les poumons.

Van Stee *et al.* (1995) ont exposé des souris mâles CD-1 (n = 76) à 1 g.kg pc⁻¹ de MOR par gavage pendant 5 jours consécutifs et à 20 ppm de ¹⁵NO₂ 6 h.j⁻¹ pendant 4 jours et 2 h le 5^e jour. La NMOR a été trouvée dans l'ensemble du corps de la souris, l'estomac, la peau et la carcasse (Tableau XV). La concentration en NMOR était plus importante dans la peau puis l'estomac et la carcasse. La quantité totale de NMOR par tissu était plus forte dans la peau (83 %) puis la carcasse (14,8 %) puis l'estomac (2,2 %). Une analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis de distinguer la NMOR formée à partir du ¹⁵NO₂ exogène de la NMOR d'autre origine. La quasi-totalité de la NMOR dans l'homogénat de souris entière était identifiée comme de la ¹⁵NMOR (98,4 %). Dans l'estomac, 73 % de la NMOR provenaient de la ¹⁴NMOR et 27 % de la ¹⁵NMOR (origine ¹⁵NO₂). Ces résultats indiquent que la formation endogène de nitrosamines semble être un processus continu chez les mammifères.

Tableau XV. NMOR totale dans les tissus de souris exposées par inhalation à du NO₂ et par gavage à de la morpholine (Van Stee *et al.* 1995).

Tissue (pool sample size)	Sample wt (g)	Isolated NMOR (ng)	Recovery (%)	Total NMOR (ng)	NMOR ng/g	Tissue mean wt (g)	NMOR (ng/tissue)
Whole mouse (4)	82.1	668	NA	NA	NA	27.7	NA
Whole mouse (4)	93.2	374	NA	NA	NA	27.7	NA
Whole mouse (4)	107.2	10780	15.2	70921	662	27.7	18326
Whole mouse (4)	92.8	4420	33.8	13077	141	27.7	3903
Skin (10)	65.2	2950	NA	NA	NA	4.3	NA
Skin (10)	68.3	15440	40.5	38123	558	4.3	2400
Skin (10)	86.9	21620	25.4	85118	979	4.3	4212
Skin (10)	60.8	9770	36.2	26989	444	4.3	1909
Stomach (15)	14.7	390	47.8	816	56	1	56
Stomach (15)	12.6	370	41.8	885	70	1	70
Stomach (15)	13.2	612	42.8	1430	108	1	108
Stomach (15)	12.4	394	46.2	853	69	1	69
Remains (4)	72.7	466	31.1	1498	21	22.2	458
Remains (4)	64.4	630	30.8	2045	32	22.2	705
Remains (4)	77.8	120	31.7	379	5	22.2	108
Remains (4)	76.9	678	26.1	2598	34	22.2	750

NA, not available (too little internal standard added).

e. Chez le cobaye

Garcia Roche et Ziebarth (1987) ont étudié la formation de NMOR dans l'estomac de cobayes. Cette espèce a été retenue par les auteurs car le pH gastrique des cobayes est proche de celui de l'Homme. Les plus fortes quantités de nitrite (12,7 - 13,9 μ g) ont été mesurées dans l'estomac 18 min après l'administration intragastrique de 250 mg de nitrate de sodium. La formation de NMOR a été observée *in vivo* 18 min après l'administration de 250 mg de nitrate de sodium avec 250 mg de MOR

à des cobayes après 24 h de jeûne (Tableau XVI). La réduction des nitrates en nitrites dans l'estomac était suffisante pour former de la NMOR.

Tableau XVI. Formation *in vivo* de NMOR dans l'estomac de cobaye (Garcia Roche et Ziebarth 1987).

Stomach pH	Treatment	NMOR	
		μg	$\mu\text{g}/\text{kg}$
2.6-2.8	Control	0	0
2.5-2.9	250 mg sodium nitrate	0	0
2.9-3.0	250 mg morpholine	0 - 0.17	7.7
2.6-3.2	250 mg sodium nitrate + 250 mg morpholine	1.1-3.16	110-395

En conclusion, le CES VSR considère un taux de conversion de MOR en NMOR de 19 % issu de l'étude d'Edwards, Whong, et Speciner (1979).

ANNEXE 5 : CONSTRUCTION D'UNE VTR POUR LA MORPHOLINE**1. Choix de l'effet critique**

Aucun effet cancérogène n'a été observé dans les études exposant les animaux à la MOR seule.

Des effets hématologiques (légère anémie régénérative) ont été observés chez des rates Wistar gravides exposées par voie orale (gavage) dès 250 mg.kg⁻¹.j⁻¹ de chlorhydrate de MOR pendant 14 jours (GD6-15) (BASF 2009 cité par OCDE 2013, NICNAS 2015, ECHA 2019b). Les études chroniques disponibles chez la souris ne mettent pas en évidence d'effet hématologique (Shibata, Kurata, Ogiso, *et al.* 1987, Shibata, Kurata, Tamano, *et al.* 1987).

Suite à une exposition chronique par voie orale, la MOR induit principalement des effets rénaux chez des souris (augmentation de la masse des reins, léger gonflement des tubules proximaux, augmentation de la densité urinaire et de l'azote uréique) (Shibata, Kurata, Ogiso, *et al.* 1987, Shibata, Kurata, Tamano, *et al.* 1987).

Ainsi, le CES VSR retient comme **effet critique la néphrotoxicité**.

2. Choix de l'étude clé

Seules deux études (sub)chroniques chez la souris, réalisées par la même équipe, mettent en évidence des effets rénaux (Shibata, Kurata, Ogiso, *et al.* 1987, Shibata, Kurata, Tamano, *et al.* 1987) (Tableau XVII). Une augmentation de la masse absolue des reins apparaît dès 0,25 % d'oléate de MOR (équivalent à 71 mg.kg⁻¹.j⁻¹) uniquement chez les femelles dans l'étude 96 semaines. Cet effet n'a pas été retenu car à la même dose, une diminution du gain de masse corporelle a été observée. Dans leur étude 13 semaines, Shibata, Kurata, Tamano, *et al.* (1987) ont observé dès 0,6 % (équivalent à 235 mg.kg⁻¹.j⁻¹) des effets rénaux différents en fonction du sexe : augmentation de l'azote uréique chez les femelles et augmentation de la densité urinaire chez les mâles. Dans cette même étude, une augmentation significative de la masse relative des reins a été mise en évidence dans les deux sexes et a été retenu par le CES VSR comme effet critique.

Shibata *et al.* précisent la quantité de nitrites présents dans l'alimentation et l'eau de boisson dans son étude de cancérogénicité (Shibata, Kurata, Ogiso, *et al.* 1987) mais pas dans son étude 13 semaines (Shibata, Kurata, Tamano, *et al.* 1987). Le CES VSR a considéré que cette information était également valable pour l'étude 13 semaines.

Cette étude de bonne qualité (Klimisch 1 selon ToxRtool), bien qu'étant une étude subchronique, présente plusieurs avantages (cinq doses testées, couple NOAEL / LOAEL = 0,6 % / 1,25 %, soit 236 / 401 mg.kg⁻¹.j⁻¹).

Tableau XVII. Synthèse des effets rénaux observés dans les études de Shibata *et al.*

	Shibata, Kurata, Tamano, <i>et al.</i> (1987) Étude 13 semaines	Shibata, Kurata, Ogiso, <i>et al.</i> (1987) Étude 96 semaines
Doses testées	0 - 0,15 - 0,3 - 0,6 - 1,25 et 2,5 % d'oléate de MOR (0, 71, 141, 235, 400 et 730 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ de MOR)	0 - 0,25 et 1 % d'oléate de MOR (♂ : 71 et 283 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ ; ♀ : 71 et 236 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹)
Masse corporelle	2,5 % : légère ↓ masse corporelle chez ♂ (non significatif)	0,25 % : ↓ gain de masse corporelle dès 26 ^e semaine (♀) 1 % : ↓ gain de masse corporelle chez ♂ dès 4 ^e semaine et ♀ dès 13 ^e semaine
Masse des reins	dès 1,25 % : ↑ masse relative des reins chez ♂ et ♀	à 0,25 % : ↑ masse absolue des reins (♀) et ↓ à 1 % (♀)
Masse d'autres organes	Pas de modification significative	1 % : ↓ masse absolue du cœur (2 sexes) et du foie (♀)
Azote uréique plasmatique	dès 0,6 % : ↑ chez ♀ et dès 1,25 % chez les ♂	1 % : ↑ chez ♂
Densité urinaire	dès 0,6 % : ↑ chez ♂ puis dès 1,25 % chez ♀	Recherché mais non modifiée
Histopathologie	à 2,5 % : léger gonflement des tubules proximaux (2 sexes)	
Consommation d'eau	Dès 1,25 % : ↓ (2 sexes)	1 % : ↓ (2 sexes)
Hyperplasie de l'épithélium squameux du pré-estomac	/	1 % : ↑ incidence de l'hyperplasie de l'épithélium du préestomac (♂)

Le CES VSR retient comme étude clé l'étude subchronique de Shibata, Kurata, Tamano, *et al.* (1987) mettant en évidence une augmentation de la masse relative des reins à 1,25 % (NOAEL = 0,6 % = 236 mg.kg⁻¹.j⁻¹).

Néanmoins, le CES VSR note des incohérences entre les études subchronique et chronique concernant les effets sur le masse relative des reins (Tableau XVIII).

Tableau XVIII. Modifications de la masse des reins observées dans les études de Shibata *et al.*

Dose en %	Shibata, Kurata, Tamano, <i>et al.</i> (1987) Étude 13 semaines				Shibata, Kurata, Ogiso, <i>et al.</i> (1987) Étude 96 semaines					
	Masse absolue en g		Masse relative en %		Masse corporelle en g		Masse absolue en g		Masse relative en % ^a	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
0	0,52	1,57	0,35	1,39	-					
0,15	0,51	1,54	0,34	1,35	-					
0,25	-				39,2	37,9*	0,665	0,521*	1,70	1,37
0,3	0,50	1,51	0,37	1,41	-					
0,6	0,53	1,65	0,37	1,44	-					
1	-				33,9*	39,1	0,635	0,430*	1,87	1,10
1,25	0,53	1,68	0,37	1,48*	-					
2	0,54	1,74	0,39	1,59*	-					

^a Non renseigné dans la publication. Calculé par l'Anses : masse relative = (masse absolue/masse corporelle) x 100

3. Choix de la dose critique

Les données de l'étude de Shibata, Kurata, Tamano, *et al.* (1987) mettent en évidence une relation dose-réponse entre l'augmentation de la masse relative des reins et l'exposition à la MOR (sous forme de sel d'acide oléique) (Tableau XIX). Celle-ci a été modélisée à l'aide de l'outil en ligne de l'EFSA « *Open analytics* » basé sur le *package* R PROAST (version 65.7) pour l'élaboration d'une *Benchmark Dose* (BMD).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour *Benchmark Response* et correspond à un excès de risque de 5 % (BMR recommandé par l'Anses et l'EFSA pour les données quantales). Ceci signifie qu'*a priori*, une augmentation relative de 5 % de la masse des reins est biologiquement significative. Le niveau de confiance associé à la BMDL est de 90 % (recommandations de l'EFSA (2017)).

Dans un premier temps, la modélisation BMD a été réalisée en utilisant l'ensemble des animaux (mâles + femelles) en considérant le sexe comme une covariable. Cette modélisation permet de réduire l'incertitude sur la BMD car le nombre d'individus est plus important tout en modélisant la différence entre mâles et femelles. Dans un second temps, pour vérification et parce que l'étude a montré des résultats différents entre mâles et femelles, la BMD a été construite indépendamment pour les mâles et les femelles.

Lors de la détermination de la BMDL, plusieurs modèles mathématiques ont été testés. Les modèles de Hill et exponentiels à trois paramètres s'ajustent le mieux aux données expérimentales (meilleur critères d'Akaïké). Comme les deux modèles donnent des résultats très proches, celui présentant la BMDL la plus faible a été systématiquement choisi (recommandations de l'EFSA (2017)).

Tableau XIX. Résumé des données modélisées.

Oléate de MOR en %	Oléate de MOR en g.kg ⁻¹ .j ⁻¹	Apport de MOR calculé par l'Anses en g.kg ⁻¹ .j ⁻¹ a	Masses relatives des reins en % ± sd	
			Mâles	Femelles
0	0	0	1,57 ± 0,11	1,39 ± 0,07
0,15	0,3	0,071	1,54 ± 0,10	1,35 ± 0,10
0,3	0,6	0,141	1,51 ± 0,19	1,41 ± 0,08
0,6	1	0,236	1,65 ± 0,07	1,44 ± 0,12
1,25	1,7	0,401	1,68 ± 0,09*	1,48 ± 0,09*
2,5	3,1	0,731	1,74 ± 0,14**	1,59 ± 0,08**

* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; sd : standard deviation

a La conversion de la dose en % d'oléate de MOR en dose de MOR a été réalisée en faisant le rapport entre la dose de sel de MOR en g.kg⁻¹.j⁻¹ et la proportion de MOR présente dans le sel (masse molaire de la MOR/masse molaire du sel = 87,12/369,59 = 0,24).

Tableau XX. Résultats de la modélisation pour un BMR de 5 %.

Sexe	BMDL en g.kg ⁻¹ .j ⁻¹	BMDU en g.kg ⁻¹ .j ⁻¹	BMD en g.kg ⁻¹ .j ⁻¹
Mâles + Femelles (covariable)	0,18	0,36	0,26
Mâles	0,17	0,36	0,22
Femelles	0,13	0,46	0,28

Pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90 % d'une dose correspondant à une augmentation de 5 % de la réponse par rapport au groupe non exposé, il a été retenu la modélisation réalisée en utilisant l'ensemble des animaux (mâles + femelles).

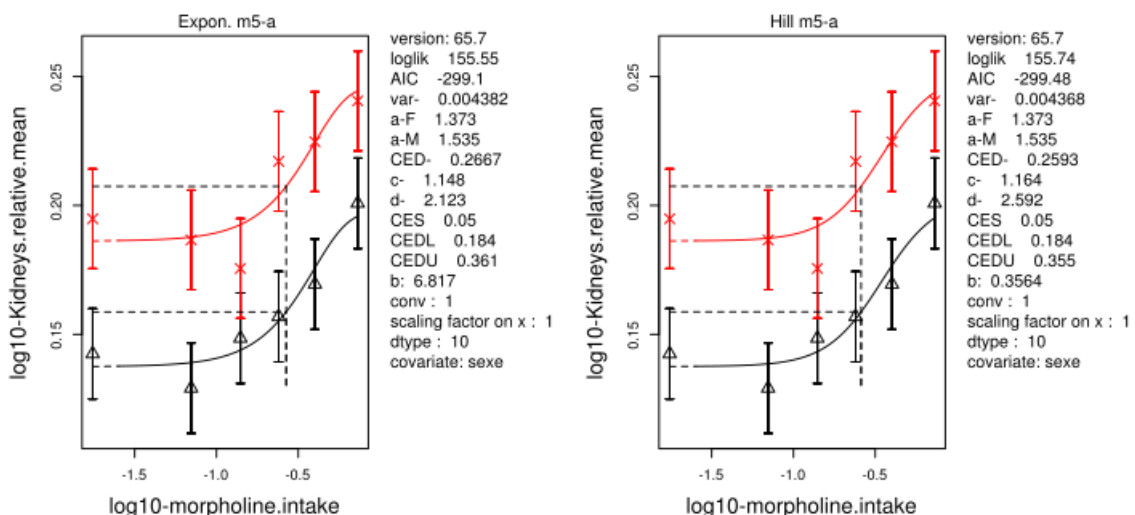


Figure 3. Modélisation de l'augmentation de la masse relative des reins.

Les doses critiques calculées sont :

$$\text{BMD}_{5\%} = 0,26 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \text{ et } \text{BMD}_{5\%L_{90\%}} = 0,18 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$$

4. Ajustement allométrique

Pour réduire la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèce, un ajustement allométrique a été réalisé. Une dose équivalente humaine (HED = Human Equivalent Dose) est calculée à l'aide de l'équation suivante (US EPA 2006) :

$$\text{Dose équivalente Homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Masse animal}}{\text{Masse Homme}} \right)^{1/4}$$

La masse moyenne des souris en fin d'étude est de 30,1 g (moyenne des masses des femelles, 26 g, et des mâles, 36,4 g). Celui utilisé pour l'Homme pour le calcul est de 70 kg.

Soit une dose critique $\text{BMDL}_{\text{HED}} = 26 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

5. Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de la BMDL_{HED} a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2017) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5
 - L'ajustement dosimétrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'OMS (2005) et sur la base des pratiques de l'Anses ;
- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10
 - Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée ;
- Transposition subchronique à chronique (UF_S) : 3 car l'étude clé est une étude subchronique (13 semaines) ;
- Utilisation d'une BMDL ($\text{UF}_{B/L}$) : 1 ;
- Insuffisance des données (UF_D) : 3.

Un **facteur d'incertitude global de 225** est donc utilisé pour la construction de la VTR.

6. Proposition de VTR chronique par voie orale

Tableau XXI. VTR chronique par voie orale pour la morpholine sous forme de sel.

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
Néphrotoxicité : augmentation de la masse relative des reins (Shibata, Kurata, Tamano, <i>et al.</i> (1987) : étude 13 semaines chez des souris)	NOAEL = 0,6 % = 236 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ $\text{BMD}_{5\%L90\%} = 0,18 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ <u>Ajustement allométrique</u> $\text{BMD}_{5\%L90\% \text{ HED}} = 0,026 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$	225 UF_A : 2,5 UF_H : 10 UF_S : 3 UF_D : 3	0,12 $\text{mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Le CES VSR souligne que cette VTR ne protège pas des effets locaux de la MOR sous forme de base, ni des effets dus à la NMOR potentiellement formées de manière endogène en cas de co-exposition avec des nitrates, nitrites ou NOx.