



**COMITÉ SCIENTIFIQUE
DE L'AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE
DE LA CHAINE ALIMENTAIRE**

AVIS 06-2009

Objet: Mélatmine dans le lait destiné aux préparations (de suite) pour nourrissons (dossier Sci Com 2008/25)

Avis validé par le Comité scientifique le 13 mars 2009.

Résumé

À la suite d'une contamination frauduleuse de lait et de lait en poudre par de la mélatmine, plus de 51.900 nourrissons et jeunes enfants ont été hospitalisés et au moins six bébés sont décédés en Chine. La mélatmine est une substance chimique utilisée entre autres pour la fabrication de plastiques, de revêtements, de retardateurs de flamme, de résines et de colles. La mélatmine, qui n'est ni cancérogène, génotoxique ou tératogène, s'avère toutefois provoquer la formation de calculs rénaux voire d'une insuffisance rénale lors d'une exposition de longue durée.

Sur base des données disponibles, il est possible de déterminer une limite d'action (teneur maximale). Il faut cependant souligner qu'il subsiste encore de nombreuses lacunes, en particulier concernant les propriétés toxicologiques de la mélatmine (et analogues), par ex. lors de l'exposition de longue durée des enfants. De plus, le Comité scientifique souhaite insister sur le fait que les concentrations en contaminants potentiels dans les préparations (de suite) pour nourrissons doivent toujours être aussi basses que possible, dans les limites de faisabilité. Il est recommandé au consommateur de s'en tenir aux marques agréées de préparations (de suite) pour nourrissons, dont la composition doit répondre aux normes légales.

Par ailleurs, il faut remarquer que le problème risque de persister un certain temps vu que les produits concernés sont susceptibles d'être stockés (lait en poudre, etc.). Il est recommandé à l'industrie de mentionner dans son système d'autocontrôle que la mélatmine et la fraude potentielle à l'azote non protéique constituent un danger potentiel.

Summary

Advice 06-2009 of the Scientific Committee of the FASFC on melamine in milk for infant formulas

Due to adulteration of milk and milk powder with melamine, more than 51,900 Chinese infants and young children were hospitalized and at least six infants died. Melamine is a chemical that is used in the manufacture of plastics, coatings, flame retardants, resins and adhesives. Melamine, which is not carcinogenic, genotoxic or teratogenic, can however, cause the formation of kidney stones or even kidney failure after prolonged exposure.

Based on the available data it is possible to fix an action limit (maximum concentration). Nevertheless, it should be noted that many lacunas remain, particularly regarding the toxicological properties of melamine (and analogues) e.g. regarding long-term exposure of children. The Scientific Committee wishes furthermore to emphasize that concentrations of potential contaminants in infant formulas should always be as low as reasonably achievable. The consumer is advised to stick to recognized brands of infant formulas, as their composition must comply with regulatory standards.

Additionally it is noted that the problem can drag on for a long time given the incident concerns products with a prolonged shelf life (milk powder, etc.). The industry is

recommended to include melamine and possible fraud with non-protein nitrogen as a potential hazard in their self-control system.

Mots-clés

mélamine, lait, préparations pour nourrissons, évaluation du risque

1. Termes de référence

1.1. Question

Il est demandé au Comité scientifique de réaliser une évaluation du risque concernant la présence de mélamine dans le lait destiné aux préparations (de suite) pour nourrissons.

1.2. Contexte législatif

Arrêté royal du 19 décembre 2008 relatif à des conditions spéciales pour l'importation de produits contenant du lait, des produits laitiers, du soja, des produits de soja ou du bicarbonate d'ammonium originaires ou expédiés de Chine ;

Arrêté royal du 18 février 1991 relatif aux denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière ;

Arrêté royal du 11 mai 1992 concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires ;

Vu les discussions menées durant les réunions de groupe de travail du 1^{er} décembre 2008 et du 16 janvier 2009, et la séance plénière du 13 mars 2009 ;

le Comité scientifique émet l'avis suivant :

2. Introduction

En automne 2008, plus de 51.900 nourrissons et jeunes enfants ont été hospitalisés et au moins six bébés sont décédés en Chine des suites de problèmes urinaires, notamment des insuffisances rénales et de la formation de calculs rénaux. Cette affection rare chez les enfants en bas âge a été mise en relation avec la consommation de préparations pour nourrissons et de produits laitiers apparentés contaminés à la mélamine (Langman, 2009; Na Guan *et al.*, 2009; WHO, 2008). En dehors des préparations pour nourrissons et du lait, de la mélamine a également été découverte dans des desserts surgelés à base de yaourt, des biscuits, des bonbons et des boissons au café, produits qui avaient probablement été fabriqués avec des ingrédients à base de lait contaminé à la mélamine.

Il s'est avéré que la mélamine avait été ajoutée délibérément afin de simuler une teneur plus élevée en protéines. La mélamine contient beaucoup d'azote et la méthode utilisée le plus souvent dans l'industrie alimentaire pour mesurer la teneur en protéines est en effet un test d'azote.¹ La fraude semble avoir été commise au cours de la production primaire du lait, dans les stations de collecte du lait (WHO, 2008).

Un incident similaire dû à la mélamine est survenu en 2007 aux Etats-Unis, au Canada et en Afrique du Sud avec des aliments pour animaux de compagnie. La contamination a été retracée jusqu'à du gluten de froment et de maïs et du concentré de protéines de riz originaires de Chine. Un certain nombre de chiens et de chats sont morts des suites d'une insuffisance rénale, et il est possible que la combinaison de mélamine et d'acide cyanurique ait été responsable de la toxicité observée (Dobson *et al.*, 2008; EFSA, 2007; FDA, 2007). La mélamine avec laquelle le lait a été contaminé en Chine contiendrait relativement peu d'impuretés, avec des teneurs en analogues de la mélamine - acide cyanurique, ammeline et ammelide - inférieures à 0,1% de la teneur détectée en mélamine. C'est largement inférieur à la teneur en analogues qui a été observée dans les aliments contaminés pour animaux lors de l'incident dû à la mélamine de 2007 (WHO, 2008). Sur base des données actuellement disponibles, il ressort que les nourrissons chinois ont principalement été exposés à de la

¹ par ex. la méthode de Kjeldahl

mélamine seule ou à de la mélamine avec des traces d'acide cyanurique, tandis que les animaux domestiques avaient été exposés à une combinaison de mélamine et d'acide cyanurique, et probablement également d'ammeline et d'ammelide. Les nourrissons contaminés ont développé des calculs urinaires, tandis que les animaux domestiques avaient développé des cristaux dans les tubules rénaux, suivis d'une néphropathie obstructive. Suite à l'exposition élevée, les animaux domestiques ont été atteints d'insuffisance rénale aiguë dans les deux jours, alors que la plupart des nourrissons ayant des calculs rénaux ne présentaient pas de symptômes cliniques manifestes (Langman, 2009; Na Guan *et al.*, 2009; WHO, 2008).

Dans le cadre de l'incident de la mélamine dans le lait, la Commission européenne a pris quelques mesures de sauvegarde qui sont prévues dans la Décision de la Commission du 14 octobre 2008 imposant des conditions spéciales pour l'importation de produits contenant du lait ou des produits laitiers originaires ou expédiés de Chine et abrogeant la Décision 2008/757/CE (2008/798/CE), transposée en l'AR du 19 décembre 2008. Les dispositions suivantes sont prévues :

Les importations de lait et de produits laitiers, y compris de lait en poudre, et de produits composés originaires de Chine destinés spécifiquement à l'alimentation des nourrissons ou enfants en bas âge, ne sont pas autorisées

Les autres produits composés (tels que les biscuits et le chocolat), qui ne représentent qu'une faible partie d'un régime équilibré, et contenant au moins 15 % de produits laitiers, sont systématiquement contrôlés lors de l'importation. Ces produits sont immédiatement détruits lorsque leur teneur en mélamine est supérieure à 2,5 mg/kg.

Pour le lait et les produits laitiers, y compris le lait en poudre, et les produits composés spécifiquement destinés à l'alimentation des nourrissons ou enfants en bas âge, il est difficile de définir une limite d'action (teneur maximale), entre autres parce que ces produits constituent pendant une période assez longue la seule source de nourriture des nourrissons. Certains pays tiers exigent toutefois une attestation confirmant l'absence de mélamine dans ces produits.

C'est dans ce contexte qu'il est demandé au Comité scientifique de réaliser une évaluation du risque au sujet de la présence de mélamine dans le lait destiné aux préparations (de suite) pour nourrissons.

3. Evaluation du risque

3.1. Identification des dangers

3.1.1. Données techniques

La mélamine (N° CAS 108-78-1) est légèrement soluble dans l'eau et insoluble dans l'éther. La solubilité de la mélamine dans l'eau s'élève à 3,2 g/l, celle de l'acide cyanurique à 2,0 g/l et celle du complexe mélamine-cyanurate à 0,002 g/l (20°C) (Dobson *et al.*, 2008; ECB, 2000). La constante de dissociation (pKa) pour la mélamine et l'acide cyanurique atteint respectivement 5,35 et 4,74 (25°C) (FDA, 2007).

La mélamine (1,3,5-triazine-2,4,6-triamine) peut être décomposée par hydrolyse bactérienne via trois réactions successives de désamination en ses composés analogues ammeline (4,6-diamino-2-hydroxy-1,3,5-triazine, N° CAS 645-92-1), ammelide (6-amino-2,4-dihydroxyl-3,5-triazine, N° CAS 645-93-2) et acide cyanurique (1,3,5-triazine-2,4,6-triol en équilibre avec -en fonction du pH- la forme trion, N° CAS 108-80-5) (WHO, 2008; EFSA, 2007; ECB, 2000) (Figure 1).

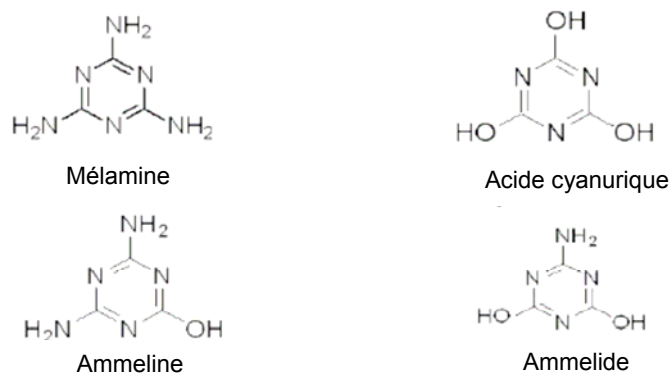


Figure 1. Structure de la mélamine et de ses analogues

Méthode d'analyse

La teneur en mélamine et analogues peut être mesurée par ELISA, HPLC-UV, GC-MS(/MS), LC-MS(/MS)². Différentes méthodes d'analyse rapides ont été développées récemment, avec une limite de quantification jusqu'à environ 50 µg/kg. Un aperçu non exhaustif et informatif est donné sur le site web de l'OMS (WHO, 2008).

3.1.2. Synthèse de la mélamine

La mélamine a initialement été produite à partir de carbure de calcium (tiré du charbon et du calcaire), converti via le cyanamide de calcium en dicyandiamide. Par chauffe de ce dernier au delà de sa température de fusion la mélamine est formée. A présent, la plupart des fabricants utilisent de l'urée pour produire de la mélamine, l'urée fondue étant trimérisée en mélamine à 400°C lors d'une réaction catalytique en 1 phase avec libération d'ammoniac et de CO₂ (Figure 2). Le processus peut être réalisé tant à basse pression (phase gazeuse) qu'à haute pression (phase liquide). Dans ce dernier cas, de l'acide cyanurique (HOCN) est formé comme produit intermédiaire (Kirk-Othmer, 2004; Wittcof *et al.*, 2004; ECB, 2000). Lors de la cristallisation et du rinçage de la mélamine, une quantité considérable d'eau résiduelle est produite qui, outre de la mélamine, peut également contenir des oxyaminotriazines (ammeline, ammelide), de l'acide cyanurique et des polycondensats (mélem, mélam et mélon). Ces substances peuvent être récupérées presque entièrement par vaporisation, filtration, floculation et coagulation, et être transformées en résines (Lahali & Absi-Halabi, 1989).

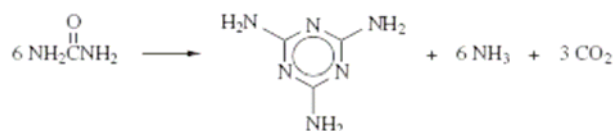


Figure 2. Synthèse de la mélamine (Kirk-Othmer, 2004).

3.1.3. Applications / Occurrence

La mélamine est utilisée dans la fabrication notamment de plastiques, revêtements, retardateurs de flamme, résines et colles. La mélamine est solide, légère, rigide et résistante

² ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; GC: Gas Chromatography; HPLC: High-Pressure Liquid Chromatography; LC: Liquid Chromatography; MS: Mass Spectrometry; UV: Ultraviolet

aux acides et aux bases, ce qui explique son utilisation pour la production entre autres d'assiettes et de couverts, et comme composant principal de la couche supérieure de formica et de sols laminés. On trouve également de la mélamine dans des extincteurs (dans une certaine proportion avec l'acide cyanurique) et elle constitue un métabolite important de la cyromazine, un insecticide (EMEA, 2001; ECB, 2000; EPA, 1999).

L'acide cyanurique est un analogue structurel de la mélamine et peut être rencontré comme impureté de la mélamine. L'acide cyanurique est autorisé par la 'Food and Drug Administration' américaine (FDA) comme composant d'un additif alimentaire pour ruminants. L'exposition à l'acide cyanurique est possible via l'eau de baignade désinfectée au dichloro-iso-cyanurate, via l'eau potable désinfectée³ provenant des eaux de surface, et via le poisson, dans lequel une accumulation d'acide cyanurique est susceptible de se produire (WHO, 2008).

3.1.3 Toxicité

La mélamine est classée dans le Groupe 3 (insuffisance de preuves de la cancérogénicité de la mélamine pour l'homme) par le 'Centre International de Recherche sur le Cancer' (CIRC) (IARC, 1999). La mélamine n'est ni génotoxique, ni cancérogène, ni tératogène.

Différentes expériences ont été menées sur des animaux, y compris des tests biologiques de cancérogénicité, au cours desquels de la mélamine a été administrée de façon répétée par voie orale à des souris, des rats et des chiens. Les principaux organes-cibles, identifiés lors des expériences subchroniques et chroniques, se sont révélés être la vessie et les reins. Dans des tests biologiques de cancérogénicité chez des rats F344/N, des carcinomes des cellules transitionnelles de la vessie ont été observés à haute dose chez les mâles (4500 ppm, équivalent à 263 mg/kg poids corporel (pc) par jour) et des papillomes de la vessie chez les femelles (1 dans le groupe 4500 ppm et 1 dans le groupe 9000 ppm), ainsi que des signes de néphrite chronique (NTP, 1983). La dose sans effet néfaste observé (NOAEL, 'No Observed Adverse Effect Level') s'élevait chez les mâles à 2250 ppm, équivalent à 126 mg/kg pc par jour. Chez les femelles, aucune NOAEL n'a pu être déterminée, et la LOAEL ('Lowest Observed Effect Level', dose minimale observée induisant un effet néfaste) était de 4500 ppm, équivalent à 262 mg/kg pc par jour. Une TD₅₀⁴ de 735 mg/kg pc par jour a été estimée (Gold *et al.*, 1989). On a également observé le développement de calculs dans la vessie et des modifications épithéliales hyperplasiques de la vessie. Aucun effet néoplasique significatif n'a été observé chez les rattes ou chez les souris B6C3F1 des deux sexes. Chez les souris mâles, des augmentations de l'incidence des calculs vésicaux, de l'inflammation aiguë et chronique de la vessie et de l'hyperplasie de l'épithélium vésical liées au traitement ont été observées à des doses de 2250 et 4500 ppm. Ces trois phénomènes ont également été observés chez 4 des 50 souris femelles à la dose la plus élevée de 4500 ppm. Aucune NOAEL n'a pu être établie pour les mâles, et la LOAEL s'élevait à 2250 ppm, équivalent à 327 mg/kg pc par jour. Chez les femelles, la NOAEL était de 2250 ppm, équivalent à 523 mg/kg pc par jour.

Il semble qu'il existe une corrélation significative entre le développement de tumeurs de la vessie chez les rats mâles et la formation de calculs. Des études ultérieures avec polyurie induite de manière artificielle (ajout de NaCl au régime alimentaire, induisant une augmentation des mictions) ont démontré que la diminution de la formation de calculs résultait en une diminution des lésions prolifératives de la vessie et de l'incidence tumorale (Ogasawara *et al.*, 1995). Étant donné que des études complémentaires ont démontré que la mélamine n'était pas initiatrice de tumeurs et n'était ni mutagène ni génotoxique dans une large gamme de tests *in vitro* et *in vivo*, le mécanisme de formation tumorale dans la vessie est considéré comme non génotoxique ou épigénétique (Health Canada, 2008a).

De nombreuses données sont disponibles concernant la toxicité de l'exposition à la mélamine ou à l'acide cyanurique séparément, par contre les données toxicologiques sur l'exposition combinée à la mélamine et à l'acide cyanurique sont très limitées (entre autres concernant les doses administrées et le nombre d'animaux de laboratoire), et restreintes aux poissons (Reimschuessel *et al.*, 2008), aux porcs (Reimschuessel *et al.*, 2008), aux chats (Puschner *et*

³ pas directement pertinent pour la Belgique

⁴ dose qui entraîne un effet toxique chez 50% des animaux de laboratoire

al., 2007) et aux rats (Dobson *et al.*, 2008). Chez tous ces animaux de laboratoire, une toxicité rénale aiguë a été observée, avec formation de structures cristallines obstruant les tubules (voir plus loin).

Les principaux symptômes signalés chez les nourrissons qui ont été exposés à des préparations contaminées à la mélamine concernaient essentiellement des troubles rénaux de sévérité variable (calculs rénaux, obstruction rénale, insuffisance rénale, carence rénale). Pourtant, les études expérimentales alimentaires avec la mélamine avait essentiellement mis en évidence des effets vésicaux (calculs vésicaux, hyperplasie épithéliales, tumeurs), bien que plusieurs signes de toxicité rénale aient aussi été observés chez les rattes (inflammation chronique, fibrose). Cette disparité apparente entre espèces peut être la conséquence d'un certain nombre de facteurs, parmi lesquels des différences fonctionnelles et/ou anatomiques entre les reins du rat et ceux de l'homme, la capacité d'épuration rénale, le stade de développement ou la présence d'autres contaminants (Health Canada, 2008a).

Métabolisation

Les données disponibles indiquent que la mélamine est excrétée relativement rapidement sous forme inchangée via l'urine, avec une demi-vie plasmatique d'environ 3 heures (OECD, 1998; EFSA, 2007). Une évaluation du risque réalisée par l'Agence américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA) indique que l'accumulation dans des tissus d'animaux destinés à la consommation (porc, poulet et poisson) qui ont reçu de la nourriture contaminée (aux concentrations rapportées pendant l'incident 2007 à la mélamine) est peu probable (FDA, 2007). En outre, il ressort d'études pharmacocinétiques où de la mélamine a été injectée par voie intraveineuse, que celle-ci est excrétée rapidement et totalement par les reins avec une demi-vie ($T_{1/2}$) de 4 heures chez les porcs et de 2,7 heures chez les rats. Aucune liaison significative aux tissus ou rétention dans l'organisme n'a été observée (Baynes *et al.*, 2008).

En ce qui concerne l'acide cyanurique, plus de 98% d'une dose administrée par voie orale chez l'homme est excrétée sous forme inchangée dans les 24 heures via l'urine (Allen *et al.*, 1982 cité par la WHO, 2008).

En revanche, des indications montrant la présence de mélamine dans les tissus animaux (y compris le poisson), le lait et les oeufs, indiquent un transfert de l'alimentation animale vers les tissus animaux destinés à la consommation humaine, le lait et les oeufs. A ce sujet l'Agence française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a émis un avis concernant le transfert de mélamine vers les denrées alimentaires de volaille de chair et de poules pondeuses (AFSSA, 2008b). Via le système d'autocontrôle, un opérateur a découvert de la mélamine dans des tourteaux de soja originaires de Chine, à des concentrations de 116 et 400 mg/kg. Ces tourteaux de soja étaient destinés à l'alimentation des volailles de chair et des poules pondeuses, avec un mélange de maximum de 10% dans les aliments composés. Des teneurs en mélamine de 70 mg/kg ont été observées dans quatre échantillons d'aliments composés. La viande et les oeufs des volailles qui avaient été nourries avec ces tourteaux de soja ne contenaient toutefois aucune trace de mélamine. Même dans la littérature, une corrélation statistique n'a pas directement été retrouvée entre l'exposition à la mélamine et la présence de résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale. Bien que les porcs et les volailles puissent être comparés en termes d'habitudes alimentaires, il existe bien des différences entre les mammifères et les oiseaux en ce qui concerne l'excrétion de l'azote (AFSSA, 2008b).

En ce qui concerne la détection de mélamine dans des oeufs rapportée à Hong-Kong (2,9; 3,1 et 4,7 mg/kg), l'AFSSA évoque la cyromazine comme source potentielle de contamination (AFSSA, 2008 a&b). Environ 10% de cyromazine est métabolisé *in vivo* en mélamine. La cyromazine est utilisée comme pesticide, comme larvicide chez les volailles (incorporé dans l'alimentation des volailles en Europe jusque 2005), et comme biocide pour le contrôle des insectes chez les animaux domestiques (AFSSA, 2008b).

En raison d'incohérences dans le nombre limité de données, il n'est actuellement pas encore possible de réaliser une bonne estimation d'un ratio de transfert aliment-tissus (lait, oeufs) (WHO, 2008).

Accumulation de mélamine dans les reins : formation de calculs rénaux

Lors de l'incident à la mélamine de 2007 avec des aliments destinés aux animaux de compagnie, la présence de contaminants de structure apparentée à la triazine a été démontrée, à savoir l'ammeline, l'ammelide et l'acide cyanurique. Des expériences d'alimentation à court terme sur des chats ont démontré que, alors que la mélamine et l'acide cyanurique ne provoquaient pas d'effets sur les reins séparément, une administration combinée résultait en l'apparition de cristaux et des lésions dans le tissu rénal, et de signes cliniques d'atteinte rénale (Puschner *et al.*, 2007). Des observations similaires de formation de cristaux dans les reins et de dommages rénaux ont été faites lors d'expériences où des porcs et des poissons étaient exposés via l'alimentation à des doses combinées de mélamine et d'acide cyanurique (Reimschuessel *et al.*, 2008). De plus, dans des études d'administration aiguë par voie orale chez des rats, les mélanges de mélamine et d'acide cyanurique, ou de mélamine et des trois contaminants triazines liées citées plus haut, provoquaient la formation de cristaux et des dommages rénaux (Dobson *et al.*, 2008).

Malgré l'excrétion rapide de mélamine via l'urine, en présence de concentrations suffisamment élevées la mélamine peut s'accumuler dans les reins (la $T_{1/2}$ dans les reins peut être 7 fois plus élevée que dans le plasma) (Baynes *et al.*, 2008; WHO, 2008). On suppose que, après ingestion, la mélamine (et l'acide cyanurique) est absorbée dans le tube digestif, passe dans la circulation systémique et, pour des raisons qui ne sont pas encore totalement connues, précipite dans les tubules rénaux lorsque l'urine est saturée, entraînant la formation des cristaux, une obstruction et une dégénérescence tubulaire progressive (Dobson *et al.*, 2008). A long terme, ces cristaux sont susceptibles de provoquer des calculs rénaux, une ulcération de la muqueuse, des inflammations et des tumeurs. Des expériences animales ont montré que le dépôt de cristaux se produit principalement dans les tubules distaux et les canaux collecteurs des reins (Baynes *et al.*, 2008).

Via des réseaux intramoléculaires d'hydrures et des interactions π - π entre les anneaux aromatiques, la mélamine peut s'associer en complexes moléculaires élevés avec l'acide cyanurique et d'autres analogues, ainsi qu'avec l'acide urique et d'autres biomolécules renfermant une imide cyclique (Dobson *et al.*, 2008; WHO, 2008). La solubilité de la mélamine dans l'eau est de 3240 mg/l et celle de l'acide cyanurique de 2000 mg/l. Toutefois, la mélamine et l'acide cyanurique forment ensemble une structure réticulaire très ordonnée à laquelle d'autres dérivés de la mélamine peuvent contribuer, avec l'ammeline comme substitut de la mélamine et l'ammelide pour l'acide cyanurique. La solubilité du complexe mélamine-cyanurate est seulement de 2,2 mg/l (Dobson *et al.*, 2008). En ce qui concerne l'incident du lait chinois, il ressort du nombre limité de données que les calculs rénaux sont composés d'acide urique et de mélamine dans un rapport molaire variant de 1,2:1 à 2,1:1, sans indications de la présence d'acide cyanurique ou d'autres analogues de la mélamine (WHO, 2008).

Incertitudes toxicologiques

Il subsiste encore un certain nombre d'incertitudes quant à la toxicité de la mélamine / des mélanges de mélamine (i.e. mélamine + analogues), à l'extrapolation à l'homme du mécanisme présenté de dommages rénaux chez les animaux, et aux différences possibles entre espèce concernant la pharmacocinétique ou la sensibilité aux effets toxiques des mélanges de mélamine. La relation dose-réponse et la dose seuil toxique des mélanges de mélamine seront très probablement différentes d'une espèce à l'autre et doivent être étudiées.

3.2. Caractérisation des dangers

Le 'Scientific Committee on Food' (SCF) a déduit pour la mélamine une DJT (dose journalière tolérable ou TDI, 'Tolerable Daily Intake') de 0,5 mg/kg pc par jour pour les matériaux en contact avec des denrées alimentaires. Aucun détail n'est donné sur la détermination de cette DJT (EFSA, 2007, 2008).

La FDA recommande une DJT similaire de 0,63 mg/kg pc par jour pour les denrées alimentaires et ingrédients alimentaires (à l'exclusion des préparations pour nourrissons)

(FDA, 2008). Cette DJT est basée sur une NOAEL qui a été déterminée sur base de l'induction d'une lithiase urinaire chez des rats mâles F344 exposés à la mélamine durant 13 semaines via l'alimentation (63-1500 mg/kg pc par jour) (Melnick *et al.*, 1984), et d'un facteur d'incertitude de 100.

Santé Canada recommande, pour les denrées alimentaires qui contiennent du lait ou des ingrédients dérivés du lait, une dose toxicologique de référence (DTR) plus basse de 0,35 mg mélamine /kg pc par jour (Health Canada, 2008a). Celle-ci est basée sur une analyse de la 'benchmark dose' (10% de réponse) pour la formation de lithiase urinaire et de l'incidence d'hyperplasie de l'épithélium de la vessie lors d'expériences d'expositions orales subchroniques via l'alimentation, où des BMDL₁₀ ('benchmark dose low level') de respectivement 35 et 104 mg/kg pc par jour ont été déterminées. Etant donné que la formation de calculs dans la vessie est considérée comme un précurseur du développement éventuel de tumeurs, la référence toxicologique adéquate recommandée est de 35 mg/kg pc par jour.

Concernant le cyanurate de sodium, une NOAEL de 154 mg/kg pc par jour a été établie dans une étude de 2 ans chez le rat. Sur base de cette NOAEL et en appliquant un facteur d'incertitude de 100, la DJT recommandée est de 1,5 mg/kg pc par jour (EFSA, 2007).

Aucune donnée n'est disponible dans la littérature au sujet de la toxicité de l'ammeline ou de l'ammelide chez les animaux ou chez l'homme (EFSA, 2007). L'EFSA conseille une DJT de 0,5 mg/kg pc par jour pour le total de mélamine et de ses analogues (ammeline, ammelide, acide cyanurique) (EFSA 2007, 2008).

En décembre 2008, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou WHO), en collaboration avec l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), a recommandé une DJT de 0,2 mg/kg pc par jour pour la mélamine, basée sur une BMDL₁₀ de 35 mg/kg pc par jour et un facteur d'incertitude de 200 (WHO, 2008). Sur base de cette DJT, 10 mg de mélamine par jour serait acceptable pour une personne de 50 kg. Cette DJT a été déterminée sur base d'études toxicologiques menées sur des rats en sevrage, avec application d'un facteur d'incertitude supplémentaire afin de tenir compte d'un certain nombre d'incertitudes dans l'ensemble des données. Par conséquent, la DJT est d'application à toute la population, y compris les nourrissons.

Cette DJT vaut uniquement pour la mélamine. La DJT de 1,5 mg/kg pc pour l'acide cyanurique est maintenue. La toxicité combinée de la mélamine et de l'acide cyanurique est probablement plus élevée que la toxicité de ces substances séparément. Les données disponibles jusqu'à présent sont toutefois insuffisantes pour établir des directives en matière de santé pour une telle co-exposition.

Tableau 1. Aperçu des valeurs DJT/DTR recommandées.

Mélamine	mg/kg pc par jour
EFSA (2007, 2008)	0,5
FDA (2008)	0,63
Health Canada (2008a)	0,35
WHO (2008)	0,2
Acide cyanurique	
EFSA (2007), WHO (2008)	1,5
Mélamine + analogues	
EFSA (2007)	0,5

3. Estimation de l'exposition

Les pages qui suivent donnent un aperçu des sources possibles d'exposition potentielle à la mélamine et traitent de l'exposition à la mélamine via adjonction frauduleuse dans les aliments. Le Comité scientifique estime que, sur base des données disponibles, l'évaluation de l'exposition de la population belge et en particulier des enfants en bas âge, ne présente pas un intérêt particulier. En effet, jusqu'à présent presque aucun produit contaminé à la

mélamine n'a été trouvé dans les rayons des magasins en Belgique et seul un scénario 'worstcase' irréaliste pourrait être élaboré pour l'évaluation de l'exposition. De plus, il est interdit d'importer des produits laitiers et apparentés, ainsi que des oeufs, originaires de Chine. Enfin, nous renvoyons à un certain nombre d'études d'exposition réalisées au niveau international (voir 3.3.3.).

3.3.1. Sources possibles d'exposition

Outre l'adjonction frauduleuse de mélamine dans le but d'augmenter artificiellement la teneur en protéines, des traces de mélamine peuvent être présentes dans l'environnement et la chaîne alimentaire suite à l'utilisation largement répandue de mélamine, par ex. dans des matériaux de contact et des pesticides. En outre, la mélamine et ses analogues peuvent également se retrouver dans l'environnement via, par exemple, les eaux résiduaires provenant d'applications industrielles ou de la production de mélamine. Des données à ce sujet ne sont toutefois pas disponibles (WHO, 2008).

L'exposition à la mélamine à la suite d'une contamination des denrées alimentaires par des pesticides est probablement négligeable. En Belgique, l'utilisation de cyromazine (produit commercial : Trigard, 100 g/l) est agréée en horticulture et pour un certain nombre de cultures légumières (endive, radicchio rosso, pain de sucre, mâche, tomates, laitues, céleri à côtes, roquette), et est spécifiquement destinée à lutter contre les larves de mouches mineuses.⁵

La trichloromélamine⁶ est autorisée aux Etats-Unis comme désinfectant/nettoyant de l'équipement utilisé dans l'industrie alimentaire, à l'exception du lait (FDA, 2008). Durant son utilisation, la trichloromélamine peut facilement se dissocier en mélamine. Il est supposé que seules des traces de mélamine se retrouveraient dans l'alimentation via cette utilisation (FDA, 2008).

La migration de mélamine à partir d'ustensiles de cuisine (par ex. gobelets durs en plastique) a lieu principalement dans le cas d'aliments acides (pH 2-5) à température élevée. Des teneurs en mélamine de l'ordre de 0,54 à 2,21 mg/kg ont ainsi été détectées dans du jus de citron et du jus d'orange, ainsi que dans du café et du lait caillé (après 30 min à 95°C) (ECB, 2000). D'autres études scientifiques relatives à la migration de mélamine depuis des ustensiles de cuisine sont notamment celles de Lund & Petersen (2006) et de Bradley *et al.* (2005). De plus, des traces de mélamine peuvent aussi migrer depuis l'équipement utilisé pour le traitement et la transformation industriels des denrées alimentaires. Suivant la référence, la quantité de mélamine qui se retrouverait dans l'alimentation via les matériaux de contact est estimée de l'ordre de 7 µg/kg (OECD, 1998) à moins de 15 µg/kg (FDA, 2008) par jour.

3.3.2. Exposition des enfants en bas âge via le lait contaminé

Groupe-cible & produits pertinents

Les nourrissons et les enfants en bas âge constituent un groupe-cible très sensible. De plus, il faut prendre en considération, lors de l'évaluation du risque, le groupe particulièrement sensible des bébés nés prématurément, qui sont également nourris avec des formules pour nourrissons, mais dont les reins ne sont pas encore totalement développés.

L'AR du 18 février 1991 donne les définitions suivantes :

- nourrissons : les enfants âgés de moins de douze mois ;
- enfants en bas âge : les enfants âgés de un à trois ans ;

et donne notamment des spécifications sur :

- les préparations pour nourrissons : les denrées alimentaires destinées à l'alimentation particulière des nourrissons pendant les premiers mois de leur vie et répondant à elles seules aux besoins nutritionnels de ces nourrissons jusqu'à l'introduction d'une alimentation complémentaire appropriée ;
- les préparations de suite : les denrées alimentaires destinées à l'alimentation particulière des nourrissons lorsqu'une alimentation complémentaire appropriée est

⁵ Fytoweb (<http://www.fytoweb.fgov.be/indexNL.asp>), consulté en novembre 2008.

⁶ Concernant la Belgique : la trichloromélamine ne figure pas dans la liste des substances actives autorisées

- introduite et constituant le principal élément liquide d'une alimentation progressivement diversifiée de ces nourrissons.
- les préparations à base de céréales : les préparations à base de céréales et/ou de racines amylacées qui satisfont aux exigences particulières des nourrissons et enfants en bas âge et en bonne santé et qui sont destinées à être utilisées pendant la période de sevrage des nourrissons et comme compléments à l'alimentation des enfants en bas âge et/ou en vue de leur adaptation progressive à une alimentation normale.
 - les aliments pour bébés : les denrées alimentaires qui satisfont aux exigences particulières des nourrissons et enfants en bas âge et en bonne santé et qui sont destinées à être utilisées pendant la période de sevrage des nourrissons et comme compléments à l'alimentation des enfants en bas âge et/ou en vue de leur adaptation progressive à une alimentation normale. Elles ne comprennent pas les préparations à base de céréales et les laits et les boissons de soja pour enfants en bas âge.

Outre le lait (en poudre), le soja (qui est utilisé comme substitut hypoallergénique du lait dans les préparations (de suite) pour nourrissons), les produits céréaliers et le bicarbonate d'ammonium (utilisé comme agent levant dans les biscuits et la pâtisserie, mais également dans les aliments pour bébés et les aliments à base de céréales destinés aux nourrissons et enfants en bas âge) constituent également des ingrédients importants dans les préparations (de suite) pour nourrissons, dont il faut tenir compte dans le cadre de la problématique de la mélamine.

Teneurs en mélamine des produits contaminés

En ce qui concerne la concentration en mélamine qui peut se retrouver dans les denrées alimentaires via les matériaux de contact et les pesticides, on ne dispose que d'un nombre limité de données en provenance de l'industrie alimentaire (voir 3.3.1.). Lorsque de telles teneurs en mélamine sont rapportées, généralement la limite de détection ou de quantification (LOD, 'limit of detection' ou LOQ, 'limit of quantification') pour la méthode d'analyse n'est pas mentionnée, mais plutôt une limite de rapportage (LOR, 'limit of reporting'). Cette LOR cadre dans un screening de la mélamine dans les produits, qui est effectué à des fins de gestion du risque (1,0 et 2,5 mg/kg). Ainsi, un fabricant connu de préparations pour nourrissons a rapporté, à la demande de l'Agence, des teneurs en mélamine inférieures à 0,05 mg/kg pour 98% des produits. Pour les 2% restants, la teneur en mélamine s'élevait à moins de 1 mg/kg ($n \geq 400$) (communication interne).

Dans le cadre de l'incident du lait, l'AQSIQ chinoise ('Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine') a notifié des teneurs en mélamine comprises entre 0,09 et 6196,61 mg/kg dans les produits laitiers (y compris les préparations pour nourrissons). Des pays tiers ont rapporté des teneurs dans les produits de fabrication chinoise variant entre 0,38 et 945,86 mg/kg pour les produits laitiers et entre 0,6 et 6694 mg/kg pour les aliments transformés et les ingrédients alimentaires (WHO, 2008).

Dans les ingrédients alimentaires destinés à l'industrie de transformation (par ex. jaune d'oeuf, blanc d'oeuf en poudre, ...), des teneurs oscillant entre 0,1 et 5,03 mg/kg ont été observées. Pour les oeufs frais produits en Chine, des concentrations en mélamine comprises entre 2,9 et 4,7 mg/kg ont été notifiées. De la mélamine a également été détectée dans du bicarbonate d'ammonium, pour certains échantillons à une concentration dépassant les 2000 mg/kg (Taiwan) (AFSSA, 2008a).

En ce qui concerne l'Europe, le tableau ci-dessous donne un aperçu des teneurs en mélamine dans les produits alimentaires contaminés rapportées via le système RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) (octobre 2008 – janvier 2009).

Presque aucun produit alimentaire contaminé à la mélamine n'a été découvert sur le marché belge.⁷ De plus, l'importation de produits laitiers chinois⁸ ainsi que d'oeufs frais destinés à la consommation humaine depuis la Chine est interdite.⁹ Cependant, l'exposition à la mélamine

⁷ voir site internet de l'AFSCA : <http://www.favv-afsc.fgov.be/denreesalimentaires/melamine/>

⁸ AR du 19 décembre 2008

⁹ Décision de la Commission du 6 octobre 2005 concernant certaines mesures de protection contre l'influenza aviaire dans plusieurs pays tiers (2005/692/CE)

par les oeufs frais pourrait être possible de manière indirecte via l'utilisation d'oeufs/ovoproduits comme ingrédients alimentaires dans des produits transformés.

Tableau 2. Teneurs en mélamine dans les produits alimentaires contaminés (originaires de Chine) rapportées via RASFF.

Aliment	[Mélamine] mg/kg
<i>Lait et produits laitiers</i>	
lait et yaourt	7 - 22
boissons lactées	14,4- 25,6
produits laitiers	162
<i>Additifs alimentaires</i>	
bicarbonate d'ammonium	81 - 460,6
<i>Compléments alimentaires</i>	
isoflavones de soja pour compléments alimentaires	8,3
<i>Snacks & friandises</i>	
bonbons crémeux (aromatisés)	3,3 - 209
produits chocolatés	15 – 46,2
snack au soja	3,79 - 5,4
frites	5 - 30
chips	3
biscuits aromatisés	<0,1 - 11
snack au chocolat	7,8
<i>Produits céréaliers et de boulangerie</i>	
sticks salés	3,5
biscuits au lait	9,9
gâteau au chocolat	4,02 - 7,4
biscuits (aux noix, au chocolat & aromatisés)	3,1 - 57
cracker (au citron, aux cacahuètes, BQQ)	11,1 – 19,9
<i>Aliments pour animaux</i>	
biscuits de poisson aromatisés au fromage	6,3
nourriture pour poissons d'aquarium	81,4
soja biologique	1,6 - 220
concentré de protéines de riz	21000
farine de soja	116,2 - 797

3.3.3. Estimations de l'exposition mentionnées dans la littérature

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS/WHO)

La quantité de mélamine à laquelle les nourrissons ont été exposés en Chine via la consommation de préparations contaminées à la mélamine est estimée, sur base des concentrations médianes en mélamine qui ont été mesurées dans les produits les plus contaminés, à 8,6-23,4 mg/kg poids corporel par jour. L'exposition des adultes via des denrées alimentaires (à l'exception des préparations pour nourrissons) susceptibles de contenir du lait en poudre contaminé, est estimée à 0,16-0,7 mg/kg poids corporel par jour sur base de données européennes de consommation alimentaire. Il est supposé ici que la mélamine est présente dans tous les groupes d'aliments, au niveau le plus élevé qui a été rapporté pour un aliment de ce groupe (WHO, 2008).

L'Autorité européenne de Sécurité des Aliments (EFSA)

L'Autorité européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a publié une évaluation quantitative du risque en septembre 2008. Cette évaluation était basée sur la consommation de biscuits et de friandises (caramels au lait, chocolat), et divers scénarios de contamination, dont un 'worstcase' scénario basé sur le plus haut niveau de contamination de mélamine

communiqué à ce moment en Chine, à savoir 2563 mg/kg. Sur base de cette évaluation, il est ressorti qu'il n'y avait pas de risque pour un consommateur moyen, tant pour les adultes que pour les enfants. Il existerait toutefois un risque de dépassement de la DJT de l'EFSA de 0,5 mg/kg pc par jour chez les enfants qui consomment chaque jour une grande quantité des produits concernés. Lorsque de grandes quantités de biscuits et de chocolat sont consommées, la DJT est dépassée d'un facteur 3 dans le cas des niveaux de contamination les plus élevés (EFSA, 2008).

L'Agence américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA)

La 'Food and Drug Administration' américaine (FDA) a évalué l'exposition à la mélamine via la consommation de produits issus d'animaux qui avaient reçu de la nourriture contaminée. L'accumulation de mélamine dans les tissus étant peu probable, il a été supposé que les produits contenaient 100 µg/kg de mélamine et analogues (les 50 µg/kg mélamine -i.e. LOD de la méthode d'analyse utilisée- ont été doublés afin de prendre en compte l'acide cyanurique, qui n'avait pas été analysé avec cette méthode). L'exposition calculée s'est avérée inférieure, de plus de deux ordres de grandeur, à la DJT de 0,63 mg/kg pc par jour établie par la FDA (FDA, 2007).

(Cette évaluation du risque n'a pas considéré la possibilité que le gluten contaminé à la mélamine pourrait se retrouver dans la chaîne alimentaire, p.ex. via des aliments végétariens riches en gluten).

L'Agence canadienne de la Santé (Santé Canada/Health Canada)

Santé Canada a établi une norme temporaire (teneur maximale) spécifique aux préparations pour nourrissons et denrées alimentaires qui constituent l'unique source de nourriture, sous forme d'une mesure de gestion du risque intermédiaire sur base de plusieurs scénarios d'exposition théoriques (Health Canada, 2008a). Ceux-ci sont repris dans le Tableau 3.

Tableau 3. Estimation de l'ingestion de mélamine sur base de données de consommation maximale pour les préparations pour nourrissons et de différentes concentrations théoriques en mélamine (1,0; 2,5; 20 mg/kg) (Health Canada, 2008a).

Classe d'âge	pc ¹ (kg)	Consommation max. de préparations pour nourrissons ² (g/jour)	Ingestion de mélamine (mg/kg pc/jour) à différentes concentrations de mélamine (mg/kg)		
			1,0	2,5	20,0
prématurés	1,5	100	0,066	0,167	1,330
0-1 mois	3,9	1080	0,277	0,693	5,540
2-3 mois	5,5	1470	0,267	0,668	5,340
4-7 mois	7,2	1440	0,200	0,500	4,000
8-12 mois	9,0	960	0,107	0,267	2,140
12-18 mois	10,6	900	0,085	0,213	1,700

¹ Le poids moyen des bébés et enfants en bas âge est basé sur les statistiques de croissance du "Pediatricians Guide to your Children's Health and Safety" (<http://www.keepkidshealthy.com/growthcharts/girlsbirth.html>)

² La consommation de préparations pour nourrissons suivant les classes d'âge spécifiques est tirée de "A Practical Guide to Baby Care" de l'Institut National de Santé Publique du Québec (2001)

Il ressort du Tableau 3 qu'une concentration en mélamine inférieure ou égale à 1 mg/kg dans des préparations pour nourrissons prêtes à la consommation ne résulte pour aucune catégorie d'âge en un dépassement de la DTR de 0,35 mg/kg pc par jour établie par Santé Canada. Santé Canada propose donc une norme temporaire de 1,0 mg/kg pour tous les produits destinés à l'alimentation des nourrissons et autres produits apparentés qui constituent la seule source alimentaire, et ce dans la forme sous laquelle ces produits sont vendus. Cette norme temporaire vaut pour la concentration combinée de mélamine et d'acide cyanurique. La norme concerne également les formules concentrées et en poudre pour nourrissons telles qu'elles sont vendues dans le commerce, ce qui fournit un degré de protection supplémentaire lors de la consommation de ces produits puisque ceux-ci se retrouvent dilués. Les résultats préliminaires montrent que les concentrations éventuelles en mélamine dans les préparations pour nourrissons se situent sous la norme intermédiaire de 1

mg/kg (Health Canada, 2008a). Toutefois, suite à la recommandation faite en décembre 2008 par la WHO d'une DJT de 0,2 mg/kg pc par jour (WHO, 2008), Santé Canada a réduit cette norme temporaire de 1 à 0,5 mg/kg (Health Canada, 2008b).

Santé Canada a réalisé une évaluation 'worstcase' similaire de l'exposition pour l'ensemble de la population (différentes catégories d'âge au dessus d'1 an) via la consommation de denrées alimentaires contenant du lait ou des ingrédients laitiers. Il en ressort qu'une limite d'action de 2,5 mg/kg était suffisante pour maintenir l'exposition en dessous de la DTR de 0,35 mg/kg pc par jour établie par Santé Canada, avec une consommation élevée (P90) et y compris pour les enfants d'un an dont la consommation par kg de poids corporel est la plus élevée (Health Canada, 2008a).

L'Agence alimentaire française (AFSSA)

L'AFSSA a également réalisé une évaluation du risque 'worstcase' où deux groupes-cibles ont été pris en considération, à savoir les enfants en bas âge (i.e. âgés de 15 jours à 36 mois) et la population générale (i.e. âgée de plus de 3 ans, avec distinction entre les classes d'âge 3-10 ans, 11-14 ans, 15-17 ans et 18 ans et plus) (AFSSA, 2008a). Plusieurs catégories de denrées alimentaires ont été considérées, dont les produits étaient supposés contaminés par une certaine teneur en mélamine (teneur en mélamine moyenne et maximale détectée en France, les résultats situés sous la LOQ étant considérés comme égaux à la LOQ). Les résultats relatifs aux enfants en bas âge sont repris dans le Tableau 4. La DJT établie par l'EFSA de 0,5 mg/kg pc par jour (EFSA, 2008) n'a été dépassée chez aucun groupe-cible, pas même dans le cas du scénario le plus pessimiste.

Tableau 4. Ingestion potentielle de mélamine via l'alimentation par des enfants âgés de moins de 3 ans (AFSSA, 2008a).

Matrice	Scénario 1 ^a			Scénario 2 ^b		
	moyenne	%DJT ^c	P97,5	moyenne	%DJT	P97,5
Biscuits, gâteaux, pâtisseries	0,001 ± 0,003	0,3	0,011	0,002 ± 0,005	0,4	0,016
Boissons lactées	0,007 ± 0,026	1,4	0,078	0,007 ± 0,026	1,4	0,078
Céréales	0,000 ± 0,000	0,0	0,000	0,000 ± 0,000	0,0	0,000
Lait	0,018 ± 0,038	3,6	0,121	0,027 ± 0,056	5,4	0,178
Chips	0,000 ± 0,001	0,0	0,000	0,000 ± 0,003	0,0	0,000
Sodas, nectars, eaux aromatisées	0,001 ± 0,005	0,2	0,008	0,001 ± 0,006	0,2	0,011
Friandises	0,001 ± 0,005	0,2	0,016	0,014 ± 0,066	2,8	0,193
Oeufs	0,001 ± 0,002	0,1	0,006	0,001 ± 0,002	0,2	0,008
TOTAL	0,030 ± 0,046	6,0	0,145	0,052 ± 0,092	10,4	0,325

Toutes les teneurs en mélamine < LOQ sont considérées comme égales à la LOQ ;

^a la teneur en mélamine utilisée dans le calcul est la teneur moyenne en mélamine qui a été détectée pour le type de matrice ;

^b la teneur en mélamine utilisée dans le calcul est la teneur maximale en mélamine qui a été détectée pour le type de matrice.

^c en ce qui concerne l'ingestion moyenne, DJT= 0,5 mg/kg pc par jour (EFSA, 2008)

3.4. Caractérisation du risque

Sur base des informations disponibles, le risque pour les enfants en bas âge (et les adultes) semble être négligeable, en particulier lorsqu'on applique la limite d'action proposée de 0,5 mg/kg. Toutefois, afin de pouvoir caractériser entièrement le risque, il est pertinent de connaître l'origine de la mélamine (mélamine technique, extincteurs, recyclage de vieux matériaux, résidu de l'industrie de la mélamine... ?) avec laquelle les produits ont été contaminés, de manière à avoir une idée des impuretés (qui s'accompagnent d'une certaine toxicité) susceptibles de se trouver dans les produits contaminés. En outre, on ne dispose pas encore de suffisamment de connaissances sur l'effet toxicologique synergique de la mélamine avec l'acide cyanurique (et autres analogues).

La dose de mélamine à laquelle les nourrissons et jeunes enfants chinois ont été exposés par la consommation de lait contaminé est estimée par l'OMS à environ 40-120 fois la DJT de 0,2 mg/kg pc, ce qui explique les conséquences dramatiques de l'incident. L'estimation

conservative de l'OMS pour l'exposition potentielle des adultes via des denrées alimentaires contaminées à la mélamine correspond à 0,8-3,5 fois la DJT (WHO, 2008). L'exposition estimée à la suite de la présence de traces de mélamine en provenance de toutes sortes de sources secondaires (7-15 µg/kg pc par jour) est largement inférieure à la DJT.

4. Conclusion

Santé Canada a établi, à l'aide d'une évaluation du risque, une limite d'action de 0,5 mg/kg. Cette limite d'action semble réalisable, sur base des données limitées relatives aux concentrations de mélamine dans les préparations (de suite) pour nourrissons, ainsi que sur base des méthodes d'analyse disponibles. Bien qu'une limite d'action puisse être proposée, le Comité scientifique souhaite insister sur le fait que les concentrations en contaminants potentiels dans les préparations (de suite) pour nourrissons doivent toujours être les plus basses possibles, dans la mesure de ce qui est raisonnablement faisable, d'autant plus qu'il s'agit d'une groupe-cible vulnérable. Il est recommandé au consommateur de s'en tenir aux marques agréées de préparations (de suite) pour nourrissons, dont la composition doit répondre aux normes légales (AR du 18 février 1991).

Le Comité scientifique souhaite également souligner que le problème risque de persister un certain temps, vu que cela concerne des produits susceptibles d'être stockés (lait en poudre e.a.). Une comparaison peut être faite avec le "lait de Tchernobyl". Il faut dès lors recommander à l'industrie de considérer la mélamine et la fraude possible à l'azote non protéique comme danger potentiel dans leur autocontrôle, en particulier lors du contrôle de matières premières en provenance de pays tiers. Étant donné que la mélamine a été ajoutée dans le but de compromettre la détermination de la qualité des produits à l'aide d'un test d'azote, il est important que des méthodes plus spécifiques, rapides et bon marché soient développées et appliquées pour l'analyse des protéines, permettant de distinguer celles-ci de l'azote non protéique.

De plus, les lacunes suivantes peuvent être mises en avant :

- Il subsiste encore une grande incertitude concernant la toxicité de l'exposition combinée à la mélamine, l'acide cyanurique et les autres analogues structurels (différences entre espèces, mécanisme de formation et caractérisation plus détaillée des calculs rénaux, sensibilité particulière des enfants, ...)
- Les données relatives à l'exposition à la mélamine via d'autres sources que l'adjonction frauduleuse (matériaux de contact, pesticides, ...) sont limitées
- Outre la teneur en mélamine, il faut également rapporter les teneurs en acide cyanurique, en ammeline et en ammelide des denrées alimentaires, des aliments pour animaux et des ingrédients alimentaires
- Le ratio de transfert de la mélamine et de ses analogues depuis les aliments pour animaux jusqu'aux denrées alimentaires d'origine animale (y compris le poisson) n'est jusqu'à présent pas encore connu.

Pour le Comité scientifique,
Le Président,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert

Bruxelles, le 13 mars 2009

Références

AFSSA (2008a) The opinion of the French Food Safety Agency concerning the risk assessment of melamine exposure from the consumption of contaminated foodstuffs from China. <http://www.afssa.fr/Documents/AAAT2008sa0301EN.pdf>

AFSSA (2008b) Opinion of the French Food Safety Agency (Afssa) on the possible transfer of melamine to foodstuffs from broiler chickens and laying hens. 4 November 2008. <http://www.afssa.fr/Documents/ALAN2008sa0333EN.pdf>

Baynes R., Smith G., Mason S., Barrett E., Barlow B. & Riviere J. (2008) Pharmacokinetics of melamine in pigs following intravenous administration. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1196-1200.

Bradley E., Boughtflower V., Smith T., Speck D. & Castle L. (2005) Survey of the migration of melamine and formaldehyde from melamine food contact articles available on the UK market. *Food Addit. Contam.* 22, 597-606.

Dobson R., Motlagh S., Quijano M., Cambron R., Baker T., Pullen A., Regg B., Bigalow-Kern A., Vennard T., Fix A., Reimschuessel R., Overmann G., Shan Y. & Daston G. (2008) Identification and characterisation of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. *Toxicol. Sci.* 106, 251-262.

ECB (2000) IUCLID (International Uniform Chemical Database) Dataset: Melamine. European Commission- Institute for Health and Consumer Protection (IHCP) - European Chemicals Bureau (ECB, now: Consumer Products Safety & Quality (CPS&Q) Unit). <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/IUCLID-DataSheets/108781.pdf>

EFSA (2008) Statement of EFSA on risks for public health due to the presences of melamine in infant milk and other milk products in China (Question number: EFSA-Q-2008-695) http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902098495.htm

EFSA (2007) EFSA provisional statement on a request from the European Commission related to melamine and structurally related to compounds such as cyanuric acid in protein-rich ingredients used for food and feed (Question number: EFSA-Q-2007-093). http://www.efsa.eu.int/cs/BlobServer/Statement/efsa_statement_melamine_en_rev1.pdf?ssbinary=true

EMA (2001) Committee for veterinary medicinal products: Cyromazine – summary report (2) <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/077000en.pdf>

EPA (1999) Cyromazine; Pesticide Tolerance. Volume 64 (178). <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1999/September/Day-15/p24047.htm>

FDA (2008a) Interim safety and risk assessment of melamine and its analogues in food for humans, October 3, 2008. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/melamra3.html>

FDA (2007) Interim Melamine and Analogues Safety/Risk Assessment [<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/melamra.html>]

Gold L., Slone T. & Bernstein L. (1989) Summary of carcinogenic potency and positivity for 492 rodent carcinogens in the carcinogenic potency database. *Environ. Health Perspect.* 79, 259-272.

Health Canada (2008a) Health Canada's human health risk assessment supporting standard development for melamine in foods. November, 2008. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/pubs/melamine_hra-ers-eng.pdf

Health Canada (2008b) Health Canada has re-assessed its maximum tolerable limit for melamine in infant formula. December 4, 2008. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/pubs/melamine_errata-eng.pdf

IARC (1999) IARC Monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans. Vol. 73: Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol73/volume73.pdf>

Kirk-Othmer (2004) Encyclopedia of Chemical Technology, 5th edition, Vol.8, Cyanamides. John Wiley & Sons, pp. 157-171.

Lahalih S. & Absi-Halabi M. (1989) Recovery of solids from melamine waste effluents and their conversion to useful products. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 28, 500–504.

Langman C. (2009) Melamine, powdered milk, and nephrolithiasis in Chinese infants. *The New England Journal of Medicine* (article 10.1056/NEJMe0900361 published at NEJM.org on February 4, 2009)

Lund K.H. & Petersen J.H. (2006) Migration of formaldehyde and melamine monomers from kitchen- and tableware made of melamine plastic. *Food Addit. Contam.* 23, 948-955.

Na G., Qingfeng F., Jie D., Yiming Z., Jingqiao L., Yi A., Guobin X., Sainan ZS., Chen Y., Lina J., Jing M., Han Z., Dan Z., Xiaoyu L. & Y. (2009) Melamine-contaminated Powdered formula and urolithiasis in young children. *The New England Journal of Medicine* (article 10.1056/NEJoa0809550 published at NEJM.org on February 4, 2009)

NTP (1983) Carcinogenesis Bioassay of Melamine (CAS No 108-78-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed Study), National Toxicology Program, Technical Report Series No 245, March.

OECD (1998) Screening Information Data Set for Melamine, CAS No. #108-78-1. <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/108781.pdf>

Puschner B., Poppenga R., Lowenstine L., Filigenzi M. & Pesavento P. (2007) Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 616-624.

Reimschuessel R., Giesecker C., Miller R., Ward J., Boehmer J., Rummel N., Heller D., Nochetto C., de Alwis G., Bataller N., Andersen W., Turnipseed S., Karbiwnyk C., Satzger R., Crowe J., Wilber N., Reinhard M., Roberts J. & Witkowski M. (2008) Evaluation of the renal effects of experimental feeding of melamine and cyanuric acid to fish and pigs. *Am. J. Vet. Res.* 69(9), 1217-1228.

WHO (2008) Expert meeting to review toxicological aspects of melamine and cyanuric acid. Ottawa Canada, 1-4 December 2008. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/infosan_events/en/index.html

Wittcoff H., Reuben B. & Plotkin J. (2004) Industrial organic chemicals. 2nd edition. Chapter 10. Chemicals from methane. 10.5.1.1 Urea and melamine resins. Wiley, pp. 360-362.

Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivants :

D. Berkvens, C. Bragard, E. Daeseleire, P. Delahaut, K. Dewettinck, J. Dewulf, L. De Zutter, K. Dierick, L. Herman, A. Huyghebaert, H. Imberechts, P. Lheureux, G. Maghuin-Rogister, L. Pussemier, C. Saegerman, B. Schiffers, E. Thiry, T. van den Berg, M. Uyttendaele, C. Van Peteghem, G. Vansant

Remerciements

Le Comité scientifique remercie le secrétariat scientifique et les membres du groupe de travail pour la préparation du projet d'avis. Le groupe de travail était composé des personnes suivantes :

Membres du Comité scientifique	A. Huyghebaert (rapporteur), G. Maghuin-Rogister, C. Van Peteghem
Experts externes	J.-P. Buts (UCL), P. Daenens (K.U.Leuven), C. Vleminckx (ISP)

Cadre légal de l'avis

Loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire ;

Règlement d'ordre intérieur, visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, approuvé par le Ministre le 27 mars 2006.

Disclaimer

Le Comité scientifique se réserve à tout moment le droit de modifier cet avis si de nouvelles informations et données arrivent à sa disposition après la publication de la présente version.

Annexe : Summarized overview of the available toxicological data of melamine

Melamine is an important chemical commodity used for the production of melamine–formaldehyde resins. The toxicity of melamine has been extensively investigated and reported in the literature. Reviews had been released by ECETOC (1983) and IARC (1986 & 1999). In rats and humans, melamine is a metabolite of the anti-neoplastic agent hexamethylmelamine (Worzalla et al., 1974). The carcinogenic potency of melamine had been investigated in the National Toxicology Program (1983). The results are discussed below.

1.1 Absorption, distribution, excretion and metabolism

After administration of melamine as a single oral dose at 250 mg/kg bw in rats or dogs, 50% and 61.3%, respectively, of unmodified melamine was excreted in the urine in 6 h (Lipschitz & Stokey, 1945). Nearly 20% of the melamine excreted by the rats was recovered as the crystalline dimelamine-monophosphate.

In adult male Fischer 344/N rats given [¹⁴C]melamine as a single oral dose at 0.38 mg, melamine was rapidly excreted (90% of the administered dose within 24 h in the urine). Negligible radioactivity was detected in exhaled air and faeces. Melamine was distributed in the body water. Kidney and bladder showed higher concentrations of radioactivity than did plasma. Virtually no residual radioactivity was observed in the tissues at 24 h after dosing or later. The plasma half-life was 2.7 h, which is in good agreement with the urinary excretion half-life of 3.0 h. Radioactivity in plasma and urine co-chromatographed with unchanged melamine, indicating that melamine is not metabolized in the rat (Mast et al., 1983).

1.2 Toxicological studies

(a) Acute toxicity

Melamine has very low acute toxicity. The oral LD₅₀ values for melamine given in corn oil by gavage were reported to be 3161 and 3828 mg/kg bw in male and female Fischer 344/N rats, and 3296 and 7014 mg/kg bw for male and female B6C3F₁ mice (National Toxicology Program, 1983). White crystals were found in the stomach of three out of five male and four out of five female rats at 10 000 mg/kg bw, four out of five males and five out of five females at 6810 mg/kg bw, one out of five males and two out of five females at 3160 mg/kg bw and one out of five males at 2150 mg/kg bw. In mice, no compound-related toxic effects were observed at necropsy. In another study in mice, the oral LD₅₀ was 4500 mg/kg bw. Reported signs of toxicity were lachrimation, dyspnoea, intermittent tremors and coma preceding death. Vasodilatation in the tail and ears and paralysis of the forequarters were also observed (ECETOC, 1983). Melamine applied as a paste to the skin of rabbits at 1000 mg/kg bw did not induce toxicity or local irritation (ECETOC, 1983). Introduction of melamine powder into the rabbit eye caused mild transient irritation (ECETOC, 1983). There was no sensitization in guinea-pigs (ECETOC, 1983).

(b) Short-term studies of toxicity

Mice

Groups of five male and five female B6C3F₁ mice were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 5000, 10 000, 15 000, 20 000, or 30 000 ppm for 14 days. All animals survived to the end of the study. Treatment seemed to have no effect on body weight. A hard crystalline solid was found in the urinary bladder of all male mice and in two out of five female mice at 30 000 ppm. No other compound-related effects were observed at necropsy (National Toxicology Program, 1983).

Groups of 10 male and 10 female B6C3F₁ mice were fed diets containing melamine at a concentration of 0, 6000, 9000, 12 000, 15 000, or 18 000 ppm (equivalent to 0, 900, 1350, 1800, 2250 and 2700 mg/kg bw per day) for 13 weeks. One female at 9000 ppm died. Body-weight gain was depressed in all treated groups. The incidence of mice with bladder calculi was dose-related and was greater in males than in females. Bladder calculi were found

at dietary concentrations of 12 000 ppm and greater (6 out of 10, 9 out of 10 and 7 out of 10 in males, and 1 out of 10, 3 out of 10 and 7 out of 10 in females, at 12 000, 15 000 and 18 000 ppm, respectively). Ulceration of the urinary bladder epithelium was also dose-related and was observed at dietary concentrations of 9000 ppm and greater. Bladder ulcers were multifocal or associated with inflammation (cystitis). The results were considered not to provide evidence for an association between ulceration and bladder calculi in either sex. Since the body weight effects at 6000 ppm (equivalent to 900 mg/kg bw per day) were of questionable biological significance, this dose could be considered as a NOAEL (National Toxicology Program, 1983).

Rats

In rats treated with melamine, no histological effects were seen, except for crystalline deposits in the renal tubules found after five successive intraperitoneal doses at 500 mg/kg bw per day. No symptoms were observed except for moderate transient weight loss (ECETOC, 1983).

Groups of five male and five female Fischer 344/N rats were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 5000, 10 000, 15 000, 20 000, or 30 000 ppm for 14 days. Body-weight gain was reduced at dietary concentrations of 15 000 ppm and greater. A hard crystalline solid was found in the urinary bladder of most males at $\geq 10\ 000$ ppm and in four out of five females at $\geq 20\ 000$ ppm. The kidneys of two out of five males at 30 000 ppm were pale and pitted. The details given of the study were limited, but the highest NOAEL appeared to be 5000 ppm (National Toxicology Program, 1983).

Three 13-week studies were performed in rats.

In the first study, groups of 12 male and 12 female F344/N rats were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 0, 6000, 9000, 12 000, 15 000, or 18 000 ppm, equivalent to 0, 600, 900, 1200, 1500 and 1800 mg/kg bw per day. One male at 18 000 ppm and two males at 6000 ppm died. Body-weight gain at a dietary concentration of 12 000 ppm and greater was depressed and food consumption was reduced at 18 000 ppm. Calculi were found to occur in the urinary bladder of most male rats in a dose-related manner and in the bladder of some females at $\geq 15\ 000$ ppm. Histopathological evaluation was performed on 10 animals of each sex from the control group and groups at, 6000 and 18 000 ppm. Diffuse epithelial hyperplasia of the urinary bladder was found in 8 out of 10 males and 2 out of 10 females at 18 000 ppm, while in rats at 6000 ppm, focal epithelial hyperplasia was only found in 1 out of 10 males and in none of the females. No other compound-related histopathological effects were observed (National Toxicology Program, 1983).

In the second 13-week study, groups of male and female F344/N rats were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 0, 750, 1500, 3000, 6000, or 12 000 ppm, equivalent to 0, 75, 150, 300, 600 and 1200 mg/kg bw per day. Body-weight gain was depressed in males only at 6000 and 12 000 ppm. Urinary bladder calculi were not observed in treated or control females, but the incidence among male rats increased in a dose-related manner (1 out of 10, 2 out of 10, 5 out of 10, 7 out of 10, 9 out of 10 and 9 out of 9 in the controls and at 750, 1500, 3000, 6000 and 12 000 ppm, respectively). Hyperplasia of the transitional epithelium of the bladder was observed to occur in a dose-dependent manner for male rats at ≥ 3000 ppm (1 out of 10, 3 out of 10 and 9 out of 9 in the groups at 3000, 6000 and 12 000 ppm, respectively). There was no evidence of hyperplasia of the bladder epithelium in female rats. Dose-related calcareous deposits were observed in the straight segments of the proximal tubules in females. Microscopic evaluation of the urine did not provide evidence of melamine crystalluria. The NOAEL for hyperplasia was 1500 ppm, equivalent to 150 mg/kg bw per day and the NOAEL for urinary bladder calculi was 750 ppm, equivalent to 75 mg/kg bw per day (National Toxicology Program, 1983).

In the third 13-week study, F344/N rats were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 0, 10 000 or 18 000 ppm in the presence and absence of 1% ammonium chloride in the drinking-water to see if this treatment might affect the incidence of calculus formation in the urinary tract. Ammonium chloride had no effect on calculus formation (National Toxicology Program, 1983).

Rabbits and dogs

In rabbits and dogs fed with melamine at a dose of 126 mg /kg bw per day for 1 to 4 weeks, no effects were found, either macro- or microscopically (ECETOC, 1983).

(c) *Long-term studies of toxicity and carcinogenicity*

Mice

Groups of 50 male and 50 female B6C3F₁ mice were fed diets containing melamine (purity, 97%) at a concentration of 0, 2250 or 4500 ppm (equivalent to 0, 338 or 675 mg/kg bw per day) for 103 weeks, followed by a basal diet for 2 weeks before sacrifice. All animals were observed twice daily for morbidity or mortality. Clinical signs were recorded monthly. Body weight and feed consumption by cage (five animals per cage) were recorded once per week for the first 13 weeks, monthly until week 91 and then every 2 weeks. Necropsies were performed on all animals found dead and those killed at the end of the study. Animals were examined for gross and histopathological abnormalities.

Mean body weights of male mice at the highest dose were slightly lower than those of controls after week 50 of the study (decrease in body-weight gain, 21%). Survival at termination of the study was: 39 out of 49 (80%), 36 out of 50 (72%) and 28 out of 50 (56%) in males in the control group and at the lower and higher dose, respectively and 37 out of 50 (74%), 43 out of 50 (86%) and 41 out of 50 (82%) in females in the control group and at the lower and higher dose, respectively. The reduction in the survival of males at the highest dose was statistically significant ($p = 0.013$). No treatment-related increase in the incidence of tumours was observed. In male mice, treatment-related increases were observed in the incidence of urinary bladder calculi (2 out of 45, 40 out of 47 and 41 out of 44 in the control group and at the lower and higher dose, respectively), in the incidence of acute and chronic inflammation of the urinary bladder (0 out of 45, 25 out of 47 and 24 out of 44 in mice in the control group and at the lower and higher dose, respectively) and in the incidence of epithelial hyperplasia of the bladder (1 out of 45, 11 out of 47 and 13 out of 44 in mice in the control group and at the lower and higher dose, respectively). Urinary bladder calculi, acute and chronic inflammation of the urinary bladder and epithelial hyperplasia were seen in 4 out of 50 females at the highest dose. No NOAEL could be established for males, the LOAEL was 2250 ppm, equivalent to 338 mg/kg bw per day and the NOAEL for females was 2250 ppm, equivalent to 338 mg/kg bw per day (National Toxicology Program, 1983).

Rats

Groups of 50 male and 50 female Fischer 344/N rats were fed diets containing melamine at a concentration of 0, 2250 or 4500 ppm (males) or 0, 4500 or 9000 ppm (females) for 103 weeks, followed by a basal diet for 2 weeks before sacrifice. Doses were equivalent to 0, 113 or 225 in males and 0, 225 or 450 mg/kg bw per day in females. All animals were observed twice daily for morbidity or mortality. Clinical signs were recorded monthly. Body weight and feed consumption by cage (five animals per cage) were recorded once per week for the first 13 weeks, monthly until week 91 and then every 2 weeks. Necropsies were performed on all animals found dead and those killed at the end of the study. Animals were examined for gross and histopathological abnormalities.

Survival was significantly reduced in males at the highest dose ($p = 0.03$) from week 101. Survival rates at termination of the study were: 30 out of 49 (61%), 30 out of 50 (60%) and 19 out of 50 (38%) in males in the control group and at the lowest and highest dose, respectively and 34 out of 50 (68%), 30 out of 50 (60%) and 27 out of 50 (54%) in females in the control group and at the lower and higher dose, respectively. The incidence of transitional-cell carcinomas of the urinary bladder in males was 0 out of 45, 0 out of 50 and 8 out of 49 (trend $p \leq 0.002$) in the control group and the lower and higher dose, respectively. The incidence in the group at the highest dose was significantly higher ($p \leq 0.016$) than in the controls. There was also a dose-related incidence of bladder calculi in males (0 out of 45, 1 out of 50, and 10 out of 49 in the control group and at the lower and higher dose, respectively). In a separate study, X-ray microscopic analysis of two urinary bladder calculi obtained from male F344/N rats fed diets containing melamine at 16 000 or 19 000 ppm indicated that the principal component of the calculi was melamine. Of 49 males at the highest dose, seven had transitional-cell carcinomas and bladder calculi, one had a carcinoma without calculi and three had calculi without carcinoma (one of these rats had a papilloma and one had epithelial hyperplasia). There was therefore a statistically significant ($p < 0.001$) correlation between the presence of bladder calculi and bladder tumours. Females had no bladder calculi and one female in each of the groups at the lowest and highest dose

had a papilloma of the bladder. A statistically significant increase ($p \leq 0.01$) in the incidence of chronic inflammation of the kidney was observed in females (4 out of 49, 17 out of 49 and 41 out of 47 in the control group and at the lower and higher dose, respectively). The dose–response relationship and intensity of the increased interstitial lymphoplasmocytic infiltrates and cortical fibrosis clearly set these changes apart from the minor inflammatory component that may accompany the progressive nephropathy normally encountered in ageing F344/N rats. Chronic inflammation of the kidney was not significant in male rats receiving melamine. The NOAEL for males was 2250 ppm, equivalent to 113 mg/kg bw per day and for females no NOAEL could be established, the LOAEL was 4500 ppm, equivalent to 225 mg/kg bw per day (National Toxicology Program, 1983).

Groups of 20 male F344 rats were fed diets containing melamine (purity, > 99%) at a concentration of 0.3%, 1% or 3% (equivalent to 150, 500 and 1500 mg/kg bw per day) for a total of 36 weeks followed by a 4-week recovery period. Ten animals per group underwent exploratory laparotomy at the end of week 36 and all animals were killed at week 40. Bladder weight in rats receiving 3% melamine in the diet was threefold that in controls. The incidences of papillary or nodular hyperplasia were 0%, 5%, 30% and 63% in the control group and at the lowest, intermediate and highest dose, respectively; incidences of papillomatosis were 0%, 0%, 25% and 89% and those of calculi were 0%, 0%, 70% and 100% at 36 weeks and 0%, 20%, 45% and 42% at 40 weeks. Carcinomas of the urinary bladder were observed in 0 out of 20, 1 out of 20 and 15 out of 19 rats at the lowest, intermediate and highest doses and papillomas in 0 out of 20, 1 out of 20 and 12 out of 19 rats, respectively. One carcinoma and three papillomas of the ureter were also induced in 19 rats at the highest dose. The correlation between calculus formation at week 36 and tumour incidence at week 40 was highly significant ($p = 0.0065$) (Okumura et al., 1992; IARC, 1999).

Groups of 20 male F344/DuCrj rats were fed diets containing melamine (purity, 99.94%) at a concentration of 1% or 3% with or without 5% or 10% aqueous sodium chloride solution (NaCl) for a total of 36 weeks and were killed at week 40. Water intake, as a surrogate for urinary output, was increased in groups exposed to 3% melamine, with or without 5% or 10% NaCl, in groups exposed to 1% melamine with 5% or 10% NaCl and in a group exposed to 10% NaCl only; water intake was not increased in animals exposed to 1% melamine only. The incidences of calculi and papillomatosis were 30% and 75% with 3% melamine, 75% and 85% with 3% melamine plus 5% NaCl, 30% and 10% with 3% melamine plus 10% NaCl, 37% and 47% with 1% melamine, 11% and 11% with 1% melamine plus 5% NaCl, 5% and 0% with 1% melamine plus 10% NaCl. No calculi or papillomatosis were reported in controls or with 10% NaCl alone.

Urinary bladder carcinomas were observed in 4 out of 19, 18 out of 20 and 18 out of 20 rats given 1% melamine alone, 3% melamine alone or 3% melamine plus 5% NaCl, respectively. No carcinomas were observed in the groups receiving 3% melamine plus 10% NaCl or 1% melamine plus 5% or 10% NaCl. The incidences of papillomas were similarly decreased by NaCl. In contrast to the incidence of 10 out of 20 in the group given 3% melamine alone, 5 out of 20 and 3 out of 20 rats receiving 3% melamine plus 5% NaCl or 10% NaCl respectively, developed papillomas. Papillomas developed in 8 out of 19 rats receiving 1% melamine alone.

Therefore, the addition of NaCl to 1% melamine decreased the incidences of calculi and papillomatosis, in parallel with a decrease in the incidence of neoplasia. With 3% melamine, NaCl did not affect the induction of calculi or papillomatosis but decreased the incidence of neoplasia. Thus, with the lower concentration of melamine, NaCl appeared to increase urinary output and decrease the incidences of hyperplasia, calculus formation and neoplasia. Chemical analysis of the calculi showed that they contained approximately equal amounts of melamine and uric acid on a molar basis, which together accounted for 61–81% of the weight (Ogasawara et al., 1995; IARC, 1999).

On the basis of these studies, it has been concluded that bladder tumours are associated with administration of high doses of melamine, and that the tumours are related to precipitation of urinary melamine with the formation of melamine/uric acid containing urinary-tract calculi, producing urothelial toxicity and consequent regeneration of the bladder epithelium and ultimately the formation of tumours (IARC, 1999; Meek et al., 2003). Although the correlation between calculi, ulceration, hyperplasia and formation of bladder tumours has not been 100%, explanations on the basis of studies with other

chemicals such as uracil have been advanced to explain the discrepancies (Clayson et al., 1995, Fukushima et al., 1992). Ulcerations secondary to calculi formation occur relatively rapidly and are repaired, even with continued presence of the calculus. It is thus not unusual to see extensive proliferation of the bladder epithelium in the presence of calculi at later time-points, such as those seen in the experiments with melamine, without an associated ulceration or intense inflammatory response. Chronic inflammation is frequently present, however. Similarly, correlation between the presence of calculi and tumours at later time-points is not 100%. This has been explained by the loss of calculi during the experiment, either by dissolution or, more likely, spontaneous evacuation from the urinary tract (Clayson et al., 1995; IARC, 1999b).

There is significantly less risk in humans for developing bladder cancer from calculi than in rodents, most likely owing primarily to the usually short time that calculi are present in humans due to anatomic and obstructive issues (IARC, 1999b).

(d) *Genotoxicity*

The genotoxic potential of melamine was assessed in several tests in vitro and in vivo (Table 35). With the exception of prophage induction, all the tests gave negative results. It is the Meeting's considered that melamine is not genotoxic.

Table 1. Results of studies of genotoxicity with melamine, a metabolite of cyromazine

End-point	Test object	Concentration	Results	Reference
Prophage induction	<i>E. coli</i> WP2s (λ)	78 μ g/well	Positive ^a	Rossmann et al. (1991)
Reverse mutation	<i>S. typhimurium</i> his G46, TA1530, TA1531, TA1532 and TA1534		Negative ^c	Seiler (1973)
	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA1538, TA98 and TA100	\leq 500 μ g/plate	Negative ^a	Jagannath & Brusick (1977)
	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>		Negative	Lusby et al. (1979)
	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1538, TA98 and TA100		Negative ^a	Mast et al. (1982a)
Gene conversion	<i>S. cerevisiae</i> D4		Negative ^a	Jagannath & Brusick (1977)
	Chinese hamster ovary (CHO), <i>Hprt</i> locus	0.6–1 mg/ml	Negative ^a	Mast et al. (1982a) National Toxicology Program (1983)
Gene mutation	Mouse lymphoma L5178Y, <i>Tk</i> locus	\leq 160 μ g/ml	Negative ^a	McGregor et al. (1988)
Chromosomal aberration	CHO		Negative	National Toxicology Program (1983)
Sister chromatid exchange	CHO	\leq 1 mg/ml	Negative ^a	Mast et al. (1982a)
Unscheduled DNA synthesis	Primary rat hepatocytes	\leq 6 mg/ml	Negative	Mirsalis et al. (1983); National Toxicology Program (1983); ECETOC (1983)
Sex-linked	<i>Drosophila melanogaster</i>	1% feed	Negative	Röhrborn (1962)

recessive lethal mutations				
Micronucleus test (BM cells)	Mice	Single oral dose at 1000 mg/kg bw or 2 × 1000 mg/kg bw (24 h apart)	Negative	Mast et al. (1982b) National Toxicology Program (1983)

S9, 9000 × *g* supernatant from livers of Aroclor-induced rats or hamsters.

^a With and without metabolic activation.

^b S9 from the liver of Aroclor-induced rats or hamsters, liquid pre-incubation assay.

^c Without S9.

(e) *Reproductive toxicity*

No toxic effect or gross malformation was found in fetuses of pregnant rats injected intraperitoneally with melamine at a dose of 70 mg/kg bw on days 5 and 6, 8 and 9 or 12 and 13 of gestation (Thiersch, 1957). This study was considered to be inadequate for an evaluation of prenatal toxicity owing to incomplete reporting of experimental methods and results of fetal examinations (IARC, 1999).

(f) *Special studies*

A study of skin initiation/promotion to investigate the initiation activity of melamine was performed in CD-1 mice. At a single topical dose of 1 µmol (approx. 6 mg/kg bw) melamine (unknown purity) in 0.2 ml acetone followed by twice-weekly applications of 10 nmol of 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) in 0.2 ml acetone for 31 weeks, there was no increase in the incidence of papillomas in comparison to controls (acetone + TPA) (19% compared with 14% in controls) (Perrella & Boutwell, 1983; IARC, 1986).

Summary: Melamine has been investigated for its toxicological properties and results were reported in the published literature. The main toxic effects of dietary melamine exposure in rats and mice were calculi formation (constituted by melamine and uric acid), inflammatory reactions and hyperplasia in the urinary bladder. The NOAEL for urinary bladder hyperplasia was 1500 ppm (equivalent to 150 mg/kg bw per day) and for urinary bladder calculi was 750 ppm (equivalent to 75 mg/kg bw per day) in a 90-day rat study. Induction of carcinomas of the urinary bladder occurred in male rats fed diets containing 4500 ppm (equivalent to 225 mg/kg bw per day) melamine for 103 weeks, but not in female rats or in male or female mice. Papillomas of the bladder were observed in one female in each of the treated groups (4500 and 9000 ppm) as well as a dose-related increase in the incidence of chronic inflammation of the kidney. The NOAEL for males was 2250 ppm, equivalent to 113 mg/kg bw per day and for females no NOAEL could be established, the LOAEL was 4500 ppm, equivalent to 225 mg/kg bw per day. Melamine is not genotoxic neither *in vitro* nor *in vivo*. Although bladder tumours related to calculi formation are not considered to be species-specific, they are related to administration of high doses¹. Bladder tumours were related to precipitation of urinary melamine with the formation of melamine/uric acid containing urinary tract calculi, producing urothelial toxicity and consequent regeneration of the bladder epithelium and ultimately formation of tumours. The non-DNA-reactive mechanism by which melamine produced urinary bladder tumours in male rats occurred only under conditions in which calculi were produced. There is significantly less risk in humans for developing bladder cancer from calculi than in rodents, most likely due to the usually short time calculi are present in humans due to anatomic and obstructive issues¹. These bladder tumours are thus a high dose effect having a threshold well above the expected human exposure through residues.

¹ IARC Concensus report (1999b) In: Species differences in thyroid, kidney and urinary bladder carcinogenesis. Capen C.C., Dybing E., Rice J.M. and Wilbourn J.D., eds., pp 1-14, IARC Scientific Publications No. 147, Lyon, France.

References

- Clayson D.B., Fishbein L., Cohen S.M. (1995) Effects of stones and other physical factors on the induction of rodent bladder cancer. *Fd Chem Toxic* 33, 771-784.
- ECETOC (1983) Joint Assessment of Commodity Chemicals N°1, MELAMINE, CAS: 108-78-1, European Chemical Industry and Ecology & Toxicology Centre, D-1983-3001/12.
- Fukushima S., Tanaka H., Asakawa E., Kagawa M., Yamamoto A. and Shirai T. (1992) Carcinogenicity of uracil, a non-genotoxic chemical, in rats and mice and its rationale. *Cancer Res.* 52, 1675-1680.
- Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K., Speck W. and Zeiger E. (1983) Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ. Mutagenesis*, suppl. 1, 3-142.
- IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans (1986), Some Chemicals used in Plastics and Elastomers, vol. 39, 333-346.
- IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans (1999a) Some Chemicals that cause Tumours of the Kidney or Urinary Bladder in Rodents and some other Substances, vol. 73, 329-338.
- IARC Concensus report (1999b) Capen C.C., Dybing E., Rice J.M. and Wilbourn J.D., eds. In: Species differences in thyroid, kidney and urinary bladder carcinogenesis., IARC Scientific Publications No. 147, Lyon, France, pp 1-14.
- Jagannath D.R. and Brusick D.J. (1977) Mutagenicity evaluation of melamine. Report of Litton Bionetics.
- Lipschitz W. L. and Stokey E. (1945) The mode of action of three new diuretics: melamine, adenine and formoguanamine. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 83, 235-249.
- Lusby A., Simmons Z., McGuire P. (1979) Variation in mutagenicity of s-triazine compounds tested on four Salmonella strains. *Env. Mutagenesis* 1, 287-290.
- Mast R. W., Friedman M.A. and Finch R.A. (1982a) Mutagenicity testing of melamine (Abstract). *Toxicologist* 2, 172.
- Mast R.W., Naismith R.W. and Friedman M.A. (1982b) Mouse micronucleus assay of melamine (Abstract). *Envir. Mutagen.* 4, 340-341.
- Mast, R.W., Jeffcoat A.R., Sadler B.M., Kraska R.C. and Friedman M.A. (1983), Metabolism, disposition and excretion of [¹⁴C]melamine in male Fischer 344 rats, *Fd. Chem. Toxic.*, 21, 807-810.
- McGregor D.B., Brown A., Cattnach P., Edwards I., McBride D., Riach C. and Caspary W.J. (1988) Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals. *Environ. Mol. Mutag.*, 12, 85-154.
- Meek M.E., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKeeman L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J. and Patton D.E. (2003) A Framework for Human Relevance Analysis of information on Carcinogenic Modes of action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33 (6), 591-653.
- Miralis J., Tyson K., Beck J., Loh F., Steinmetz K., Contreras C., Austere L., Martin S. and Spalding J. (1983) Induction of unscheduled DNA synthesis (UDS) in hepatocytes following in vitro and in vivo treatment (Abstract No. Ef-5). *Environ. Mutagenesis*, 5, 482.
- NTP (1983) Carcinogenesis Bioassay of Melamine (CAS No 108-78-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed Study), National Toxicology Program, Technical Report Series No 245, March.
- Ogasawara H, Imaida K, Ishiwata H, Toyoda K, Kawanishi T, Uneyama C, Hayashi S, Takahashi M, Hayashi Y. (1995) Urinary bladder carcinogenesis induced by melamine in F344 male rats: correlation between carcinogenicity and urolith formation. *Carcinogenesis* 16 (11), 2773-2777.
- Okumura M, Hasegawa R, Shirai T, Ito M, Yamada S, Fukushima S. (1992) Relationship between calculus formation and carcinogenesis in the urinary bladder of rats administered the non-genotoxic agents thymine or melamine. *Carcinogenesis* 13 (6), 1043-1045.
- Perrella F.W. and Boutwell R.K. (1983) Triethylenemelamine: an initiator of two-stage carcinogenesis in mouse skin which lacks the potential of a complete carcinogen. *Cancer Lett.*, 21, 37-41.
- Röhrborn G. (1962) Chemische Konstitution und mutagene Wirkung II Triazinderivate. *Zeitschrift für Vererbungslehre* 93, 1-6.
- Rossmann T.G., Molina M., Meyer L., Boone P., Klein C.B., Wang Z., Li F., Lin W.C. and Kinney P.L. (1991) Performance of 133 compounds in the lambda prophage induction end-point of the Microscreen assay and a comparison with s. typhimurium mutagenicity and rodent carcinogenicity assay. *Mutat. Res.* 260, 349-367.

Seiler J. (1973) A survey on the mutagenicity of various pesticides. *Experientia* 29, 622-623.
Thiersch J.B. (1957) Effect of melamine, triethylenemelamine and triethylenephosphoramidate on rat litter in utero. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94, 36.
Worzalla J., Kaiman B.D., Johnson B.M., Ramirez G. and Bryan G.T. (1974) Metabolism of hexamethylmelamine-ring-14C in rats and man. *Cancer Res.* 34, 2669-2674.