
Demande d'Identification de substances perfluorées émergentes dans des échantillons d'eau et de sang de riverains d'un site industriel

Contextualisation

Les composés per- et poly-fluorés (PFAS) sont des substances contenant au moins un carbone entièrement fluoré (soit CF₃- soit -CF₂-) et généralement un groupe fonctionnel (terminal) qui diffère entre les groupes et sous-groupes de PFAS.

Depuis les années 1950, les PFAS sont largement utilisés dans des applications industrielles et commerciales, en raison de leurs diverses propriétés intéressantes. En effet, ils sont thermiquement et chimiquement stables en raison de la présence de multiples liaisons C-F fortes. De plus, la partie hautement fluorée des PFAS est oléophobe (c'est-à-dire qu'elle repousse l'huile) et hydrophobe car les atomes de fluor sont faiblement polarisables. Néanmoins, les PFAS contiennent également une partie hydrophile, qui est le groupe fonctionnel polaire terminal. Cette combinaison d'hydrophobie et d'hydrophilie les rend attrayants en tant que tensioactifs et additifs de traitement. Les PFAS sont également largement utilisés comme hydrofuges et oléofuges pour les textiles, les emballages alimentaires, les produits cosmétiques et les revêtements antiadhésifs, par exemple. Une autre application majeure des PFAS est le domaine de la lutte contre les incendies avec leur utilisation dans les mousses à film aqueux.

Comme les PFAS sont largement utilisés et stables, on les trouve et on les retrouve dans tous les types de matrices environnementales. Les principales sources de contamination sont les sites industriels et les lixiviats d'élimination des déchets, ainsi que les zones d'entraînement à la lutte contre les incendies, où les AFFF (Aqueous Film-Forming Foams) contenant des PFAS sont utilisés en grande quantité.

Les stations d'épuration des eaux usées sont également une source de rejet des PFAS dans l'eau potable, qui est une des principales voies d'exposition.

La présence de ces composés dans l'environnement, l'eau et les aliments est préoccupante car des études toxicologiques ont montré que les PFAS peuvent être liés à plusieurs problèmes de santé tels que les troubles thyroïdiens, les cancers, l'augmentation du taux de cholestérol et l'immunodéficience. Cependant, seule une faible proportion de ces composés est réglementée. Par exemple, l'acide perfluorooctane sulfonique (PFOS), ses sels et les substances apparentées ont été les premiers à être inscrits à l'annexe B de la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (POP) en 2009, après que des études ont démontré leur présence dans la faune et le sang de la population humaine. En 2019, l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) a rejoint le PFOS dans l'annexe sur les POPs. L'acide perfluorohexanoïque et les acides perfluoroalkylcarboxyliques en C₉ à C₁₄ sont actuellement considérés comme devant être inclus dans la Convention de Stockholm et feront l'objet de restrictions dans le cadre du règlement REACH (règlement européen sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques) à partir de février 2023.

En réponse aux préoccupations croissantes concernant le PFOS et le PFOA, les fabricants ont volontairement interrompu leur production, ainsi que celle de leurs substances apparentées, dans les années 2000. En conséquence, plusieurs alternatives ont été utilisées, telles que les

analogues de PFAS à chaîne courte. Comme leur partie fluorée est plus courte, ces analogues ont tendance à être moins bioaccumulatifs, mais ils sont moins performants que leurs homologues à longue chaîne. L'inclusion de liaisons éther dans la longue chaîne fluorée est une autre solution trouvée par les industriels. La liaison C-O peut conduire à une certaine fragilité et à une éventuelle dégradation en PFAS à chaîne courte, mais cela reste encore peu clair. Enfin, la formation d'une chaîne cyclique carbonée fluorée, le remplacement de certains atomes de fluor par des atomes d'hydrogène ou d'halogène et la modification de la technique de production font également partie des nombreux processus de remplacement.

Actuellement, un peu plus de 4700 composés PFAS ont été recensés, mais la plupart des études ne portent que sur une petite partie de ces composants. Par conséquent, les effets sur la santé d'un grand nombre de ces composés sont encore inconnus. Une biosurveillance à grande échelle est nécessaire pour vérifier l'impact de ces nouvelles substances dans l'environnement et sur les populations exposées.

Demande de la RTBF dans le cadre de l'émission Investigation

L'émission Investigation de la RTBF a confié au centre de recherche analytique et technologique (CART) de l'Université de Liège, Laboratoire National de Référence pour l'analyse des polluants organiques persistants halogénés dans les denrées alimentaires, la recherche de composés perfluorés émergents dans un échantillon d'eau et dans des échantillons sanguins prélevés sur des personnes résidant au voisinage du site industriel de Solvay (site de production de fluoropolymères) à Spinetta Marengo (Italie).

Un travail bibliographique approfondi a été réalisé afin de mieux cerner la demande et les objectifs de ce défi analytique. Sur base de la littérature scientifique et des rapports scientifiques disponibles (EFSA et USEPA), nous avons identifié une contribution scientifique majeure récemment publiée dans la revue *Science* en 2020 (G.W. Washington et al., *Science* 368, 1103-1107) par une équipe de scientifiques de l'agence américaine pour la protection de l'environnement (USEPA). Les résultats de cette recherche ont permis d'identifier une famille de PFAS émergents en confirmant la présence de ces composés dans des échantillons de sol dans le sud du New Jersey (USA). Ces échantillons ont été prélevés dans une zone où se trouvent deux signataires du PFOA Stewardship Program : Solvay, dans le canton de West Deptford, et Chemours (anciennement DuPont), dans le canton de Pennsville. Les auteurs de la publication ont identifié la présence dans les sols d'une famille de congénères du carboxylate de chloroperfluoropolyéther (Cl-PFPECA) qui est décrit comme étant le produit de Solvay enregistré sous le numéro CAS No. 329238-24-6.

Une recherche dans la base de données ECHA (European Chemicals Agency, <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.207.408>) fait état de d'une famille de substances enregistrées sous le nom « 1-Propene, 1,1,2,3,3,3-hexafluoro-, telomer with chlorotrifluoroethene, oxidized, reduced, hydrolyzed » (nom IUPAC) et connue sous le nom commercial de produits Solvay ADV 7800 et ADV 7850. Les recherches ont également mené à une demande d'avis de Solvay en 2010 auprès de l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA) concernant l'évaluation de la sécurité de la substance acide perfluoro acétique, α -substitué par le copolymère de perfluoro-1,2-propylène glycol et de perfluoro-1,1-éthylène glycol, terminé par des groupes chlorohexafluoropropoxy (même numéro de CAS 329238-24-6 répertorié dans ECHA), correspondant au Cl-PFPECA. Cette substance est un mélange de télomères destiné à être utilisé jusqu'à 0,5 % en rapport poids/poids (w/w) comme émulsifiant et comme agent dispersant pour le traitement des polymères fluorés.

Les conclusions du papier dans *Science* ont conduit à l'élucidation et à l'identification hautement probable de la structure suivante du Cl-PFPECA (Figure 1, sous une de ces formes) dans des échantillons de sols du New Jersey. Les valeurs de e et p (indices du nombre de

répétition de l'unité monomérique) correspondent respectivement au copolymère de perfluoro-1,1-éthylène glycol et au perfluoro-1,2-propylène glycol et peuvent varier de 0 à 4 ($e=0, 1, 2, 3, 4$ et $p=0, 1, 2, 3, 4$).

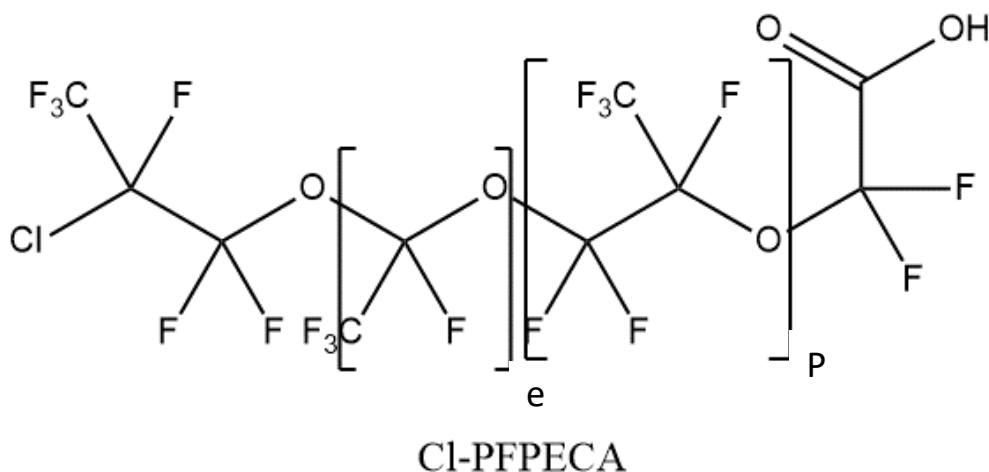


Figure 1 : structure générale de la série oligomérique des acides perfluoroether carboxyliques Cl-PFPECA, représentation du congénère ($e, p = 1, 1$)

Les conclusions du papier de *Science* démontrent la présence dans les sols du New Jersey de 10 de ces congénères mais également la présence de 5 congénères de Cl-PFPECA dans un échantillon d'eau provenant de la rivière Bormida di Spigno, en aval de Solvay Specialty Polymers, Italie (Spinetta Marengo, Alessandria, Italie). Par la suite, deux nouvelles publications scientifiques dans la revue *Environment Science and Technology* (ES&T) par les mêmes auteurs ont confirmé la présence de différentes formes de Cl-PFPECA dans les sols et dans divers prélèvements d'eau dans le New Jersey. Des informations techniques détaillées sur les méthodes analytiques utilisées dans ces publications sont disponibles en ligne dans les informations supplémentaires (SI).

Il a également été demandé à notre laboratoire de confirmer ou d'infirmer la présence d'une autre substance, à savoir l'acide acétique, 2,2-difluoro-2-[[2,2,4,5-tetrafluoro-5-(trifluorométhoxy)-1,3-dioxolan-4-yl]oxy], numéro de CAS (1190931-41-9) et connu sous le nom commercial de cC6O4. La structure de cette molécule est reprise à la Figure 2.

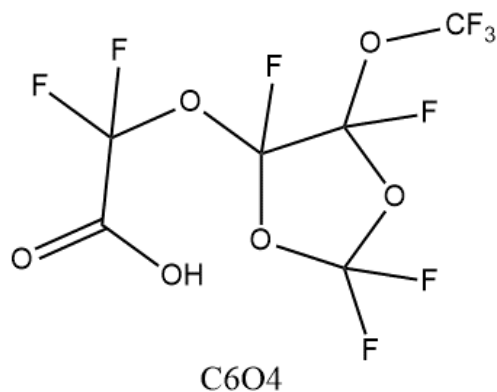


Figure 2 : structure du cC6O4

Méthode analytique utilisée

Le CART de l'Université de Liège possède une expertise de plus de 20 ans dans le domaine des polluants organiques persistants. Il est équipé d'instruments en spectrométrie de masse permettant d'apporter les éléments de réponse aux questions soulevées. Il est aussi important de préciser à ce stade que dans le cadre de ce travail analytique, nous ne possédons pas les standards de référence des molécules (tout comme dans les publications dans Science et ES&T). En effet tant le C6O4, que ADV ne sont pas disponibles commercialement. Le CART a mis en place une méthode analytique en s'inspirant des publications scientifiques mentionnées ci-dessus, tout en adaptant les méthodes à ses instruments disponibles. Nous avons utilisé des instruments de mesure en spectrométrie de masse permettant d'atteindre la plus grande spécificité afin d'augmenter le degré de confiance dans le processus d'identification. Les échantillons d'eau et de sang ont été extraits par extraction en phase solide (SPE) par échange d'anions faibles (Oasis, Wax) conformément aux protocoles standards d'analyse des PFAS. Les composés d'intérêt ont été récupérés dans le méthanol/NH₄OH 2%, filtrés et repris dans un mélange H₂O/CH₃OH 95/5 (v/v).

L'analyse non ciblée a été réalisée par chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC, Acquity I-Class, Waters) en utilisant une colonne analytique de type C₁₈ (BEH C18, 2.1 x 150 mm, Waters) et couplée à un spectromètre de masse à très haute résolution de type Orbitrap (Q-Exactive, Thermo Scientific) équipé d'une source électrospray fonctionnant en mode négatif. Les paramètres de chromatographie, de réglages de la source, des modes d'acquisition en mode balayage et en mode MS/MS sont disponibles sur demande.

L'ordre d'élution et les temps de rétention en chromatographie des différentes formes de ADV sont identiques dans l'eau et dans les échantillons sanguins. Leurs positions relatives constantes par rapport au PFOA dans les profils d'élution chromatographiques (voir Figures 3 et 4 pour le C6O4 et l'ADV dans l'échantillon eau) permettent de confirmer la bonne reproductibilité du processus d'élution en chromatographie liquide et d'utiliser les temps de rétention relatifs comme premier critère d'identification.

L'analyse des données non ciblées en haute résolution par spectrométrie de masse à partir des fichiers bruts a été traitée au moyen des logiciels XCalibur (Thermo Scientific) et Skyline (MacCoss Lab, Washington). Une analyse minutieuse des spectres de masse à partir des masses exactes des ions majoritaires produits en source (M-CF₂COOH) des différentes formes de Cl-PFPECA (exactitude en masse inférieure à 2 ppm dans tous les cas), des voies de fragmentation en MS/MS et de l'exactitude en masse sur les deux fragments majoritaires en MS/MS (inférieure à 2 ppm) a permis de gagner en confiance dans le processus d'identification du cC6O4 et des différentes formes de ADV. Pour terminer, les congénères de ADV présents dans

les échantillons analysés se fragmentent en formant un ion commun ($\text{ClCF}_3\text{CFCF}_2\text{O}^-$) de m/z 200,9535 (exactitude sous le critère à 2ppm) et vérification de l'abondance isotopique naturelle du chlore via le ratio des ions $M/M+2$ pour chacun des congénères de ADV retrouvé.

Tous ces paramètres d'identification que nous venons de citer dans le cadre de notre développement analytique sont en accord avec la littérature scientifique précitée (*Science* et *ES&T*), articles publiés dans des revues scientifiques à très haut facteur d'impact avec évaluation par les pairs (peer reviewing process).

Les résultats dans l'eau prélevée au niveau du rejet d'eau usée du site de Solvay Spinetta :

La présence probable de cC_6O_4 dans l'eau de rejet analysée est illustrée à la Figure 3 ci-dessous. Le pic de cC_6O_4 y apparaît au milieu du chromatogramme. Les critères d'identification mentionnés ci-dessus sont rencontrés.

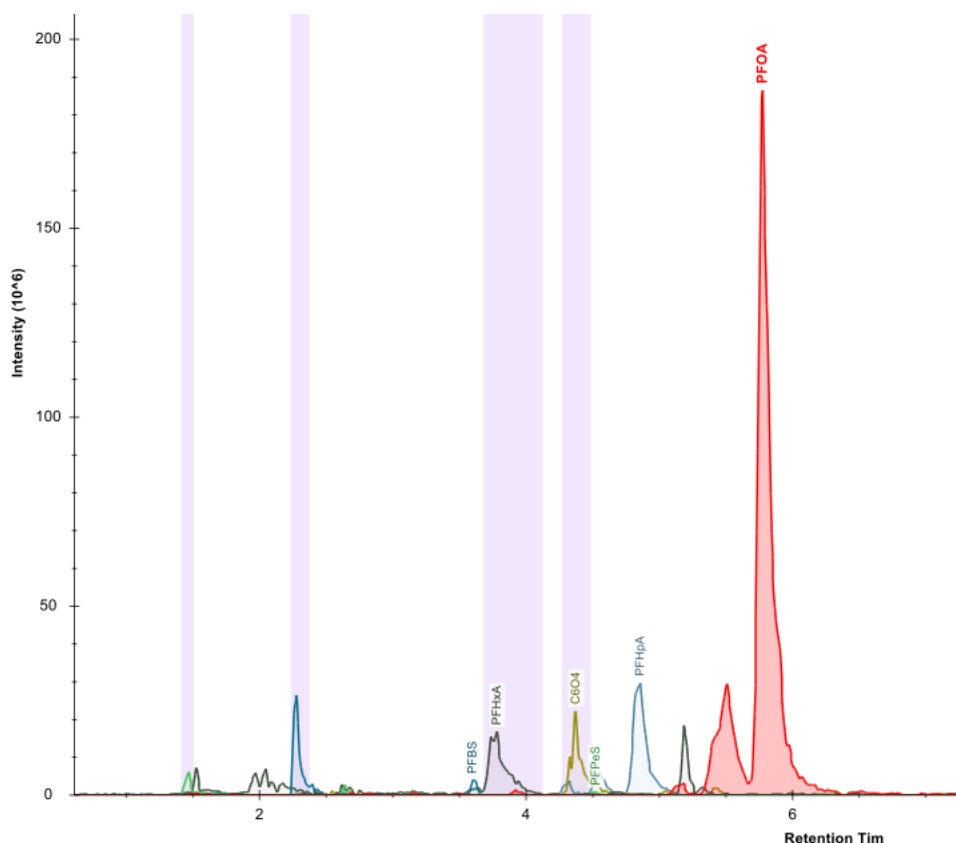


Figure 3 : chromatogramme de l'eau de rejet au site de Solvay Spinetta mettant en évidence la présence probable de cC_6O_4 et d'autre PFAS historiques comme le PFOA.

Cinq formes d'oligomères majeures de Cl-PFPECA (ADV) ont été identifiées sur base des critères énoncés ci-dessus dans l'eau de rejet de Solvay. Il s'agit des congénères (e, p = 1.0 ; e, p = 0.1 ; e, p = 2.0 ; e, p = 1,1 ; e, p = 0.2).

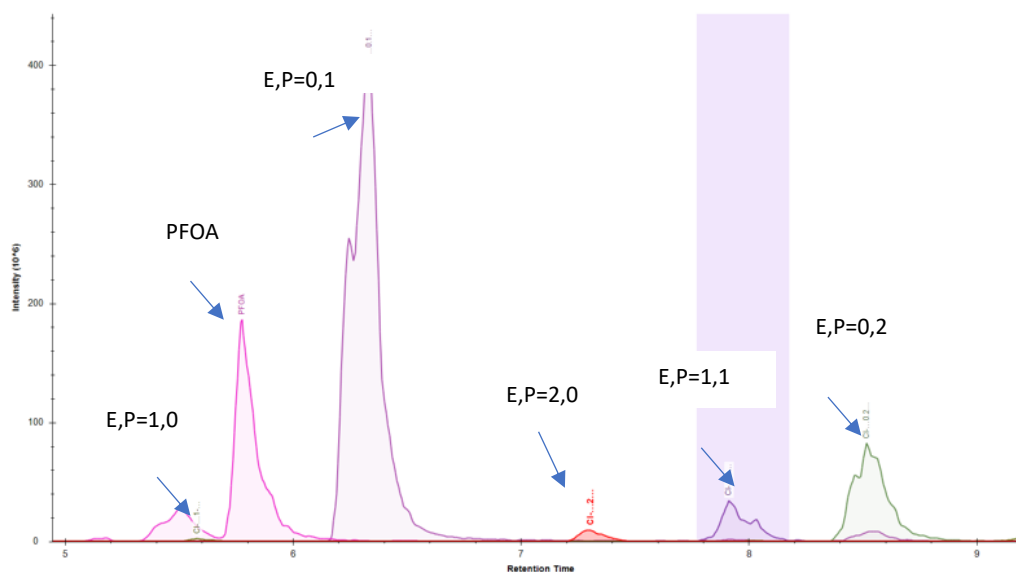


Figure 4 : chromatogramme de l'eau de rejet au site de Solvay Spinetta mettant en évidence la présence probable de 5 formes de Cl-PFPECA et du PFOA.

L'article dans la revue *Science* évoque l'analyse d'un prélèvement d'eau provenant de Spinetta, prélèvement probablement effectué en 2019 ou 2020 au regard de la date de publication scientifique. Nous sommes allés rechercher le chromatogramme dans les Supplementary Materials (SI) du papier de G.W. Washington et al., *Science*, 368, 1103-1107, Figure S3 (MS^e mass chromatogram for Bormida River, Italy sample) dont le lien est donné ici car nous ne pouvons pas publier une figure provenant d'une revue scientifique sans en demander l'autorisation.

(<http://science.sciencemag.org/content/suppl/2020/06/03/368.6495.1103.DC1>).

On observe la parfaite correspondance avec notre analyse effectuée plus de deux ans après. Non seulement on retrouve exactement les mêmes congénères (à savoir e, p =1.0 ; e, p =0.1 ; e, p =2.0 ; e, p =1,1 ; e, p =0.2), un ordre d'éluion chromatographique identique mais aussi des intensités relatives (hauteur de pics) assez similaires pour les différents congénères.

Les résultats des échantillons de sang de riverains de Spinetta du site de Solvay :

En ce qui concerne l'analyse des 30 prélèvements sanguins des riverains de Spinetta, notre méthode analytique n'a pas permis de détecter la présence de cC604 dans les échantillons de sang, au-dessus de notre seuil de détection. La littérature scientifique abonde dans ce sens en mettant en avant le caractère moins persistant et bioaccumulateur de ce PFSA émergent. Une récente publication de collègues italiens dans la revue *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (G. Frigerio et al., ABC, 2022, 414 :1-20) montre également que leur méthode d'analyse validée a permis d'identifier la présence de cC604 dans un seul échantillon parmi un échantillonnage de 38 prélèvements sanguins.

A notre connaissance, il n'y a pas à ce jour de données publiées dans la littérature scientifique faisant état de la présence de congénères de Cl-PFPECA dans le sang humain. Ces résultats présentés publiquement dans ce rapport sont donc une première mondiale.

Sur base de tous les critères d'identification de notre méthode analytique rencontrés, une analyse rigoureuse et systématique de nos données a permis de conclure à une forte suspicion de la présence de 5 formes oligomères majeures de Cl-PFPECA dans les échantillons de sang

des riverains de Spinetta. Les 5 congénères probablement présents **sont les mêmes que ceux probablement retrouvés dans l'échantillon d'eau**, à savoir (e, p =1,0 ; e, p =0,1 ; e, p =2,0 ; e, p = 1,1 ; e, p =0,2). Tout comme dans l'échantillon d'eau, le congénère (e, p =0,1) est majoritairement présent **dans tous les échantillons de sang**, et il représente entre 70 - 99% d'abondance relative, suivi dans des proportions beaucoup plus faibles de (e, p =0,2) et ensuite les 3 autres congénères, comme le montre clairement la Figure 6. Selon la nomenclature Solvay, le congénère (e, p =0,1) porte le nom de N2 et représenterait pratiquement 50% en poids de la mixture technique de ADV produite sur le site de Spinetta, suivi par le congénère (e, p =0,2) qui porte le nom de N3 et qui représenterait plus de 20% de l'ADV. Nos résultats sont donc cohérents avec ces chiffres avancés. La forte proportion de (e, p =0,1) dans le sang des riverains de Spinetta pourrait s'expliquer par une dégradation du congénère (e, p =0,2) en (e, p =0,1), mais à l'heure actuelle aucune étude scientifique ne permet de confirmer cette hypothèse avancée.

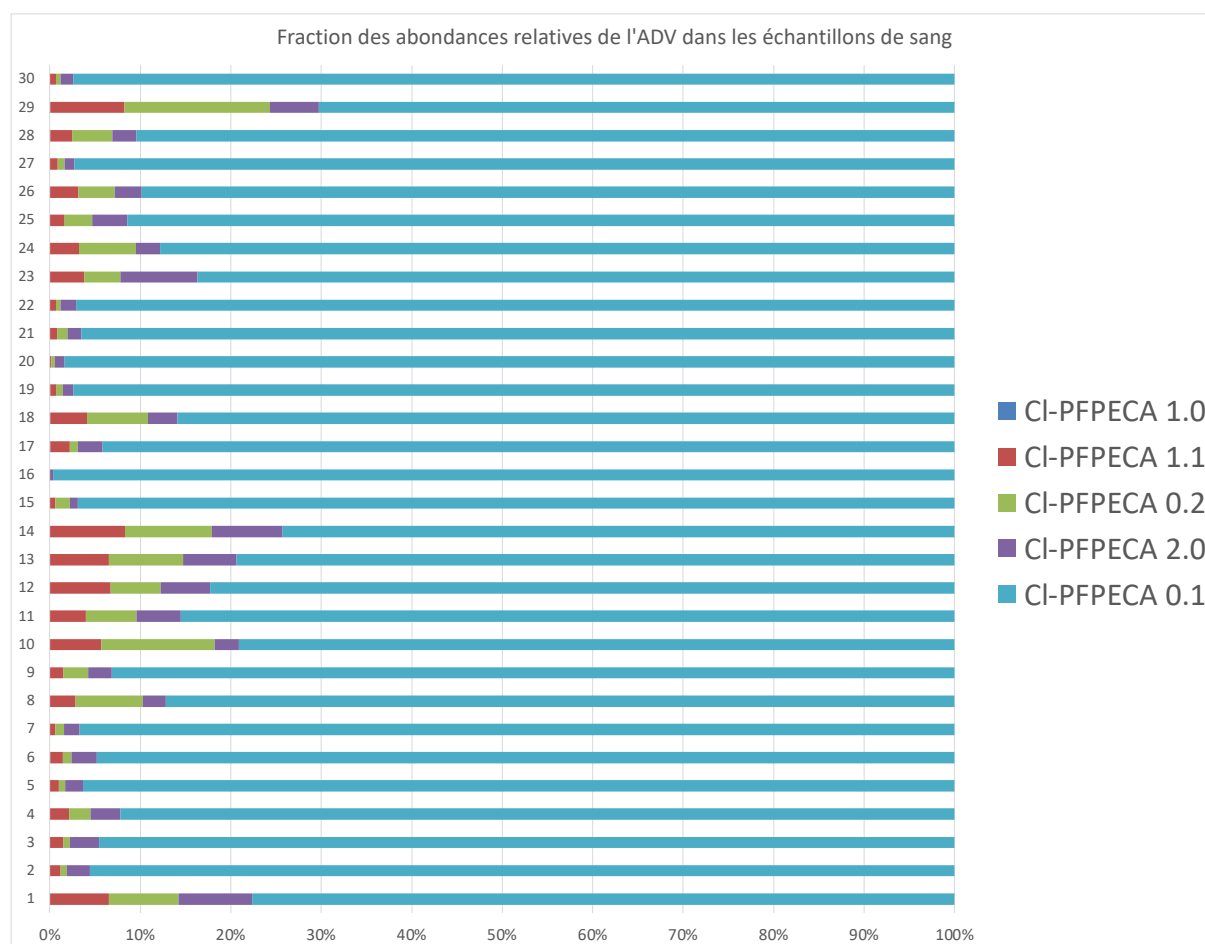


Figure 6 : Pourcentage des abondances relatives des différents congénères probablement présents dans le sang des riverains de Spinetta.

Comparaison des abondances relatives des 5 congénères majoritaires de Cl-PFPECA (ADV) dans le sang des riverains de Spinetta

Les Figures 7 à 11 reprennent les intensités des signaux mesurés par UPLC-MS à haute résolution pour l'ion fragment M-CF₂COOH. On remarque que des **différences de plusieurs ordres de grandeur** d'intensité des signaux sont observables sur les différents graphiques. Ces signaux sont comparables entre eux pour un même congénère du Cl-PFPECA. La tendance est la même pour chaque congénère de l'ADV, à savoir que les signaux les plus intenses correspondent à des numéros de prélèvements sanguins d'anciens travailleurs de l'usine Solvay.

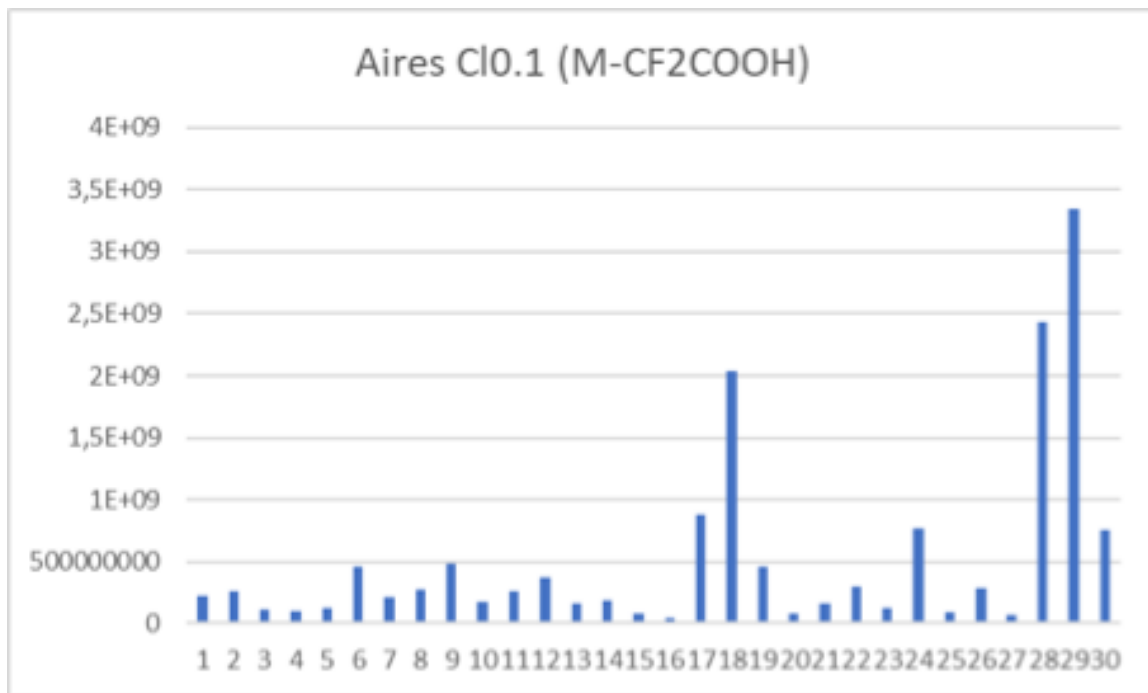


Figure 7 : Intensité des signaux de (e, p =0,1) pour les 30 échantillons de sang (1 à 30)

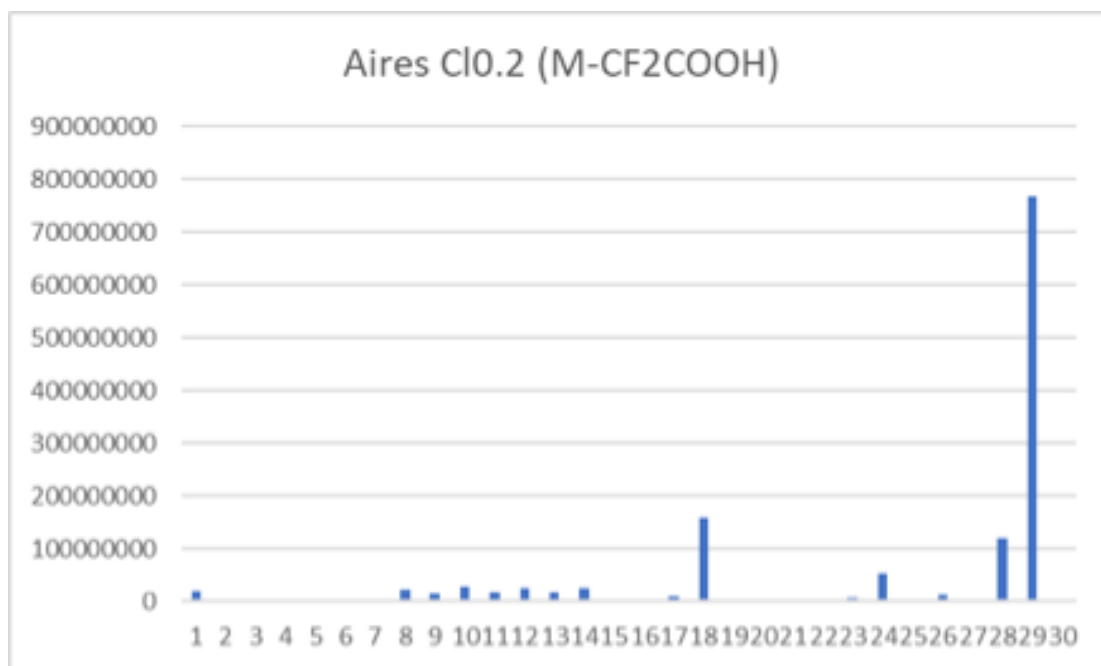


Figure 8 : Intensité des signaux de (e, p =0,2) pour les 30 échantillons de sang (1 à 30)

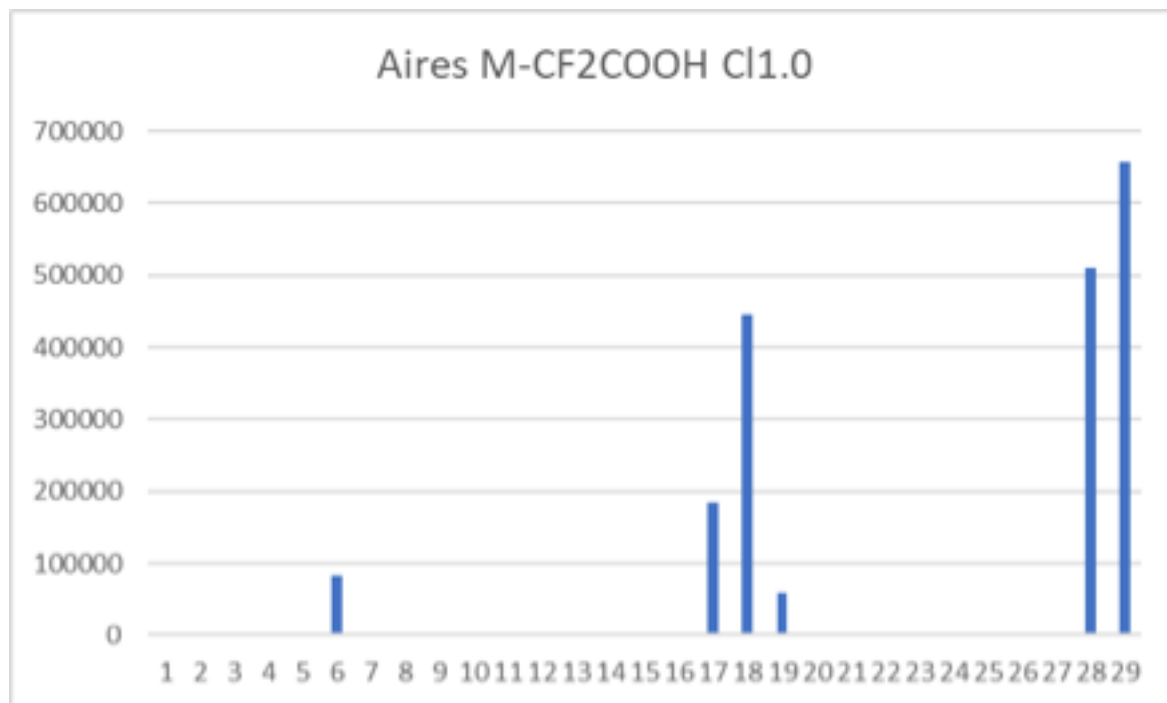


Figure 9 : Intensité des signaux de (e, p=1,0) pour les 30 échantillons de sang (1 à 30)

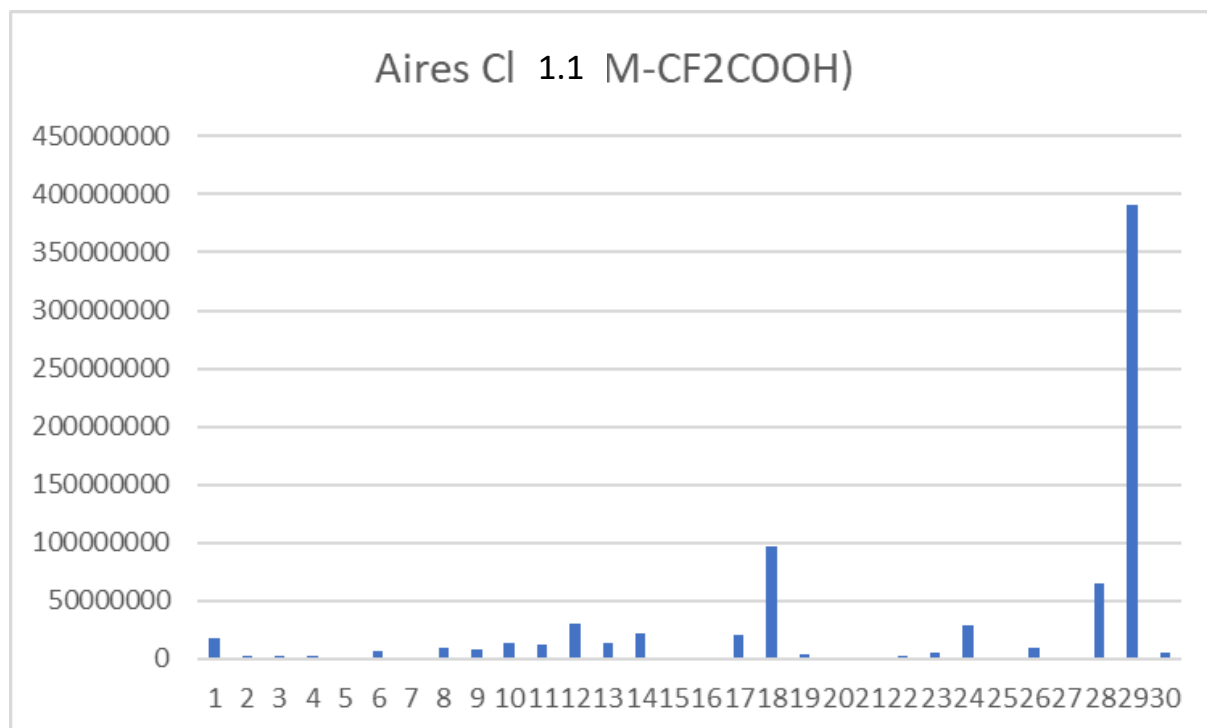


Figure 10 : Intensité des signaux de (e, p=1.1) pour les 30 échantillons de sang (1 à 30)

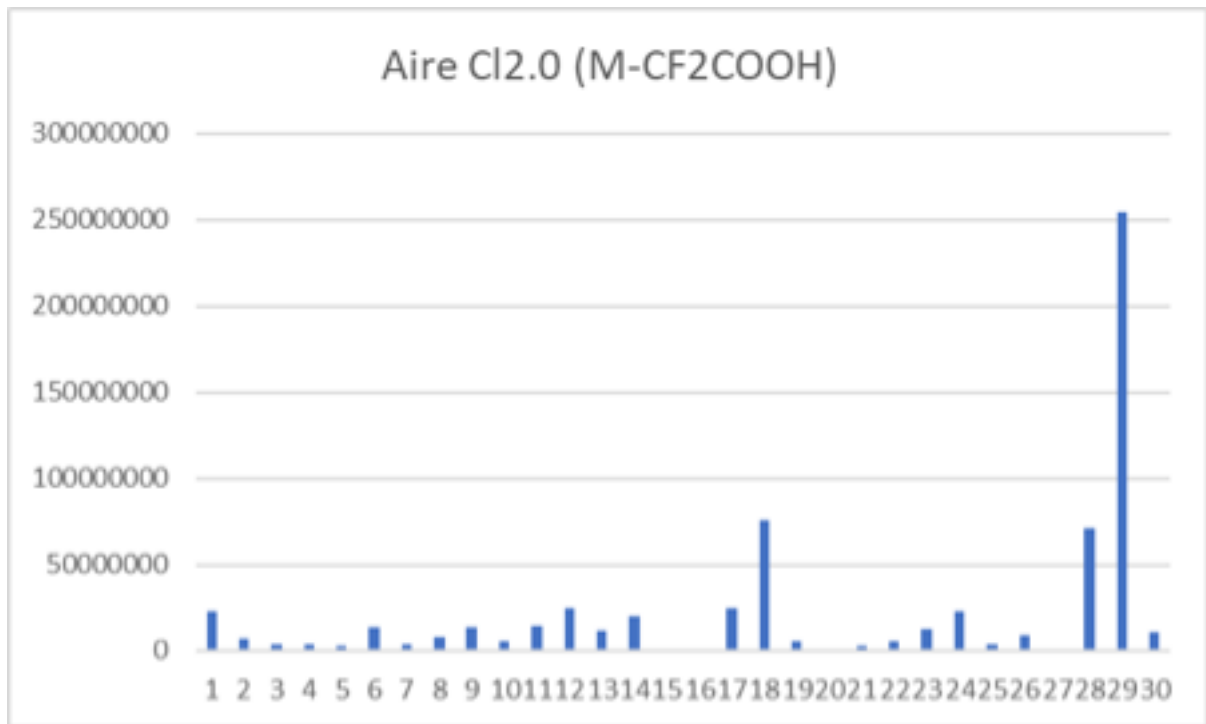


Figure 11 : Intensité des signaux de (e, p =2,0) pour les 30 échantillons de sang (1 à 30)

Conclusions :

Cette étude avait pour objectif de relever un incroyable défi analytique qui consistait à mettre en place, en un temps record, une méthode d’analyse non-ciblée de PFAS émergents par spectrométrie de masse à haute résolution. Grâce à un travail d’équipe acharné et coordonné, mon laboratoire a pu apporter en toute indépendance des éléments de réponses objectifs et concrets à la demande formulée par les journalistes de l’émission Investigation de la RTBF. L’expertise du CART de ULiège dans le domaine de l’analyse des POPs a permis, au travers d’un ensemble de critères d’identification et de vérifications analytiques, d’obtenir un faisceau de preuves concordantes, cohérentes et en accord avec l’état de l’art actuel des connaissances de la littérature scientifique, permettant de statuer à une forte suspicion de la présence de cC604 et de 5 oligomères majeurs du Cl-PFPECA (ADV) dans un échantillon de rejet d’eau de l’usine Solvay de Spinetta Marengo et de la présence également de ces mêmes 5 oligomères du Cl-PFPECA (ADV) mais en différentes proportions et quantités dans les prélèvements sanguins de 30 riverains de Spinetta. Il est important de préciser qu’en aucun cas nous ne pouvons garantir à 100% que ces composés perfluorés émergents sont bien présents dans les prélèvements effectués par la RTBF étant donné que nous ne disposons pas des standards analytiques de ces molécules recherchées.

Liège le 5 septembre 2022

Prof. Gauthier Eppe
 Directeur du MSLab et du CART, ULiège