
Revue des méthodes analytiques disponibles pour la caractérisation des nano-objets, de leurs agrégats et agglomérats en vue de répondre aux exigences réglementaires

Saisine « n°2018-SA-0168 - Définition nanomatériaux »

RAPPORT d'appui scientifique et technique

Février 2020

Mots clés

Nanomatériaux, nanoparticules, nano-objets, caractérisation physicochimique, métrologie, définition.

Nanomaterials, nanoparticles, nano-objects, physico-chemical characterization, metrology, definition.

Présentation des intervenants

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

RAPPORTEURS

M. Olivier AGUERRE-CHARIOL – Chargé de recherche à l'Institut national de l'environnement industriel et des risques (Ineris)

M. Niki BACCILE – chargé de recherche 1^{ère} classe au Centre national de la recherche scientifique (CNRS) de l'unité mixte de recherche 7574 « laboratoire de chimie de la matière condensée de Paris » (LCMCP)

M. Georges FAVRE – Directeur de l'Institut LNE Nanotech, Laboratoire National de métrologie et d'Essais (LNE)

M. Emmanuel FLAHAUT – Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS), de l'unité mixte de recherche 5085 Centre inter-universitaire de recherche et d'ingénierie des matériaux (CIRIMAT)

Mme Nathalie HERLIN-BOIME – Directrice de recherche au commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) de l'unité mixte de recherche (UMR) 3685 « Nanosciences et Innovation pour les Matériaux, la Biomédecine et l'Énergie » (NIMBE)

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis par les CES suivants :

- CES « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » - mandat 2018-2021

Présidente

Anne PEREIRA DE VASCONCELOS – Chargée de recherche, Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), Laboratoire de neurosciences cognitives et adaptatives - UMR 7364, CNRS – Université de Strasbourg.

Membres

Thomas CLAUDEPIERRE – Enseignant chercheur à l'université de Lorraine

Brigitte DEBUIRE – Professeur des universités émérite.

Jean-François DORÉ – Directeur de recherche émérite à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm).

Thierry DOUKI – Chef de laboratoire / Ingénieur docteur en chimie, Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA).

Jack FALCÓN – Chercheur émérite du Centre national de la recherche scientifique (CNRS), spécialisé en chronobiologie animale, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), CNRS 7208, Muséum National d'Histoire Naturelle.

Emmanuel FLAHAUT – Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

François GAUDAIRE – Ingénieur au Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB).

Martine HOURS – Médecin épidémiologiste, Directeur de recherche à l'Institut français des sciences et technologies des transports, de l'aménagement et des réseaux (Ifsttar).

Chaker LARABI – Enseignant chercheur à l'université de Poitiers.

Joël LELONG – Directeur adjoint de laboratoire / Docteur en physique à l'Institut français des sciences et technologies des transports, de l'aménagement et des réseaux (Ifsttar).

Frédérique MOATI – Maître de conférences en biophysique et médecine nucléaire à l'Université Paris Sud XI / Praticien hospitalier / Radiopharmacienne / Biologiste, AP-HP Hôpital Bicêtre.

Catherine MOUNEYRAC – Directrice de l'Institut de biologie et d'écologie appliquée et Professeur en écotoxicologie aquatique à l'Université catholique de l'ouest (UCO).

Fabien NDAGIJIMANA – Professeur des universités, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Anne-Lise PARADIS – Chargée de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

Marie-Pierre ROLS – Directrice de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

Valérie SIMONNEAUX – Chercheuse en neurobiologie des rythmes au Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

Alain SOYEZ – Responsable de laboratoires, Ingénieur conseil, Caisse d'assurance retraite et de santé au travail Nord Picardie.

Esko TOPPILA – Professeur, Directeur de recherche à l'Institut finlandais de santé au travail.

Alicia TORRIGLIA – Médecin, Directeur de recherche en ophtalmologie, Centre de Recherches des Cordeliers, Institut National de la Santé et de la recherche médicale (Inserm).

Françoise VIÉNOT – Professeur émérite - Centre de Recherche sur la Conservation (CRC), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Ministère de la Culture, 36 rue Geoffroy Saint Hilaire, 75005 Paris, France.

Catherine YARDIN – Professeur, chef de service, médecin biologiste à l'Hôpital Dupuytren, CHU de Limoges.

- CES « Substances chimiques visées par les règlements REACH et CLP » (troisième mandature, du 1^{er} septembre 2017 au 31 août 2020)

Président

M. Jean-Ulrich MULLOT – Docteur en Pharmacie – Service de Santé des Armées. *Du 1^{er} septembre 2017 au 15 mars 2018.*

M. Christophe MINIER – Professeur des Universités – Université de Normandie. *À partir du 15 mars 2018.*

Vice-président-e

Mme Paule VASSEUR – Professeur de toxicologie, chercheur toxicologue écotoxicologue – Retraitée de l'université de Lorraine. *Jusqu'au au 15 mars 2018.*

M. Christophe MINIER – Professeur des Universités – Université de Normandie. *Du 12 décembre 2017 15 mars 2018.*

M. Fabrizio PARISELLI – Ingénieur d'étude toxicologue – CNRS. *A partir du 15 mars 2018.*

Membres

Mme Isabelle BILLAULT – Maître de conférences – Université Paris Sud.

M. Christophe CALVAYRAC – Maître de conférence – Université de Perpignan Via Domitia.

Mme Marie-Laure COINTOT – Docteur en pharmacie – Ministère des Armées.

M. Richard DANIELLOU – Professeur des universités – Université d'Orléans.

M. René HABERT – Professeur des universités émérite – Université Paris Diderot.

Mme Guillermina HERNANDEZ-RAQUET – Directeur de recherche – Institut national de la recherche agronomique, (INRA).

M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint Toxicologie des contaminants – Laboratoire de Fougères – Anses.

Mme Olwenn MARTIN – Chargée de recherche – Brunel University London. *Jusqu'au 12 décembre 2017.*

Mme Laura MAXIM – Chargée de recherche – Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

M. Christophe MINIER – Professeur des Universités – Université de Normandie.

M. Jean-Ulrich MULLOT – Docteur en Pharmacie – Service de Santé des Armées.

Mme Laurence MUSSET – Retraitée depuis juin 2017 (auparavant Ingénieur de recherche, responsable valorisation au CNRS).

M. Fabrizio PARISELLI – Ingénieur d'étude toxicologue – Centre national de la recherche scientifique (CNRS).

Mme Cécile QUANTIN – Professeur des universités – Université Paris Sud.

M. Bernard SALLES – Professeur de toxicologie, directeur d'unité – Université de Toulouse et Institut national de la recherche agronomique, (INRA).

Mme Valérie SEROR – Chargée de recherche – Institut National de la Santé et de la recherche médicale (Inserm).

M. Alain SIMONNARD – Docteur ès Sciences Pharmaceutiques – Expert toxicologue - Retraité de l'INRS (Directeur du département de toxicologie et de biométrie).

Mme Paule VASSEUR – Professeur de toxicologie, chercheur toxicologue écotoxicologue – Retraitée de l'université de Lorraine.

Mme Catherine VIGUIE – Directrice de recherche, vétérinaire – Institut national de la recherche agronomique, (INRA).

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifique

M. Anthony CADENE – Chef de projets scientifiques, Unité d'évaluation des risques liés aux agents physiques – Anses

M. Stéphane JOMINI – Chef de projets scientifiques, Unité d'évaluation des risques liés aux substances chimiques – Anses

Secrétariat administratif

Mme Sophia SADDOKI

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	11
Lexique	12
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures	13
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise.....	15
1.1 Contexte.....	15
1.2 Objet de la saisine.....	16
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	16
1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts.	17
2 Généralités	18
2.1 Paramètres physicochimiques des nanomatériaux.....	18
2.2 Concepts, termes clés et définitions	19
3 Tailles des particules et distribution de tailles	22
3.1 Utilité pour l'évaluation des risques	22
3.2 Description des principales méthodes de caractérisation.....	22
3.2.1 Microscopie électronique à balayage (MEB)	23
3.2.1.1 Fonctionnement.....	23
3.2.1.2 Particularités et limites techniques	24
3.2.1.3 Normes associées et documents de référence principaux	25
3.2.1.4 Accessibilité et coûts	25
3.2.2 Microscopie électronique à transmission (MET).....	25
3.2.2.1 Fonctionnement.....	25
3.2.2.2 Particularités et limites techniques	26
3.2.2.3 Normes associées et documents de référence principaux	27
3.2.2.4 Accessibilité et coûts	27
3.2.3 Microscopie à force atomique (AFM)	27
3.2.3.1 Fonctionnement.....	27
3.2.3.2 Particularités et limites techniques	28
3.2.3.3 Normes associées et documents de référence principaux	30
3.2.3.4 Accessibilité et coûts	30
3.2.4 Diffusion dynamique de lumière (DLS)	30
3.2.4.1 Fonctionnement.....	30
3.2.4.2 Particularités et limites techniques	31
3.2.4.3 Normes associées et documents de référence principaux	33
3.2.4.4 Accessibilité et coûts	33
3.2.5 Analyse de particules individuelles par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (sp-ICPMS).....	34
3.2.5.1 Fonctionnement.....	34
3.2.5.2 Particularités et limites techniques	35
3.2.5.3 Normes associées et documents de référence principaux	36
3.2.5.4 Accessibilité et coûts	36

3.2.6	Couplage spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif et détecteur de diffusion de la lumière multi-angle (A4F-MALS-UV-ICP-MS)	36
3.2.6.1	Fonctionnement.....	36
3.2.6.2	Particularités et limites techniques	37
3.2.6.3	Normes associées et documents de référence principaux	38
3.2.6.4	Accessibilité et coûts	38
3.2.7	Sédimentation par centrifugation en phase liquide (CLS)	38
3.2.7.1	Fonctionnement.....	38
3.2.7.2	Particularités et limites techniques	38
3.2.7.3	Normes associées et documents de référence principaux	39
3.2.7.4	Accessibilité et coûts	39
3.2.8	Diffusion de rayons-X aux petits angles (SAXS)	39
3.2.8.1	Fonctionnement.....	39
3.2.8.2	Particularités et limites techniques	40
3.2.8.3	Normes associées et documents de référence principaux	41
3.2.8.4	Accessibilité et coûts	41
3.2.9	Spectromètre de mobilité électrique (SMPS).....	41
3.2.9.1	Fonctionnement.....	41
3.2.9.2	Particularités et limites techniques	42
3.2.9.3	Normes associées et documents de référence principaux	43
3.2.9.4	Accessibilité et coûts	43
3.2.10	Compteur Coulter (TRPS)	43
3.2.10.1	Fonctionnement.....	43
3.2.10.2	Particularités et limites techniques	43
3.2.10.3	Normes associées et documents de référence principaux	44
3.2.10.4	Accessibilité et coûts	44
3.2.11	Analyse par traçage des particules (PTA).....	45
3.2.11.1	Fonctionnement.....	45
3.2.11.2	Particularités et limites techniques	45
3.2.11.3	Normes associées et documents de référence principaux	45
3.2.11.4	Accessibilité et coûts	46
3.2.12	Synthèse.....	46
4	Forme.....	49
4.1	Utilité pour l'évaluation des risques	49
4.2	Description des principales méthodes de caractérisation.....	49
5	Surface spécifique.....	50
5.1	Utilité pour l'évaluation des risques	50
5.2	Description des principales méthodes de caractérisation.....	50
5.2.1	Adsorption de gaz (méthode BET)	50
5.2.1.1	Fonctionnement.....	50
5.2.1.2	Particularités et limites techniques	51
5.2.1.3	Normes associées et documents de référence principaux	52
5.2.1.4	Accessibilité et coûts	52
6	Composition.....	53
6.1	Utilité pour l'évaluation des risques	53
6.2	Description des principales méthodes de caractérisation.....	53
6.2.1	Spectrométrie de masse à source plasma induit (ICP-MS) et Spectroscopie d'émission optique (ICP-OES)	53
6.2.1.1	Fonctionnement.....	53

6.2.1.2	Particularités et limites techniques	54
6.2.1.3	Normes associées et documents de référence principaux	54
6.2.1.4	Accessibilité et coûts	54
6.2.2	Spectrométrie par fluorescence X	55
6.2.2.1	Fonctionnement.....	55
6.2.2.2	Particularités et limites techniques	55
6.2.2.3	Normes associées et documents de référence principaux	55
6.2.2.4	Accessibilité et coûts	56
6.2.3	Diffraction de rayons X (DRX).....	56
6.2.3.1	Fonctionnement.....	56
6.2.3.2	Particularités et limites techniques	57
6.2.3.3	Normes associées et documents de référence principaux	57
6.2.3.4	Accessibilité et coûts	57
6.3	Autres techniques innovantes	57
7	Chimie / analyse de surface.....	59
7.1	Utilité pour l'évaluation des risques	59
7.2	Description des principales méthodes de caractérisation	59
7.2.1	Spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS).....	59
7.2.1.1	Fonctionnement.....	59
7.2.1.2	Particularités et limites techniques	60
7.2.1.3	Normes associées et documents de référence principaux	60
7.2.1.4	Accessibilité et coûts	60
7.2.2	Spectrométrie photoélectronique (XPS)	60
7.2.2.1	Fonctionnement.....	60
7.2.2.2	Particularités et limites techniques	61
7.2.2.3	Normes associées et documents de référence principaux	61
7.2.2.4	Accessibilité et coûts	61
7.2.3	Spectrométries vibrationnelles (FTIR / Raman).....	62
7.2.3.1	Fonctionnement.....	62
7.2.3.2	Particularités et limites techniques	62
7.2.3.3	Normes associées et documents de référence principaux	63
7.2.3.4	Accessibilité et coûts	63
8	Charge de surface : potentiel zéta	64
8.1	Utilité pour l'évaluation des risques	65
8.2	Description des principales méthodes de caractérisation.....	65
8.2.1	Mobilité électrophorétique.....	65
9	État d'agglomération et d'agrégation.....	66
9.1	Utilité pour l'évaluation des risques	66
9.2	Description des principales méthodes de caractérisation.....	66
10	Dispersibilité - solubilité.....	67
10.1	Utilité pour l'évaluation des risques	67
10.2	Description des principales méthodes de caractérisation.....	67
11	Détermination de l'aspect nanométrique d'un échantillon : recommandations et arbre de décision.....	69

11.1 Cas général.....	70
11.2 Dispersions en milieu liquide.....	72
11.3 Exemples de cas particuliers / exceptions.....	72
11.3.1 Nanotubes de carbone.....	72
11.3.2 Silices amorphes de synthèse (SiO ₂) / noir de carbone.....	72
11.3.3 Substances organiques.....	72
12 Bibliographie.....	73
12.1 Publications.....	73
12.2 Normes.....	74
ANNEXES	77
Annexe 1 : Lettre de saisine.....	78
Notes.....	81

Sigles et abréviations

A4F : fractionnement d'écoulement de champ (*Flow-Field Flow Fractionation*)

AFM : microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy*)

ATG : analyse thermique gravimétrique

BET : méthode Brunauer, Emmet et Teller

CLS : sédimentation par centrifugation en phase liquide (*centrifugal liquid sedimentation*)

CPC : compteur de Particules à Noyaux de Condensation

DCS : sédimentation par centrifugation

DLS : diffusion dynamique de lumière (*Dynamic Light Scattering*)

DMA : analyseur à Mobilité Différentielle

DRX : diffraction de rayons-X

EDS (ou EDX) : analyse dispersive en énergie (*Energy Dispersive X-ray*)

EELS : spectroscopie de perte d'énergie des électrons (*Electron Energy Loss Spectroscopy*)

ESCA : spectroscopie d'électron pour l'analyse chimique (*Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*)

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (*Fourier Transform InfraRed spectroscopy*)

HARN : *High Aspect Ratio Nanoparticles*

ICP- AES : spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*)

ICP-MS : spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

ICP-OES : spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (*Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry*)

MALS : diffusion de la lumière multi-angle (*Multi Angle Light Scattering*)

MEB : microscopie électronique à balayage

MET : microscopie électronique à transmission

NOAA : nano-objets et leurs agrégats et agglomérats de plus de 100 nm. (ISO/TR 13014).

NTC : nanotubes de carbone

PTA : analyse par traçage des particules (*Particle Track and Analysis*)

PDI : indice de polydispersité

PDF : *Pair Distribution Function*

SAXS : diffusion de rayons-X aux petits angles (*Small Angle X-rays Scattering*)

SEC : chromatographie à exclusion de taille

SFX : spectrométrie de fluorescence des rayons X

SIMS : spectrométrie de masse des ions secondaires (*Secondary Ion Mass Spectrometry*)

SMLS : *Static Multiple Light Scattering*

SMPS : spectrométrie de mobilité électrique (*Scanning Mobility Particle Sizer*)

SPE : *Single Particle Event*

sp-ICPMS : analyse de particules individuelles par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (*single particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

TRPS : compteur Coulter (*Tunable Resistive Pulse Sensing*)

VSSA : surface spécifique volumique (*Volume Specific Surface Area*)

WAXS : diffusion de rayons-X aux grands angles (*Wide Angle X-ray Scattering*)

XRF : spectrométrie de fluorescence des rayons X (*X-Ray Fluorescence*)

XPS : spectrométrie photoélectronique (*X-Ray Photoelectron Spectrometry*)

Lexique

Agglomérat : ensemble de particules faiblement liées, d'agrégats ou mélange des deux dont l'aire de la surface externe résultante est similaire à la somme des aires de surface de chacun des composants (ISO/TS 80004-2:2015).

Agrégat : ensemble de particules comprenant des particules faiblement liées ou fusionnées dont l'aire de la surface externe résultante peut être significativement plus petite que la somme des aires de surface calculées de chacun des composants (ISO/TS 80004-2:2015).

Dispersion : système multiphasique au sein duquel une ou plusieurs phases discontinues données (solide, liquide, gazeux) sont distribuées de manière homogène au sein d'une phase continue de composition différente ou dans un état donné (note : si des particules solides sont distribuées de manière homogène dans un liquide, la dispersion est dite suspension) (ISO/TR 13097:2013).

Nano-échelle : gamme de taille s'étendant approximativement de 1 nm à 100 nm (ISO/TS 80004-1:2015).

Nano-objet : matériau dont une, deux ou les trois dimensions externes sont à la nano-échelle (ISO/TS 80004-1:2015).

Nano-produit : produit fini contenant des nanomatériaux manufacturés.

Nanoparticule : nano-objet dont les trois dimensions externes sont à la nano-échelle (ISO/TS 80004-2:2015) (cf. Figure 1, D = 3).

Nanofibre : nano-objet dont deux dimensions externes similaires sont à la nano-échelle et dont la troisième dimension est significativement plus grande (ISO/TS 80004-2:2015) (Figure 1, D= 2).

Nanofeuillet : nano-objet dont une dimension externe est à la nano-échelle et dont les deux autres sont significativement plus grandes (ISO/TS 80004-2:2015) (Figure 1, D= 1).

Nanomatériau : matériau ayant une dimension externe à la nano-échelle ou ayant une structure interne ou une structure externe à la nano-échelle (ISO/TS 80004-1:2015).

Nanomatériau manufacturé : nanomatériau produit intentionnellement avec des propriétés ou une composition spécifiques à des fins commerciales (ISO/TS 80004-1:2015).

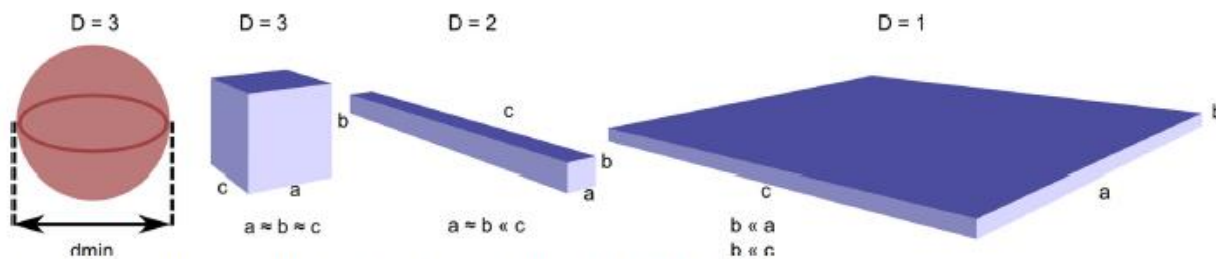


Figure 1 : Typologies classiques de nanomatériaux : nanoparticule (D= 3), nanofibre (D= 2), nanofeuillet (D= 1) (extrait de la référence (Wohlleben *et al.* 2017))

Liste des tableaux

Tableau 1 : Synthèse des caractéristiques des principales méthodes analytiques de caractérisation de la taille et des distributions de tailles 46

Tableau 2 : Synthèse des domaines d'applicabilité des principales méthodes analytiques de caractérisation de la taille et des distributions de tailles 47

Liste des figures

Figure 1 : Typologies classiques de nanomatériaux : nanoparticule (D= 3), nanofibre (D= 2), nanofeuillet (D= 1) (extrait de la référence (Wohlleben *et al.* 2017)) 13

Figure 2 : Concept de particules constitutives (ou particules primaires), d'agglomérats et d'agrégats 20

Figure 3 : Illustration de différentes formes de particules et de paramètres morphologiques (adapté du rapport JRC 2019 sur les termes et concepts clés) 20

Figure 4 : Exemple de résultats inter-techniques pour la caractérisation de la taille de nano-objets dans le cas d'un échantillon de SiO₂ bimodal (deux populations de particules sphériques) : impact de mesurandes différents et de la présence d'agglomérats (adapté de Nanométrie 2018) 23

Figure 5 : Représentation schématique du balayage de la pointe d'un AFM au-dessus d'une nanoparticule sphérique. Le substrat ainsi que sa rugosité sont représentés (source LNE) 29

Figure 6 : Illustration du biais possible pour des mesures de hauteur par AFM lorsque des particules sont agglomérées (source LNE) 29

Figure 7 : Dépendance de la mesure du diamètre hydrodynamique (DM) avec le pH et la charge électrique (potentiel zêta) des nanoparticules (Référence LNE / projet NANOMET) 31

Figure 8 : Représentation schématique du diamètre hydrodynamique comparé au diamètre géométrique déterminé par microscopie électronique 32

Figure 9 : Comparaison de résultats DLS pour des particules d'or dans le cas de trois échantillons monomodaux monodisperses et de leur mélange (adapté d'une référence JRC). 33

Figure 10 : Représentation schématique des différentes étapes nécessaires lors du traitement des données brutes sp ICP-MS 35

Figure 11 : Principe de fonctionnement schématique de la technique A4F 37

Figure 12 : Schéma de principe d'un analyseur à mobilité différentielle (DMA) 42

Figure 13 : Comparaison des résultats de différentes techniques sur des PSL (particules de latex) extrait de (Anderson <i>et al.</i> 2013)	44
Figure 14 : Arbre de décision pour appuyer la classification d'une substance chimique comme nanomatériau ou non, selon la recommandation de définition de la Commission Européenne (extrait traduit du projet européen NanoDefine).....	70

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

L'utilisation croissante des substances à l'état nanoparticulaire dans des secteurs d'activité très variés a conduit les pouvoirs publics à faire évoluer la réglementation nationale et européenne pour prendre en compte leurs spécificités.

La caractéristique dimensionnelle de ces substances, susceptible de conférer aux matériaux des propriétés ou comportements particuliers, laisse également entrevoir de probables différences en matière d'évaluation du risque (toxicité – écotoxicité et devenir dans l'environnement). Cependant, souvent développées pour leurs propriétés spécifiques et considérées comme des vecteurs d'innovation, l'état des connaissances des effets potentiels de ces substances sur l'environnement et la santé demeure généralement insuffisant pour en évaluer les risques (Anses 2014).

En l'absence d'une définition pleinement partagée permettant de définir le périmètre des objets concernés, une première étape vers une meilleure connaissance a consisté à harmoniser le vocabulaire employé (nano-objets, agrégats, agglomérats, nanomatériaux manufacturés, etc.) *via* la normalisation dans un premier temps, puis à établir une définition et des critères permettant de caractériser ces substances tels que leur taille, leur distribution, leur surface spécifique etc.

Au niveau européen, la recommandation du 18 octobre 2011 de la Commission européenne relative à la définition des nanomatériaux (2011/696/UE) a servi de référence à plusieurs reprises dans les différents textes législatifs. Celle-ci s'est appuyée sur les travaux du Scenihp (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) portés sur ce sujet et publiés en 2010.

La Commission européenne avait proposé de s'appuyer sur cette définition pour adapter celle figurant dans le règlement n°1169/2011 relatif à l'information du consommateur sur les denrées alimentaires, notamment en y introduisant le seuil de 50 % de particules en nombre. Cette proposition a été rejetée par le Parlement européen au motif que rien ne justifiait l'introduction d'un tel seuil, inadapté en l'occurrence pour répondre à la demande d'information du consommateur. En conséquence, seule la définition figurant dans le règlement relatif aux nouveaux aliments, à laquelle renvoie le règlement n°1169/2011, s'applique dans le cadre des contrôles opérés par la DGCCRF pour s'assurer de la bonne information du consommateur sur le caractère nanométrique des ingrédients mis en œuvre. Cette définition ne comporte pas de seuil, de sorte qu'un ingrédient est déclaré « nano » dès lors que la présence de nanoparticules est avérée. Dans la pratique, selon la méthodologie de contrôle développée par le Service commun des laboratoires, un ingrédient est considéré correspondre à un nanomatériau lorsque 10 % au moins des particules en présence sont de taille nanométrique.

Actuellement, la définition de « nanomatériau » peut différer d'un règlement européen à l'autre (règlements sur les produits biocides, sur les produits cosmétiques, sur les nouveaux aliments, sur l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, sur les dispositifs médicaux). Les travaux portant sur la révision des annexes du règlement 1907/2006 « Reach » pour l'adapter aux substances sous forme nanoparticulaire ont été publiés en 2018 (Règlement UE 2018/1881). Le projet de texte de ces annexes a été voté par la Commission en comité le 26 avril 2018 et est entré en application le 1^{er} janvier 2020. Le texte se réfère à la recommandation de définition européenne.

Les définitions actuelles proposées dans la recommandation de la Commission de 2011 et dans les différents règlements comportent des différences et des imprécisions (seuil de 50 % en nombre, taille, notions d'insolubilité ou de bio-persistance dans le règlement cosmétique, etc.), régulièrement mises en avant par les parties prenantes. Celles-ci souhaitent l'établissement d'une définition plus claire et harmonisée. La Commission européenne avait annoncé dans plusieurs communications relatives à cette recommandation son intention de la réviser avant décembre 2014 pour mieux prendre en compte les spécificités de ces substances, l'avancée des connaissances et préciser certains points de la définition.

Le Joint Research Center (JRC), service de recherche de la Commission européenne, a publié en 2014 un premier rapport comportant des propositions relatives aux critères pouvant être considérés pour définir les nanomatériaux (JRC 2015).

Après plusieurs phases de discussion engagées dès 2012, la Commission envisage une mise en consultation publique de son projet de définition pour une durée de 14 semaines. Cette révision doit permettre d'obtenir une définition harmonisée qui serait déclinable aux différents secteurs d'activité. La date de publication du projet de définition, initialement prévue à l'été 2018, est inconnue à ce jour. En préparation de cette proposition de définition, le JRC a publié début 2019 un premier document support définissant les termes et concepts utiles liés à la définition (JRC 2019b) ainsi qu'un second rapport relatif cette fois-ci aux techniques analytiques d'identification des nanomatériaux (JRC 2019a). Ce dernier, ayant fait l'objet d'une publication en décembre 2019, soit après la finalisation de cette étude, n'a pas pu être intégré aux corpus de données analysées dans ces travaux.

1.2 Objet de la saisine

Dans la perspective de la mise en consultation publique de la proposition de définition par la Commission européenne, la Direction générale de la santé (DGS), la Direction générale de la prévention des risques (DGPR), la Direction générale de l'alimentation (DGAI), la Direction générale du travail (DGT) et la Direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (DGCCRF) ont saisi l'Anses afin d'élaborer une contribution à cette consultation publique, avant l'échéance qui sera fixée par la Commission.

Afin de mener à bien ce travail, il a été demandé à l'Anses d'effectuer ces travaux en plusieurs phases consistant à :

- 1) réaliser, lors d'une première étape (avant la mise en consultation publique), une revue des connaissances relatives aux méthodes analytiques existantes permettant de déterminer les principaux paramètres de caractérisation des nanomatériaux (principes généraux, avantages et limites notamment du point de vue métrologique) ;
- 2) examiner, sans attendre la formulation définitive, les conséquences des paramètres et seuils de la définition (par exemple taille, proportion en nombre de particules, etc.) sur l'évaluation et la gestion des risques sanitaires associés aux nanomatériaux ;
- 3) évaluer, dans une seconde étape (pendant la consultation publique), l'existence de méthodes de mesures compatibles avec la proposition de définition de la Commission européenne et présenter les adaptations, notamment au regard des aspects sanitaires, qui lui paraîtront nécessaires. Ces éléments d'analyse feront l'objet de la réponse à la consultation publique.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

Afin de répondre à la première phase de cette expertise, objet de ce rapport, l'Anses a confié à 5 experts-rapporteurs, rattachés au comité d'experts spécialisé « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » l'instruction de cette saisine.

Ces experts-rapporteurs ont été nommés le 28 mai 2019, les travaux ayant débuté par une réunion de démarrage (conférence téléphonique), le 18 juin 2019, au cours de laquelle ont été précisés le contexte de ces travaux, les modalités générales de l'expertise à l'Anses et le mode de fonctionnement pour cette expertise (fond documentaire mis à disposition, répartition des tâches et contributions attendues, délais, interactions entre Anses et experts, etc.).

Trois de ces experts-rapporteurs (M. Olivier Aguerre-Chariol, M. Georges Favre et Mme Nathalie Herlin-Boime) ont tout d'abord été chargés de fournir un travail intermédiaire et de transmettre leurs connaissances sur le sujet *via* la rédaction d'un rapport intermédiaire. Des points d'avancement réunissant l'ensemble des experts par téléphone ont été régulièrement effectués (23 juillet 2019, 4 septembre 2019 et 26 septembre 2019).

Les 2 autres experts (M. Niki Baccile et M. Emmanuel Flahaut) ont par la suite été chargés d'effectuer une relecture critique du document ainsi produit et de rédiger à partir de cette base documentaire une version finalisée du rapport, présentée à l'ensemble des experts le 5 novembre 2019 (conférence téléphonique).

Les travaux des rapporteurs ont été présentés aux CES « Agents physiques, nouvelles technologies et grands aménagements » et « Substances chimiques visées par les règlements REACH et CLP » (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques). Le rapport produit par les rapporteurs tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES.

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

1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'agence (www.anses.fr).

2 Généralités

2.1 Paramètres physicochimiques des nanomatériaux

L'évaluation de l'impact des nanomatériaux sur la santé et l'environnement passe par leur caractérisation physico-chimique complète. De nombreuses listes de paramètres physico-chimiques ont été proposées et la réflexion est ici basée en particulier sur celle de l'ISO (ISO/TR 13014), qui a l'avantage de se focaliser sur un nombre restreint (8) de paramètres :

Apparence :

- 1/ Taille des particules / distribution de tailles
- 2/ Forme
- 3/ Surface spécifique

Composition :

- 4/ Composition chimique, structure cristalline et pureté
- 5/ Chimie de surface

Interactions :

- 6/ Charge de surface (charge superficielle)
- 7/ États d'agglomération / agrégation dans le milieu considéré
- 8/ Dispersibilité / solubilité

L'utilité première de la caractérisation de ces paramètres est l'identification correcte du nanomatériau, souvent simplement décrit par sa composition chimique principale (dioxyde de titane, nanotube de carbone, polymère, etc.) en laissant de côté notamment les aspects de tailles, de variations morphologiques ou encore de revêtements/fonctionnalisations de surface. Dans un second temps, ces données de caractérisation permettent d'alimenter une discussion d'évaluation du risque par analogie avec d'autres matériaux pour lesquels des effets sur la santé et l'environnement sont déjà décrits.

L'évolution récente des annexes de Reach, *via* le règlement européen 2018/1881 du 3 décembre 2018, impose désormais aux industriels qui mettent sur le marché des nanoformes de substances chimiques de compléter leurs dossiers d'enregistrement avec des informations sur ces différents paramètres. Cela s'ajoute à d'autres obligations réglementaires (déclaration R-Nano en France, Directive cosmétique, règlement INCO et Novel food relatifs à l'étiquetage des nanomatériaux dans les denrées alimentaires, etc.) requérant toutes de s'adosser à une définition de l'objet nanomatériaux (celle-ci pouvant actuellement différer suivant les réglementations en question). Le préalable à l'application de ces réglementations consiste ainsi à pouvoir déterminer de façon fiable si une substance est à considérer ou pas comme une nanoforme, toutes les techniques d'analyse disponibles sur le marché n'étant pas forcément adaptées, la combinaison de plusieurs étant le plus souvent tout de même nécessaire.

L'objectif de ce document est de décrire les techniques généralement mises en œuvre pour caractériser ces différents paramètres et d'en mettre en évidence les avantages et limitations

respectives. Cette analyse est basée sur plusieurs documents de référence¹ (JRC 2012, NanoDefine 2015) qui dressent un état des lieux complet du sujet, auquel différents cas d'études viennent apporter un éclairage concret de situations pouvant être rencontrées. Des préconisations sont données en fin de document sur les approches à privilégier pour obtenir des données fiables, avec des contre-exemples mettant en évidence la possible non-adéquation de certaines techniques en fonction des caractéristiques physico-chimiques des substances considérées.

Ce document n'est pas destiné à décrire en détail les différentes techniques de caractérisation mises en œuvre, mais seulement à mettre en lumière leurs domaines d'application et leurs limitations respectives, tout en rappelant l'utilité de ces caractérisations pour l'évaluation des risques. Il ne liste pas non plus toutes les méthodes existantes permettant de réaliser la mesure des paramètres considérés mais se limite aux plus couramment rencontrées.

Les différents documents consultés pour réaliser ce rapport recommandent, à juste titre, de coupler plusieurs techniques d'analyse pour fiabiliser l'information et, dans tous les cas, de décrire avec précision les protocoles de préparation des échantillons, les conditions dans lesquelles les mesures sont réalisées (méthode de dispersion dont éventuellement l'ajout de tensioactif, pH, force ionique, composition du milieu de dispersion, température, pression...), et quels sont les modèles / outils utilisés pour le traitement des données, etc.

2.2 Concepts, termes clés et définitions

Un nanomatériau est défini au niveau international dans le document normatif ISO/TS 80004-1 comme un « *matériau ayant une dimension extérieure à la nano-échelle (i.e. approximativement de 1 nm à 100 nm) ou ayant une structure interne ou une structure de surface à la nano-échelle* ». Ce terme générique englobe à la fois les nano-objets et les matériaux nanostructurés (matériaux nanoporeux, nanocomposites...), alors que le cadre réglementaire français (déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire dans le registre R-Nano) et européen (étiquetage, Reach) ne concerne que le cas des nano-objets, leurs agglomérats et agrégats (NOAA), avec des critères additionnels spécifiques selon le secteur et le règlement correspondant (par ex. insolubilité pour le secteur cosmétique, inclusion pour le secteur agro-alimentaire des structures de type agglomérats/agrégats de taille supérieure à 100 nm mais qui conservent des propriétés typiques de la nano-échelle). Par conséquent, nous ne nous intéressons ici qu'aux techniques permettant de caractériser les NOAA (définition du périmètre de ces travaux).

Dans le cas du règlement Reach la définition retenue pour un nanomatériau (on parle de nanoforme dans le règlement Reach) est celle de la recommandation 2011/696/UE, à savoir un « *matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm. [...] Lorsque cela est techniquement faisable et requis en vertu d'une réglementation spécifique, la conformité avec la définition [...] peut être déterminée sur la base de la surface spécifique en volume. Tout matériau est à considérer comme relevant de la définition [...] dès lors qu'il présente une surface spécifique en volume supérieure à 60 m²/cm³.* »

Les différents concepts et termes clés mentionnés dans cette définition sont précisés dans un document récent du JRC (JRC 2019b). Les principaux points à retenir sont les suivants :

- la définition de particules constitutives (ou particules primaires) dont il faut pouvoir mesurer la taille, qu'elles soient isolées ou incorporées à des agglomérats/agrégats, ce qui exclut un

¹ Normes : FD ISO/TR 18196 (2017), FD ISO/TR 19733 (2019), CEN/TS 17010 (2016) et ISO/TS 80004-6 (2013)

certain nombre de techniques d'analyse lorsque les particules sont agglomérées/agrégées (Figure 2) ;

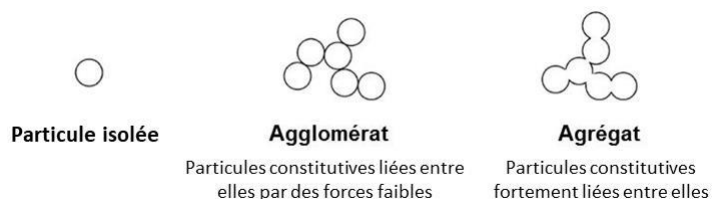


Figure 2 : Concept de particules constitutives (ou particules primaires), d'agglomérats et d'agrégats

- la restriction du champ d'application de la définition aux seules particules solides (au sens « état de la matière » généralement caractérisé par des liaisons covalentes, ioniques ou iono-covalentes, et en opposition aux états liquides ou gazeux), avec comme conséquence d'exclure de façon claire les systèmes dynamiques tels que les micelles ou les gouttes dans des émulsions ;
- la nécessité de pouvoir caractériser les dimensions externes des particules (en opposition à des dimensions internes telles que la porosité par exemple) pour savoir comment classer une substance ;
- la nécessité de devoir accéder à la plus petite dimension des particules, avec en filigrane une discussion sur la notion de dimension dès lors qu'une particule n'est pas sphérique et une mise en garde sur le fait que de nombreuses techniques d'analyse font une hypothèse de sphéricité ;
- la mention que les dimensions externes de particules de forme irrégulière peuvent être évaluées par microscopie électronique au moyen du diamètre de Féret minimum et/ou du diamètre du plus grand cercle inscrit, le diamètre de Féret étant défini comme la valeur moyenne de la distance entre deux tangentes au contour projeté tracées parallèlement à une direction donnée (Figure 3) ;

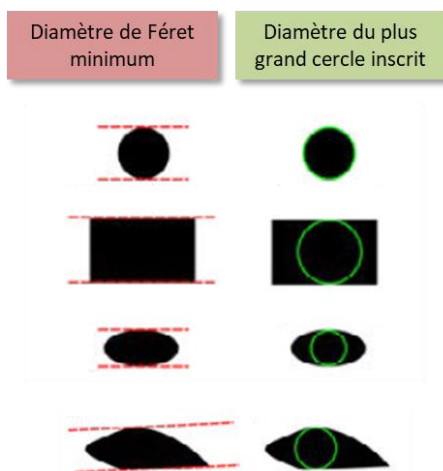


Figure 3 : Illustration de différentes formes de particules et de paramètres morphologiques (adapté du rapport JRC 2019 sur les termes et concepts clés)

- le rappel que la distribution de taille à communiquer est la **distribution de tailles en nombre**, alors que de nombreuses techniques de mesure donnent d'autres types de distributions dont la conversion vers une distribution de tailles en nombre est très souvent entachée de nombreuses incertitudes ;

- la mention que le recours à la **surface spécifique en volume** des particules (VSSA exprimée en m^2/cm^3) peut être un indicateur fiable qu'un matériau est un nanomatériau (si $\text{VSSA} > 60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$), à moins que les particules soient poreuses ou aient une surface rugueuse ;
- la mise en garde que **la réciproque n'est pas vraie**. Un certain nombre de nanomatériaux peuvent avoir une $\text{VSSA} < 60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$.

3 Tailles des particules et distribution de tailles

3.1 Utilité pour l'évaluation des risques

La taille constitue un paramètre critique pour les nanomatériaux, puisque c'est elle qui impacte toute une série de caractéristiques qui imposent de réévaluer le risque par rapport au matériau parent (*bulk*², lorsqu'il existe). Une diminution de la taille des particules peut en effet entraîner des modifications notables des propriétés physicochimiques et des interactions avec le vivant en matière d'effets ((éco)-toxicologie) et de répartition dans les différents compartiments biologiques (toxicocinétique et toxicodynamie, capacités de translocation). L'importance de la taille en ce qui concerne le potentiel toxique d'un nanomatériau est à mettre en relation avec la surface spécifique et la réactivité. En effet, une augmentation de la surface spécifique accessible ainsi que de l'énergie de surface sont à l'origine d'une solubilité accrue et d'une réactivité plus importante.

Par ailleurs, les particules se présentent rarement sous forme, par exemple, d'une poudre composée de particules identiques et de dimensions bien déterminées (distribution monomodale), mais elles constituent plus généralement un ensemble de particules de tailles différentes, ce qui fait de la distribution des tailles un paramètre primordial pour caractériser un nanomatériau.

3.2 Description des principales méthodes de caractérisation

Dans le cas de la caractérisation de la taille et de la distribution de tailles de particules, les techniques d'analyse disponibles peuvent être classées, selon leur mode d'action, en trois catégories :

- les techniques individuelles de comptage (MEB, MET, AFM, sp-ICPMS, TRPS, PTA) ;
- les techniques d'ensemble (DLS, MALS, SAXS) ;
- les techniques séparatives (CLS, A4F, SMPS).

À noter par ailleurs que certaines techniques (microscopie électronique ou à force atomique) vont donner directement accès aux dimensions des particules (techniques directes), alors que pour les autres (techniques indirectes telles que DLS, CLS, TRPS, sp ICP-MS, PTA...) la mesure de la taille est issue d'un modèle ou d'une relation mathématique qui généralement repose sur l'hypothèse d'une morphologie de type sphérique. Le vrai mesurande est dans ces cas-là une propriété de la particule (vitesse de sédimentation, vitesse de diffusion, masse...) à partir de laquelle un diamètre équivalent (*i.e.* le diamètre d'une sphère qui donnerait le même résultat si elle était analysée dans les mêmes conditions que la particule de forme complexe) est calculé. Les mesurandes étant différents d'une technique à l'autre, les résultats obtenus peuvent ainsi être très différents pour un même échantillon, comme cela a pu être montré par différentes comparaisons inter-techniques, dont celle menée dans le cadre du Club nanoMétrologie (NanoMétrologie 2018, Teulon *et al.* 2019) (voir Figure 4). Dans le cas de particules sphériques, diamètre géométrique et diamètre équivalent sont identiques.

² *Bulk* : substance en vrac, matériau massif.

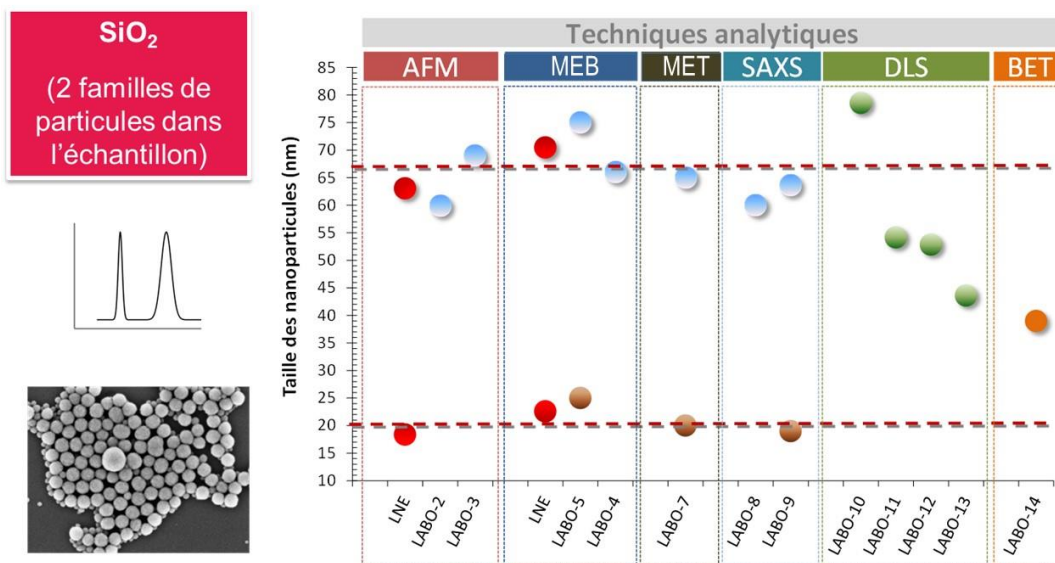


Figure 4 : Exemple de résultats inter-techniques pour la caractérisation de la taille de nano-objets dans le cas d'un échantillon de SiO₂ bimodal (deux populations de particules sphériques) : impact de mesurandes différents et de la présence d'agglomérats (adapté de Nanométrie 2018)

3.2.1 Microscopie électronique à balayage (MEB)

3.2.1.1 Fonctionnement

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une méthode d'observation directe qui permet d'observer la surface d'objets dont les dimensions varient entre quelques nanomètres et plusieurs millimètres, avec une grande profondeur de champ.

► Principe physique

Dans cette technique, un faisceau d'électrons est produit, accéléré par une tension élevée, focalisé et balayé sur la surface de l'échantillon. À chaque point balayé de la surface, l'interaction entre les électrons et l'échantillon produit des signaux spécifiques, grâce auxquels l'imagerie en électrons secondaires donne une représentation de la morphologie de surface, l'imagerie en électrons rétrodiffusés donne des informations sur la composition chimique locale, et les photons X émis peuvent être utilisés pour obtenir des informations sur la composition chimique locale. Les MEB peuvent également fonctionner en mode transmission pour faciliter la mesure de la taille et de la forme. Lorsque les électrons sont générés par un canon à émission de champ, ils bénéficient d'une meilleure collimation et brillance, ce qui est à l'avantage de la résolution, et peut permettre d'atteindre des grandissements de l'ordre de 100 000 fois, alors qu'un MEB classique atteint difficilement des grandissements de 50 000.

► Préparation des échantillons

Les échantillons sont généralement observés sous vide, sous forme sèche après dépôt sur un substrat dédié. Une quantité de quelque mg, voir centaine de µg, suffit amplement pour la mesure. Il existe des microscopes dits « environnementaux » capables de travailler sur des matériaux humides ou congelés (cryo) mais ils sont beaucoup moins accessibles et ne sont donc pas utilisés en routine. Idéalement, les nano-objets devraient être séparés les uns des autres et distribués en quantité suffisante, de façon relativement homogène sur le support. Le protocole de dispersion et de dépôt des particules (si on passe par une suspension) doit être adapté (choix du milieu dispersant, pH, ajouts éventuels de dispersants, choix des substrats de dépôts, conditions de séchage, etc.).

► Analyse et exploitation des données brutes

Il est conseillé de mettre en œuvre des tensions d'accélération relativement réduites (quelques kV) pour réaliser les images de NOAAs. L'analyse automatique d'image peut être utilisée. En imagerie par électrons secondaires, qui donne la meilleure résolution spatiale, la détermination du niveau de seuillage de l'image n'est pas triviale et dépend du numéro atomique de l'objet, ainsi que de l'orientation locale de la surface par rapport au faisceau électronique.

3.2.1.2 Particularités et limites techniques

► Données accessibles

La microscopie électronique à balayage permet d'observer des objets dont les dimensions latérales varient entre quelques nanomètres et plusieurs millimètres, avec une bonne profondeur de champ. La meilleure résolution possible est comprise entre 1 nm et 5 nm, en fonction de l'instrument utilisé. Elle peut être insuffisante pour distinguer les très petites particules (< 10 nm). L'image MEB ne donne cependant aucune information sur la hauteur des objets observés, puisque le long de l'axe Z seule une information de contraste est disponible.

La MEB permet une différenciation entre les particules primaires isolées et celles constituant des agrégats et des agglomérats. Elle constitue une technique individuelle de comptage et permet ainsi la détermination de distributions granulométriques en nombre. Elle donne accès à la morphologie des particules. On peut noter que la MEB permet l'accès simultané à la forme, à la taille et à la nature chimique, le plus souvent par analyse dispersive en énergie.

► Types d'échantillons analysables

La MEB est limitée à l'examen d'échantillons non sensibles au vide et/ou à l'action du faisceau d'électrons.

Cette méthode est particulièrement adaptée à l'analyse d'échantillons initialement secs (poudres ou matériaux plus massifs), puisque permettant une observation directe des nanomatériaux. Des préparations complémentaires peuvent être nécessaires pour des matériaux isolants (métallisation). Dans le cas de nanomatériaux initialement en suspension, la nécessité de sécher provoque la plupart du temps une agglomération au séchage et l'état d'agrégation ou d'agglomération observé *in fine* est ainsi forcément différent de l'état du matériau initial.

L'accès à une taille de l'ordre de quelques nanomètres avec une résolution suffisante pour évaluer la forme et la dimension nécessite l'utilisation d'un MEB couplé à un canon à émission de champs.

► Autres particularités

La MEB est une technique robuste, mais il existe tout de même des biais possibles. Il convient d'ajuster soigneusement la quantité de particules déposées sur les supports pour en obtenir une quantité suffisamment faible, afin que l'examen et le mesurage des particules individuelles soient possibles. Dans le cas de particules bidimensionnelles (plaquettes, disques...), l'évaluation de la troisième dimension (hauteur) peut être problématique car ces particules ont tendance à se déposer à plat sur les supports. Des échantillons très polydispersés (gamme de tailles très étendue de quelques nanomètres à quelques micromètres) seront difficilement analysables par MEB pour obtenir une distribution des tailles.

Afin d'obtenir une bonne statistique de comptage, il est nécessaire, comme pour toute analyse par imagerie directe, de collecter une quantité importante d'images et d'effectuer l'analyse des objets image par image, un processus très lent. Ils existent des logiciels gratuits de traitement d'image mis à disposition pour la communauté (par exemple, ImageJ) mais l'analyse d'images automatisée n'est pas encore réellement possible dans les cas complexes (particules superposées les unes aux autres, discrimination de particules primaires au sein d'agrégats ou d'agglomérats, prise en compte de particules imagées de façon partielle).

3.2.1.3 Normes associées et documents de référence principaux

NF ISO 19749:2019 Nanotechnologies – Détermination de la taille et de la distribution en taille des nano-objets par microscopie électronique à balayage.

ISO/TS 10798:2011 Nanotechnologies – Caractérisation des nanotubes de carbone à simple paroi par microscopie électronique à balayage et spectroscopie à dispersion d'énergie.

3.2.1.4 Accessibilité et coûts

Les MEB sont des instruments très répandus sur le territoire national (plusieurs centaines d'instruments). Le coût de l'instrument varie entre environ 150 k€ et environ 400 k€. Les MEB équipés de canons à émission de champ sont les plus onéreux mais possèdent une résolution qui peut atteindre 1-2 nm, ce qui est essentiel dans le domaine des nanomatériaux. Le coût d'une analyse incluant la détermination d'une distribution granulométrique en nombre se situe dans la gamme 1-3 k€ selon la complexité de l'échantillon. La mise en œuvre de la MEB nécessite un niveau de compétences intermédiaire.

3.2.2 Microscopie électronique à transmission (MET)

3.2.2.1 Fonctionnement

► Principe physique

La MET est une méthode d'observation directe qui permet de visualiser la morphologie et la structure interne d'un échantillon avec une résolution de l'ordre du dixième de nanomètre. Le microscope électronique à transmission émet un faisceau d'électrons, qui traverse l'échantillon et qui est récupéré par une caméra numérique, située en dessous de l'échantillon même. Ceci impose que les échantillons soient donc suffisamment fins (l'épaisseur doit typiquement être inférieure au micron) pour que l'on puisse observer des détails internes (par exemple, des particules individuelles au sein d'un agrégat tridimensionnel).

► Préparation des échantillons

Il est important de mettre en place une préparation d'échantillon permettant de limiter au maximum le phénomène d'agglomération. Contrairement au MEB, et dans le cas des nanomatériaux, les échantillons doivent le plus souvent être préparés à partir de suspensions dans un solvant suffisamment volatil, le plus souvent de l'eau ou de l'éthanol. Par exemple, les nano-objets constitués d'oxydes métalliques possèdent fréquemment un caractère hydrophile dû à la présence de groupes hydroxyles sur la surface. Dans ce cas, l'eau ou un mélange eau/éthanol est souvent un bon milieu de dispersion. À l'inverse, les nanotubes de carbone (NTC) sont fortement hydrophobes et se dispersent mieux dans des solvants non polaires. La suspension doit être relativement diluée et dispersée aux ultrasons pour éviter au mieux l'agglomération lors du séchage. L'hydrophilisation des membranes de carbone qui servent de support est fortement recommandée pour limiter cet artefact dans le cas de suspensions préparées en phase aqueuse (Tsuji 1993). Elle est facilement obtenue au moyen d'un appareillage de décharge plasma qui peut fixer temporairement des charges électriques sur les supports. Il convient d'évaporer complètement le solvant avant analyse. À noter que les nanofibres très longues comme les nanotubes de carbone peuvent par ailleurs être difficiles à séparer en particules individuelles, car elles sont souvent imbriquées dans des agglomérats complexes.

► Analyse et exploitation des données brutes

L'analyse se fait à partir d'images enregistrées à l'aide d'une caméra numérique pour les instruments les plus récents. L'analyse se fait de manière individuelle image par image, particule par particule. Certains logiciels d'analyse d'images fournis par les constructeurs donnent accès aux distributions géométriques de forme ou de taille pondérées en nombre (exprimées en diamètre de sphère équivalente ou en divers paramètres dimensionnels comme la longueur, la largeur, les diamètres de Féret, le périmètre et la surface projetée). Cela requiert généralement l'identification

de l'objet et sa séparation par rapport à l'arrière-plan au moyen de seuils d'intensité appliqués à une image en niveaux de gris. Il est possible d'obtenir également des distributions de formes, par exemple en mesurant le rapport d'aspect individuel des NOAA (longueur divisée par largeur). L'automatisation de ce processus peut avoir lieu à l'aide de logiciels spécifiques (fourni par les constructeurs ou mis à disposition en accès libre, par exemple ImageJ) si les objets sont bien dispersés sur la grille d'analyse et avec un contraste suffisant par rapport au fond de l'image.

3.2.2.2 Particularités et limites techniques

► **Données accessibles**

La MET permet d'observer des objets dont les dimensions varient généralement entre le dixième de nanomètre et plusieurs dizaines de microns, avec une profondeur de champ très faible. Il est adapté pour des observations à très fort grandissement allant jusqu'à 500 000 fois (détermination du nombre de parois des NTC par exemple). La MET permet, en principe, une différenciation entre les particules primaires et celles constituant des agrégats et des agglomérats. Les distributions de tailles en nombre peuvent être obtenues au moyen d'une analyse d'images obtenues en MET, avec certaines limites et restrictions. En particulier, il est habituellement délicat d'obtenir par traitement automatique des images des distributions de tailles distinctes pour les nano-objets et leurs agglomérats et agrégats, les particules primaires étant très difficiles à isoler dans un agrégat ou un agglomérat avec les critères utilisés par les logiciels. De faibles concentrations peuvent en effet limiter les statistiques de comptage tandis que des concentrations élevées peuvent nuire au comptage en lui-même, des objets se chevauchant pouvant être considérés par le logiciel comme une particule unique.

Dans le cas de particules bidimensionnelles (plaquettes, disques, etc.), l'évaluation de la troisième dimension (hauteur) peut être problématique car ces particules ont tendance à se déposer à plat sur les supports.

Des échantillons très polydisperses (gamme de tailles très étendue, de quelques nanomètres à quelques micromètres) seront difficilement analysables par MET pour obtenir une distribution des tailles.

On peut noter que la MET permet l'accès simultané à la forme, à la taille et à la nature chimique, le plus souvent par analyse dispersive en énergie (EDS) ou spectroscopie de perte d'énergie des électrons (EELS).

► **Types d'échantillons analysables**

La MET est limitée à l'examen d'échantillons non sensibles au vide et/ou à l'action du faisceau d'électrons. La quantité minimale nécessaire d'échantillon est très faible (de l'ordre du milligramme, voire moins, en poids sec). Tout échantillon peut être analysé à partir du moment où il est possible de le disperser dans un solvant volatil. Il est le plus souvent nécessaire d'appliquer une étape de sonication.

► **Autres particularités**

Dans le cas de nanomatériaux initialement en suspension, ou à l'état de poudres remises en suspension, la nécessité de sécher l'échantillon analysé provoque une agglomération au séchage et l'état d'agglomération observé *in fine* est ainsi forcément différent de l'état du matériau initial, même si l'hydrophilisation préalable du support limite cet effet. Pour pallier ce biais, il existe une approche connue sous le nom de cryomicroscopie en transmission (Cryo-MET), qui permet d'éviter toute modification de l'état de dispersion lors de l'examen en MET, puisque la dispersion est examinée sans aucun séchage. Dans cette technique, quelques microlitres de la dispersion sont déposés sur une grille de MET préalablement recouverte d'une membrane support percée de trous (de quelques micromètres de diamètre). Par action d'un absorbant, l'épaisseur du film liquide est réduite de l'ordre du micromètre, puis l'ensemble est très rapidement congelé par plongée dans un fluide cryogénique (en général l'éthane liquide). Ceci a pour effet de vitrifier instantanément le film liquide, donc de bloquer tout mouvement ultérieur éventuel de particules au

sein de ce film. On accède ainsi à l'état naturel de la dispersion, en matière de répartition des particules individuelles entre particules isolées, agrégats et agglomérats. La technique comporte également l'avantage significatif de préserver des objets fragiles détruits par le faisceau d'électrons ou le séchage (structures organisées de tensio-actifs, nanoparticules organiques, complexes d'ADN, etc.). Après vitrification, les grilles sont transférées sur un porte-objet refroidi qui permet l'observation en MET. Par contre, les plus gros objets (supérieurs au micromètre) sont exclus de l'examen puisqu'ils sont trop gros pour loger dans l'épaisseur des films vitrifiés observables.

Le principe du MET étant celui de projeter un objet 3D sur un plan, le problème récurrent consiste à remonter à une forme 3D à partir d'un objet 2D. Notamment, un objet 2D (plaquette) peut être confondu avec une fibre (1D) lorsque le premier se dépose sur les côtés.

L'analyse d'images automatisée n'est pas encore réellement possible dans les cas complexes (particules superposées les unes aux autres, discrimination de particules primaires au sein d'agrégats ou d'agglomérats).

3.2.2.3 Normes associées et documents de référence principaux

NF ISO 21363:2019 Nanotechnologies – Détermination de la distribution de taille et de forme des particules par microscopie électronique à transmission.

3.2.2.4 Accessibilité et coûts

Les MET sont des instruments assez répandus sur le territoire national (plusieurs centaines d'instruments). Il existe notamment plusieurs plateformes universitaires proposant un accès à ce type d'instrument. Plusieurs laboratoires prestataires d'analyse sont également équipés. Les laboratoires expérimentés en cryo-MET sont très peu nombreux (moins d'une dizaine sur le territoire), car le niveau de compétence requis est très élevé.

Cependant peu de MET sont finalement utilisés pour caractériser des NOAA, une grande partie de ces instruments étant surtout utilisés dans le domaine de la biologie ou des semi-conducteurs. Les compétences spécifiques requises pour la préparation d'échantillons de NOAA et le traitement des données ne sont pas toujours disponibles. Le coût de l'instrument varie entre environ 300 k€ et environ 1 000 k€. Les MET les moins onéreux ont déjà des performances suffisantes pour caractériser des NOAA dans la gamme 1 nm – quelques micromètres. Le coût d'une analyse incluant la détermination d'une distribution granulométrique en nombre se situe dans la gamme 1-3 k€ selon la complexité de l'échantillon.

3.2.3 Microscopie à force atomique (AFM)

3.2.3.1 Fonctionnement

► Principe physique

L'AFM est une méthode d'observation directe qui permet d'observer la surface et la hauteur d'objets déposés sur une surface. Le principe de la microscopie à force atomique consiste à balayer la surface de l'échantillon à étudier grâce à une pointe très fine (généralement en silicium, avec un rayon de courbure compris entre 5 nm et 10 nm) fixée sur un levier. La pointe peut se déplacer grâce à un dispositif piézo-électrique dans les trois directions de l'espace X, Y et Z. Les interactions (ex : forces de Van der Waals) qui s'exercent entre la pointe et la surface permettent de mesurer les variations de la topographie. Ces interactions donnent lieu à des déflexions du levier, détectées par un système constitué d'une diode laser et d'un détecteur quatre quadrants. Selon les instruments utilisés, les mesures sont réalisables aussi bien à l'air ambiant que sous vide ou en milieu liquide.

Il existe 3 modes de fonctionnement :

- le mode contact : la pointe AFM est amenée au contact de l'échantillon à analyser et sonde un champ de forces généralement répulsif (interactions coulombiennes). Il s'agit d'un mode de mesure des déflexions statiques du levier dont la position est définie par un équilibre entre la force d'appui et les forces d'interaction. En mode contact, la pointe a tendance à adhérer ou à endommager la surface de nombreux matériaux sous l'action des forces d'attraction dues aux couches adsorbées à l'état liquide ;
- le mode non contact : la pointe AFM sonde le champ de forces attractives à distance de la surface (forces de Van der Waals par ex.) dont l'amplitude est beaucoup plus faible qu'au contact des échantillons. Dans ce mode, la pointe est maintenue en oscillation à sa fréquence de résonance. À l'approche de la surface, les conditions d'interaction modifient la fréquence d'oscillation. L'étude de ces variations de fréquence permet de remonter à la topographie de l'échantillon;
- le mode intermittent ou *tapping* : ce mode est intermédiaire entre le mode contact et le mode non-contact. La pointe est maintenue en oscillation à une fréquence proche de sa fréquence de résonance et à une distance proche de l'amplitude d'oscillation. De cette façon, la pointe entre ponctuellement dans le régime répulsif. Les avantages de ce mode résident dans le fait que la sensibilité est proche du mode contact mais avec une interaction moins forte qui empêche le déplacement des nanoparticules durant le balayage.

► Préparation des échantillons

L'obtention de résultats fiables demande une grande maîtrise de l'étape de préparation des échantillons, que cela soit dans le choix du substrat (qui doit être le moins rugueux possible) ou le dépôt en lui-même qui doit minimiser la présence d'agglomérats, tout en ayant suffisamment de particules isolées présentes sur le substrat.

► Analyse et exploitation des données brutes

Le comptage de nano-objets et la détermination de leur taille par AFM est un travail long et fastidieux. Il existe des logiciels de traitement d'images capables de réaliser des comptages automatiques et des déterminations de taille, mais ces programmes peuvent induire de nombreuses erreurs (mauvais redressement de l'image de topographie nécessaire pour supprimer l'inclinaison due aux dérives thermiques ou au mauvais positionnement de l'échantillon puis comptage en lui-même). Les logiciels de traitement d'images AFM sont peu répandus et généralement onéreux, car le traitement d'images AFM nécessite des corrections spécifiques par rapport aux images obtenues par les autres techniques d'imagerie.

3.2.3.2 Particularités et limites techniques

► Données accessibles

L'AFM permet d'observer des objets pour une gamme de tailles accessibles comprises entre 1 nm et 1 µm. L'AFM fournit des distributions de tailles en nombre, et la mesure des hauteurs est très précise, avec une résolution inférieure au nanomètre. Pour cette raison, l'AFM constitue une méthode de choix pour la mesure de la hauteur des échantillons 2D. Dans le cas de particules agrégées ou agglomérées, l'AFM mesure la taille des agrégats/agglomérats.

► Types d'échantillons analysables

L'image est dépendante de la géométrie de la pointe mise en œuvre (artéfacts). Les particules constituant l'échantillon doivent adhérer fermement au support et être bien dispersées sur sa surface. L'AFM apparaît comme la seule technique permettant d'accéder à la plus petite dimension des nano-objets dès lors qu'ils sont de type nanofeuillets ou nanoplaquettes.

L'échantillon doit donc être mis en suspension aqueuse préalablement à son examen en AFM. Comme en MET, les quantités nécessaires peuvent être très faibles (de l'ordre du milligramme, voire moins).

► Autres particularités

Un biais instrumental affecte généralement les mesures latérales (plan XY parallèle au substrat). Elles sont peu précises et dépendent directement de la géométrie de la pointe (élargissement des motifs observés dû à un problème de convolution pointe/objet, comme illustré sur la Figure 5) et de l'état d'agglomération/agrégation (

Figure 6). Ce dernier point peut s'améliorer par une amélioration de la technique de dispersion de l'échantillon sur le substrat.

Compte tenu du temps d'analyse élevé associé à la technique du fait des vitesses de balayage limitées, les statistiques de comptage sont relativement limitées. À noter que la très bonne résolution des AFM selon l'axe Z fait que cette technique apparaît complémentaire à la microscopie électronique (Crouzier *et al.* 2019, Delvallée 2014). La nature chimique n'est pas accessible par AFM.

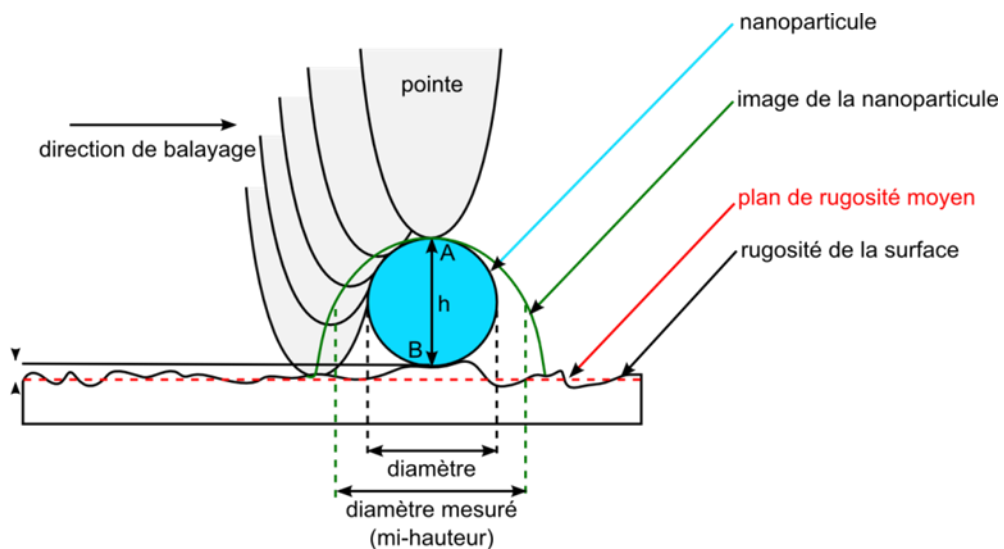


Figure 5 : Représentation schématique du balayage de la pointe d'un AFM au-dessus d'une nanoparticule sphérique. Le substrat ainsi que sa rugosité sont représentés (source LNE)

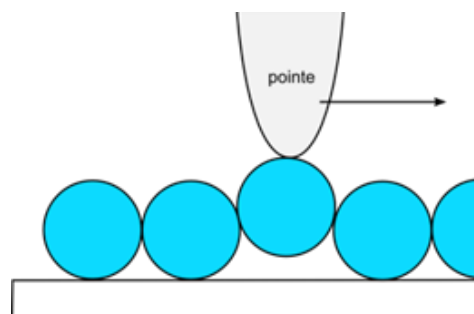


Figure 6 : Illustration du biais possible pour des mesures de hauteur par AFM lorsque des particules sont agglomérées (source LNE)

3.2.3.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO 11952:2014 - Analyse chimique des surfaces -- Microscopie à sonde à balayage -- Détermination des quantités géométriques en utilisant des microscopes à sonde à balayage: Étalonnage des systèmes de mesure.

ISO 13095:2014 - Analyse chimique des surfaces - Microscopie à balayage de sonde - Procédure pour la caractérisation *in situ* des sondes AFM utilisées pour mesurer la nanostructure.

3.2.3.4 Accessibilité et coûts

Le coût d'un AFM en configuration standard est de l'ordre de 150 k€. Une bonne dizaine de fournisseurs existent sur le marché ; cependant, cette technique n'est pas encore très répandue en milieu industriel (un peu plus en milieu universitaire). Le niveau de compétences requis est élevé.

3.2.4 Diffusion dynamique de lumière (DLS)

3.2.4.1 Fonctionnement

► Principe physique

La DLS est une technique d'analyse indirecte qui permet de déterminer un rayon hydrodynamique à partir de la mesure d'un coefficient de diffusion *via* la relation de Stokes-Einstein. Dans un liquide, le mouvement brownien des objets dispersés entraîne des fluctuations temporelles de la concentration en nombre locale. Ces fluctuations entraînent des fluctuations de la lumière diffusée. Les grandes particules ont des mouvements browniens lents et diffusent la lumière à de faibles angles et de hautes intensités. À l'inverse, les petites particules aux mouvements browniens rapides diffusent la lumière à des angles importants et à de faibles intensités. La détermination de la fonction d'autocorrélation de la lumière diffusée à un angle donné (mesurande spécifique) permet donc la détermination de la distribution du coefficient de diffusion des objets dispersés. Le coefficient de diffusion est converti en diamètre hydrodynamique si la température et la viscosité du milieu de dispersion sont connues. Il convient de noter que les objets sont supposés être sphériques, donc les incertitudes augmentent pour les objets non sphériques. En tenant compte de tous ces aspects, une distribution granulométrique pondérée en intensité diffusée peut être déterminée et ensuite convertie en distribution granulométrique pondérée en volume (mesurande générique).

► Préparation des échantillons

L'étape de préparation des échantillons est primordiale pour limiter au maximum les phénomènes d'agglomération des particules. En dispersion aqueuse, la tendance à l'agglomération est d'autant plus faible que la valeur du pH est éloignée du point isoélectrique, qui est une valeur de pH pour laquelle le bilan des charges électriques en surface des particules est neutre, ce qui supprime les forces de répulsion électrostatiques. Si l'on ne connaît pas la valeur du point isoélectrique pour la substance et dans le milieu dispersant considérés, il faut, préalablement à la mesure, procéder à une étude en deux temps, la première étape consistant à réaliser une courbe en dilution visant à identifier le facteur de dilution optimal (milieu assez dilué), la deuxième étape étant de faire une courbe potentiel zêta/pH permettant d'identifier la zone de stabilité pour les mesures DLS (répulsion des particules, voir Figure 7). Le projet NANOMET³ a permis de fiabiliser cette approche et de donner les protocoles associés. L'utilisation d'ultrasons est également couramment rencontrée dans cette optique. Les ultrasons peuvent être générés par une cuve à ultrasons ou une sonde à ultrasons plongée directement dans le milieu à disperser (contrairement aux cuves) ; dans ce dernier cas, la puissance est généralement bien supérieure (quelques centaines de watts), mais la présence de la sonde directement dans le milieu à analyser peut générer des

³ <https://nanomet.lne.fr/>

particules de titane provenant de l'érosion progressive de la sonde et conduire à la contamination de l'échantillon. Une alternative permettant de disposer d'une haute puissance de sonication sans contamination est, par exemple, un dispositif de type *cup horn* qui est refroidi par circulation d'une eau régulée en température.

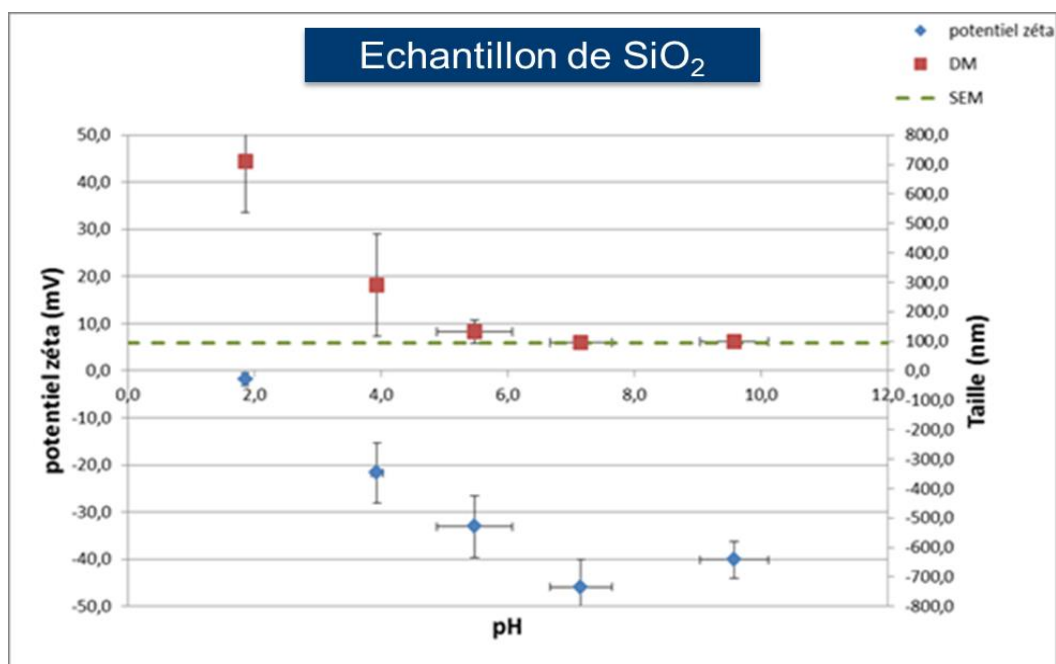


Figure 7 : Dépendance de la mesure du diamètre hydrodynamique (DM) avec le pH et la charge électrique (potentiel zêta) des nanoparticules (Référence LNE / projet NANOMET)

► Analyse et exploitation des données brutes

Les données brutes consistent en la mesure de l'intensité diffusée en fonction du temps. L'utilisation de logiciels généralement intégrés à la machine permet d'obtenir immédiatement un profil d'autocorrélation de l'intensité diffusée dans le temps à partir duquel le coefficient de diffusion est automatiquement extrait et utilisé pour le calcul des profils de distribution de taille en intensité.

En revanche, l'exploitation et l'analyse des données demande une expertise relativement importante du fait des limitations développées ci-après, notamment celles liées à la polydispersité⁴ des échantillons, au manque de stabilité des échantillons (par exemple par sédimentation pendant la mesure), ou encore à l'absorption du laser ou à une concentration trop faible ou trop forte.

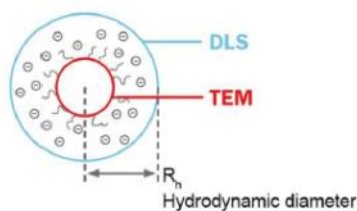
3.2.4.2 Particularités et limites techniques

► Données accessibles

La plage de tailles s'étend approximativement de quelques nm à 1 µm. À la différence du diamètre mesuré par microscopie électronique, qui ne représente que la partie de la particule ayant un fort contraste électronique, le diamètre mesuré est un diamètre hydrodynamique qui inclut la double-couche de molécules d'eau polarisées associées à la surface (*cf.* Figure 8). Ce diamètre est par ailleurs celui des agrégats ou agglomérats s'ils sont présents : la DLS ne permet ainsi pas

⁴ La polydispersité est la propriété d'avoir de nombreux composants non identiques dans la phase dispersée d'un système colloïdal. La variation d'un composant (par exemple une particule) au suivant peut être l'un des nombreux paramètres qui la caractérise, tels que la taille, la forme, la charge, la densité, etc.

d'accéder à la taille des particules primaires, dès lors que des phénomènes d'agrégation ou d'agglomération sont présents (ce qui est très souvent le cas).



*Le diamètre hydrodynamique =
diamètre géométrique de la particule +
couche ionique qui entoure sa surface*

Figure 8 : Représentation schématique du diamètre hydrodynamique comparé au diamètre géométrique déterminé par microscopie électronique

► Types d'échantillons analysables

Les nanomatériaux sont analysés en suspension dans un liquide transparent. La concentration doit ainsi être suffisamment faible pour ne pas obscurcir le faisceau laser (ce qui limite la gamme de concentration dans laquelle on peut travailler, en particulier pour les nanomatériaux carbonés (noirs) qui forment des suspensions opaques même à très faible concentration). À noter que certains instruments commencent à être développés pour pallier cette limitation. La quantité nécessaire d'échantillon est donc très faible (quelques milligrammes, voire moins).

L'indice de réfraction des particules, ainsi que la densité et le coefficient d'absorption du milieu doivent être connus précisément si on veut remonter à une distribution granulométrique en volume ou en nombre.

Enfin, dans le cas de mélanges de plusieurs substances, cette technique n'est pas adaptée car elle ne permet pas une identification chimique des particules.

► Autres particularités

Cette technique donne de très bons résultats, cohérents avec ceux fournis par la microscopie électronique, dès lors que les échantillons sont monomodaux (une seule population de particules), relativement monodispersés (distribution de taille étroite) et les particules proches de la sphéricité. Des échantillons polydispersés produisent des signaux optiques superposés et une déconvolution du signal est nécessaire pour déterminer les tailles et les distributions de tailles (voir exemple en Figure 9). Une grande polydispersité entraîne une sous-estimation de la contribution des plus petits objets, puisque leur faible signal de lumière diffusée est masqué par un signal très intense provenant des plus gros objets. En effet, l'intensité de diffusion est proportionnelle à l'inverse du diamètre de l'objet à la puissance 6. La résolution en taille est par ailleurs modeste : par exemple, les 2 modes d'une distribution bimodale peuvent ne pas être discriminés s'ils sont relativement proches.

Les modèles d'analyse courants sont valables uniquement dans le cas de particules sphériques. Tout écart (particules aciculaires ou présentant un facteur de forme important) conduit à une erreur importante (par exemple, cette méthode est tout à fait inadaptée dans le cas des NTC). Le choix du modèle de traitement de données à utiliser (Cumulants, Contin, NNLS) dépend par ailleurs de l'indice de polydispersité de l'échantillon (PDI), sous peine de fausser les résultats (Takahashi *et al.* 2019).

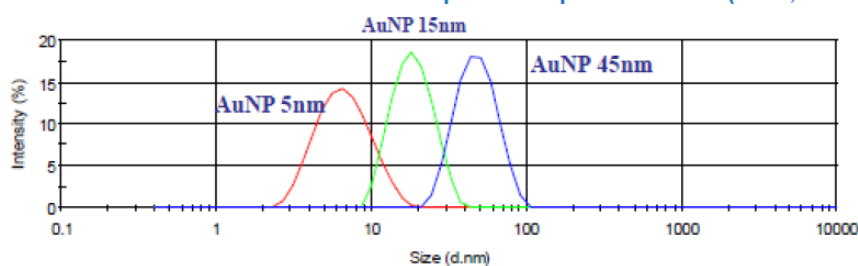
La dispersion aux ultrasons conduit à un échauffement de la suspension, qui peut localement être très important. Cette dispersion peut conduire à désagglomérer les nano-objets (ce qui est utile pour accéder aux particules primaires), mais peut aussi les casser dans le cas des NTC. Dans ces

cas plus rares et pour des durées de traitement prolongées, une réagglomération est aussi possible. La sédimentation avant le prélèvement et/ou dans la cellule de mesure pendant la mesure va inévitablement modifier la répartition granulométrique obtenue.

La stabilité est un paramètre important et la modification du pH de la solution va par ailleurs très souvent impacter l'attraction des particules entre elles et donc la taille des agglomérats présents, d'où l'importance d'identifier le pH de travail optimal *via* la réalisation, en amont de la mesure, d'une courbe potentiel zêta / pH.

L'utilisation des courbes d'autocorrélation doit parfois accompagner l'analyse des profils de distributions en taille, qui peuvent présenter des écarts importants d'une expérience à l'autre effectuées sur le même échantillon, dans les mêmes conditions et à distance de quelques minutes seulement.

Mesures DLS individuelles sur 3 échantillons monodisperses de particules d'or (5 nm, 15 nm et 45 nm)



Mesures DLS d'un mélange de particules d'or (ratio 350:15:1 - 5 nm, 15 nm, et 45 nm)

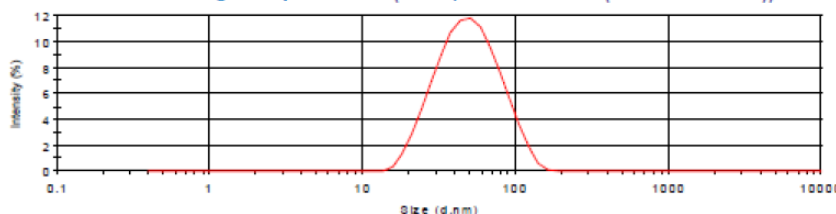


Figure 9 : Comparaison de résultats DLS pour des particules d'or dans le cas de trois échantillons monomodaux monodisperses et de leur mélange (adapté d'une référence JRC).

3.2.4.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO 22412:2017 Analyse granulométrique - Dispersion lumineuse dynamique (DLD).

ASTM E2490-09, *Standard guide for measurement of particle size distribution of nanomaterials in suspension by Photon Correlation Spectroscopy (PCS)*.

ISO 21501-2:2007, Détermination de la distribution granulométrique - Méthodes d'interaction lumineuse de particules uniques - Partie 2 : Compteur de particules en suspension dans un liquide par diffusion de la lumière.

3.2.4.4 Accessibilité et coûts

Le coût de l'appareillage, modeste (de l'ordre de 50 k€), fait que cette technique est très répandue dans les laboratoires, qu'ils soient industriels ou académiques. L'analyse est rapide pour un coût relativement faible (autour de 200-300 €), cependant la réalisation d'une étude complète (identification du bon facteur de dilution et du pH optimal), pourtant nécessaire à la minimisation des erreurs, n'est que rarement réalisée compte tenu du surcoût associé. Le niveau de compétences requis est intermédiaire.

3.2.5 Analyse de particules individuelles par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (sp-ICPMS)

3.2.5.1 Fonctionnement

► Principe physique

La méthode de spectrométrie de masse à plasma induit en mode comptage individuel (sp-ICPMS) est une méthode d'analyse individuelle indirecte, qui permet de détecter les nanoparticules à des niveaux inférieurs au ng.L⁻¹. Le principe de la sp ICP-MS consiste à réduire suffisamment la fenêtre temporelle d'acquisition du signal ICP-MS pour un élément particulier (par exemple Ti dans le cas du TiO₂) afin d'être en capacité de détecter les pics d'intensité correspondant au passage des particules uniques. Si les nanoparticules sont introduites dans le système ICP-MS, elles produisent un nuage d'ions dans le plasma. Quand l'échantillon est suffisamment dilué et que des temps d'intégration courts sont utilisés (*dwell times < 10 ms*), chaque nuage discret d'ions provient d'une seule particule et peut être détecté comme un « *Single Particle Event* » (SPE). Dans ces conditions, la fréquence des SPEs est directement liée à la concentration de nanoparticules dans la solution aqueuse et l'intensité de chaque SPE est proportionnelle à la masse de l'élément dans la nanoparticule détectée et donc à son diamètre à la troisième puissance (avec la supposition d'une géométrie sphérique de la nanoparticule). Le dénombrement des pics permet ainsi de compter les particules, alors que leur intensité est directement proportionnelle au nombre d'atomes que les particules contiennent et permet de remonter à une taille, sous certaines hypothèses.

► Préparation des échantillons

L'échantillon doit être très dilué pour qu'en principe une seule particule à la fois puisse être atomisée, ionisée puis analysée par un spectromètre de masse calé sur un rapport masse/charge défini. On obtient ainsi des distributions de tailles en nombre résolues chimiquement (élément par élément), ce qui fait que cette technique a l'avantage de pouvoir être utilisée dans le cas de mélanges de plusieurs substances. La concentration de l'élément et la distribution de taille peuvent être obtenues simultanément.

► Analyse et exploitation des données brutes

Le traitement des données sp ICP-MS est relativement lourd, compte tenu de la grande quantité de données brutes générées. Le RIKILT (laboratoire Néerlandais) a développé une feuille Excel permettant de produire la plupart des caractéristiques d'intérêt (concentration de particules, diamètre, etc.)⁵. De continues modifications y sont apportées par différentes équipes de recherche pour améliorer la qualité des résultats. De leur côté, les instruments commercialisés ces dernières années intègrent des logiciels pour traiter automatiquement les données brutes générées par l'ICP-MS. Cependant, ces logiciels fonctionnent à ce jour comme des « boîtes noires », les hypothèses faites par les différents fournisseurs pour traiter les données n'étant pas toujours les mêmes. Une harmonisation de cette étape de traitement des données sera indispensable dans les années à venir afin de réduire les écarts de résultats entre laboratoires.

Les principales étapes, montrées sur la Figure 10, consistent néanmoins à déterminer le bruit de fond pour en extraire le signal dû aux particules elles-mêmes, à déterminer le facteur de nébullisation (seule une fraction réduite de l'échantillon introduit dans le système atteignant le plasma) et à étalonner l'instrument en taille à partir des quelques rares matériaux de référence disponibles (la plupart des particules d'or de taille connue).

⁵ <https://www.wur.nl/en/show/Single-Particle-Calculation-tool.htm>

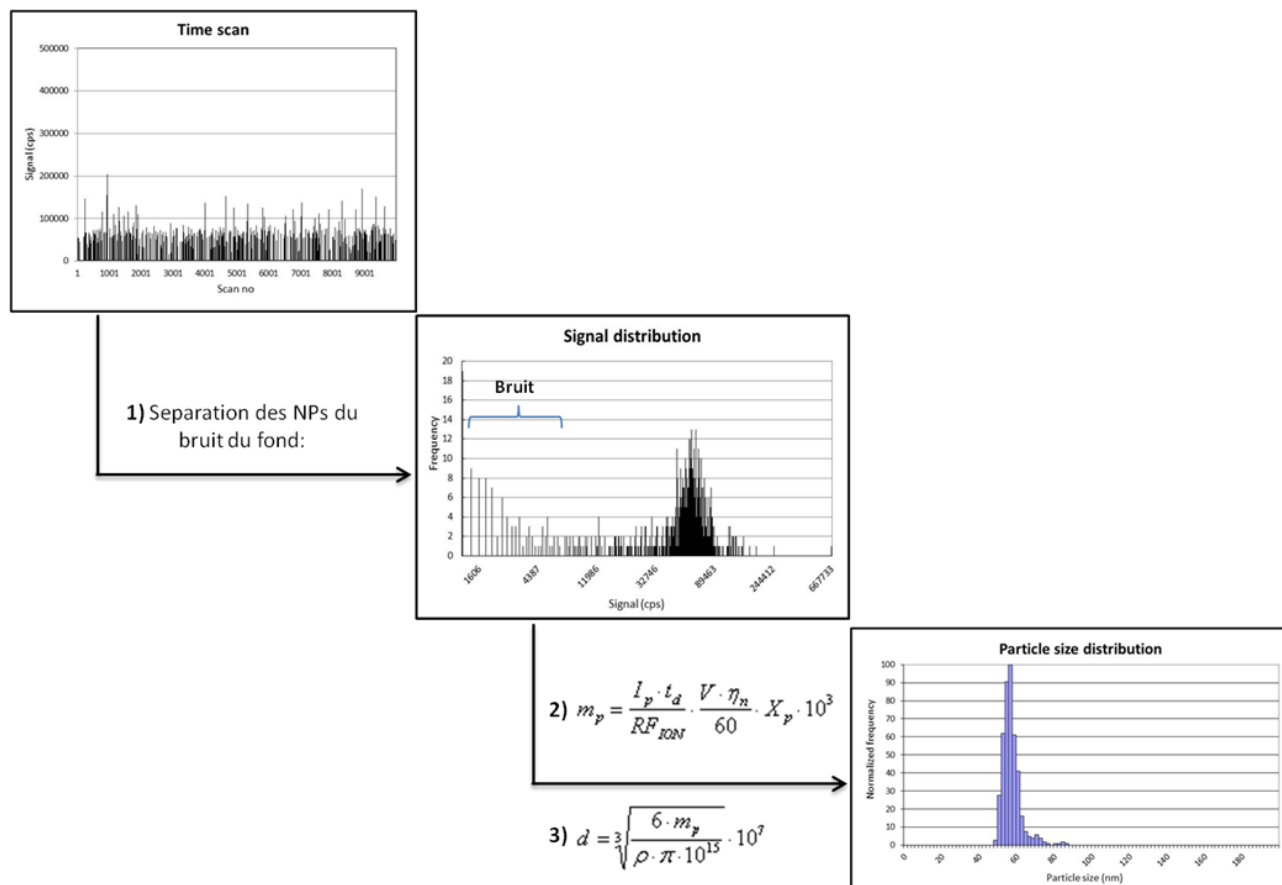


Figure 10 : Représentation schématique des différentes étapes nécessaires lors du traitement des données brutes sp ICP-MS

3.2.5.2 Particularités et limites techniques

► Données accessibles

Une géométrie sphérique est considérée lors du traitement des données, ce qui conduit à des biais importants dès lors que l'on s'éloigne de ces cas idéaux. L'hypothèse d'une sensibilité identique pour un élément donné, qu'il soit présent sous forme dissoute ou dans une particule, reste également à démontrer. Enfin, la densité des particules doit par ailleurs être connue, ce qui peut être compliqué à obtenir dans le cas de particules de type cœur/coquille ou de particules poreuses.

La dynamique de mesure est par ailleurs assez réduite, car elle est limitée pour les petites tailles par la sensibilité du détecteur. La limite inférieure de taille dépend en effet directement de l'élément et des niveaux de sensibilité permis par l'ICP-MS pour chacun d'eux. Ainsi, dans le cas de particules de SiO₂, les tailles minimales accessibles se situent autour de 90/100 nm du fait de la sensibilité relativement limitée de la technique ICP-MS sur l'élément silicium Si (bruit de fond élevé), alors que pour le cas du TiO₂, cette limite sera plutôt autour de 40 nm. Le recours à des ICP-MS haute résolution peut permettre d'améliorer la sensibilité sur un élément donné et donc la taille minimale accessible pour les particules correspondantes. Pour les grandes tailles, la technique est limitée actuellement vers 500 nm, du fait de la difficulté d'atomiser et ioniser de gros objets. Par conséquent, les grosses particules ainsi que les agrégats ou agglomérats au-dessus de cette limite ne sont pas vus, ou *a minima* voient leur taille largement sous-estimée.

Le signal d'une nanoparticule par sp ICP-MS est proportionnel à la masse de l'élément dans la nanoparticule. Pour cette raison, deux nanoparticules différentes avec la même concentration de l'élément se comportent de la même façon. C'est le cas des nanoparticules avec des formes

différentes ou avec la même forme et diamètre, mais avec différents enrobages. La composition, la densité et la forme doivent être parfaitement connues pour pouvoir obtenir l'information sur la taille.

► **Types d'échantillons analysables**

La technique sp ICP-MS est limitée aux éléments détectables en ICP-MS (ce qui exclut les matériaux carbonés, type particules organiques ou noir de carbone) et aux matériaux dispersibles en milieu aqueux. Cette technique ne discrimine pas les particules primaires au sein d'un agrégat ou agglomérat et mesure les agrégats ou agglomérats comme des particules primaires.

► **Autres particularités**

Des écarts de reproductibilité inter-laboratoires importants ont été observés jusqu'à maintenant lors des quelques comparaisons qui ont pu être réalisées.

3.2.5.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO/TS 19590:2017 Nanotechnologies – Distribution granulométrique et concentration de nanoparticules inorganiques en milieu aqueux par spectrométrie de masse à plasma induit en mode particule unique.

3.2.5.4 Accessibilité et coûts

Le coût de l'instrument est de l'ordre de 150 k€ et l'analyse est rapide, même si la phase de traitement des données reste encore laborieuse pour permettre l'obtention de données fiables. Les instruments disponibles sont nombreux puisque tout ICP-MS classique peut être utilisé en mode « sp » en réduisant le *dwell time* (durée entre deux acquisitions successives). Le niveau de compétences requis est élevé.

3.2.6 **Couplage spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif et détecteur de diffusion de la lumière multi-angle (A4F-MALS-UV-ICP-MS)**

3.2.6.1 Fonctionnement

► **Principe physique**

L'A4F (*Flow-Field Flow Fractionation*) est une technique d'analyse séparative indirecte basée sur le fractionnement par couplage flux-force réalisée par la migration différentielle d'objets de taille nano ou micrométrique au sein d'une phase mobile, sous l'effet d'un champ de force. Les particules s'écoulent en flux laminaire dans un canal de faible épaisseur, pendant qu'un second flux, perpendiculaire au flux principal, est appliqué. Pendant la phase de « relaxation », les objets injectés dans le système atteignent une condition d'équilibre qui implique des forces d'écoulement transversal et de diffusion brownienne. Comme le coefficient de diffusion d'une particule est inversement proportionnel à son rayon hydrodynamique selon l'équation de Stokes-Einstein, les particules plus petites migrent plus loin dans le canal et les plus grandes restent plus proches de la paroi poreuse. L'écoulement dans le canal est de type laminaire : le flux axial a une vitesse plus grande au centre du canal et nulle au contact avec la paroi poreuse. Par conséquent, les objets plus petits qui se retrouvent dans les lignes de flux plus importantes sont emportés plus rapidement en sortie du canal vers le système de détection, et vice-versa. La séparation physique des différentes tranches granulométriques de l'échantillon est ainsi réalisée, avant qu'elles passent dans une chaîne de détection qui permet de mesurer la concentration particulière des fractions (détecteur UV et détecteur ICP-MS) et la distribution granulométrique en masse des fractions (détecteur MALS à diffusion statique de la lumière). Le schéma de la technique est montré sur la Figure 11.

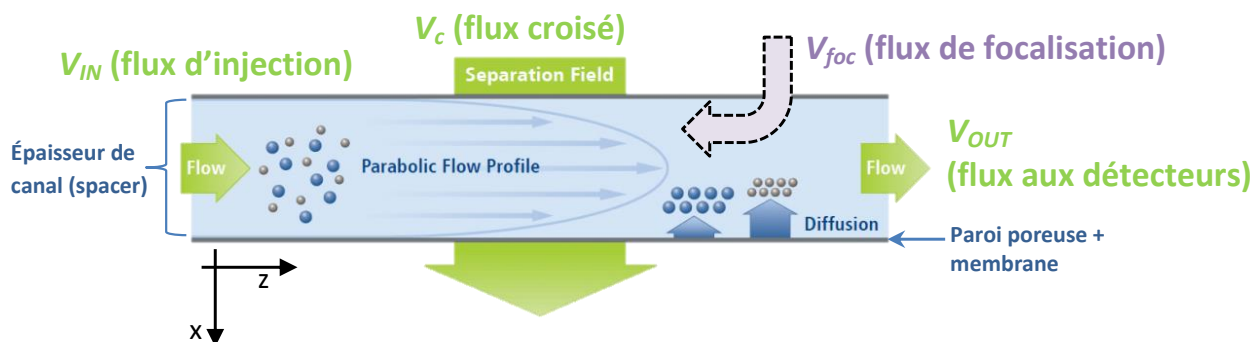


Figure 11 : Principe de fonctionnement schématique de la technique A4F

► Préparation des échantillons

Dans le cas des dispersions aqueuses, les caractéristiques physicochimiques (pH, force ionique) de la phase aqueuse doivent être ajustées pour être compatibles avec celles de l'éluant utilisé. Des options spécifiques permettent d'effectuer des séparations en phase organique (par exemple toluène, THF, etc.).

3.2.6.2 Particularités et limites techniques

► Données accessibles

Cette technique présente l'avantage d'avoir une bonne résolution en taille et de pouvoir fournir des fractions récupérables pour des études poussées (par exemple par microscopie). La gamme de tailles accessibles est approximativement 1-1 000 nm, ce qui signifie que les gros agrégats et agglomérats ne seront pas vus (et peuvent rester fixés sur le canal, modifiant ses propriétés). Le recours à un détecteur MALS donne accès à un diamètre équivalent, dit diamètre de giration, et à une distribution de taille en masse. La conversion vers une distribution de tailles en nombre sera entachée d'incertitudes, potentiellement importantes pour des particules non-sphériques. L'ICP-MS peut être utilisée comme détecteur de concentration massique de chaque fraction séparée. La variante sp ICP-MS peut aussi être utilisée : elle donne un accès simultané à la distribution de taille et à la concentration pour chaque fraction séparée.

► Types d'échantillons analysables

Il s'agit de dispersions aqueuses ou de poudres mises en dispersions aqueuses.

► Autres particularités

La technique reste néanmoins très complexe à appréhender, principalement à cause des interactions diverses qui peuvent survenir entre les particules et l'éluant utilisé et/ou les matériaux du canal, avec pour résultat une perturbation de la distribution granulométrique mesurée. Une phase de validation fastidieuse est nécessaire pour chaque substance et chaque milieu considérés, afin de maîtriser les biais.

L'impact de l'agglomération/agrégation est important, la technique A4F ne discriminant pas les particules individuelles au sein d'un agrégat ou d'un agglomérat et considérant les agrégats ou agglomérats comme des particules individuelles. Le recours à des images de microscopie sur les différentes fractions collectées s'avère indispensable pour parer à ces biais.

Les rendements obtenus (quantité de matière en sortie du canal par rapport à la quantité injectée) sont généralement assez faibles (en-dessous de 50 %), ce qui peut conduire dans certains cas à des interrogations sur la représentativité des résultats obtenus.

3.2.6.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO/TS 21362:2018 Nanotechnologies – Analyse des nano-objets par fractionnement par couplage flux-force asymétrique et à force centrifuge.

3.2.6.4 Accessibilité et coûts

Deux fournisseurs se partagent le marché et le coût de l'instrument est relativement élevé (de l'ordre de 300 k€, sans la détection par ICP-MS). Les appareils disponibles sont peu nombreux et principalement installés en milieu universitaire. Le niveau de compétences requis est très élevé.

3.2.7 **Sédimentation par centrifugation en phase liquide (CLS)**

3.2.7.1 Fonctionnement

▶ **Principe physique**

La sédimentation par centrifugation en phase liquide (CLS) ou sédimentation par centrifugation différentielle (DCS) telle qu'elle est également appelée, est une technique d'analyse séparative indirecte basée sur le mesurage de la vitesse de sédimentation d'objets dispersés dans un fluide. Cette vitesse est associée au diamètre et à la masse volumique des objets par la loi de Stokes-Einstein. La masse volumique et la viscosité du fluide doivent être connues et la masse volumique des objets doit être connue également. La sédimentation centrifuge à disque est la variante la plus largement utilisée de cette technique. Généralement, un gradient de densité de saccharose est créé en introduisant délicatement des concentrations de saccharose de plus en plus faibles dans le disque centrifuge. La dispersion diluée contenant les particules d'intérêt est injectée par-dessus le gradient et centrifugée à des accélérations de plus de 150 000 g. La rotation du disque à haute vitesse entraîne la séparation radiale des objets en fonction de leur taille. Un détecteur de lumière ou de rayons X enregistre en continu l'extinction du faisceau de référence qui est proportionnelle à la concentration massique à une position radiale donnée le long du disque. Au moyen de la loi de Stokes, une distribution granulométrique de diamètres hydrodynamiques pondérée en intensité est obtenue et transformée en une distribution granulométrique pondérée en volume ou en nombre (la masse volumique doit être connue ainsi que l'indice de réfraction en cas d'utilisation de détecteurs de lumière).

▶ **Préparation des échantillons**

Elle se limite à la préparation d'une dispersion aqueuse à la bonne dilution.

▶ **Analyse et exploitation des données brutes**

L'étape de conversion de la distribution de tailles en masse (à partir du signal optique) vers une distribution de tailles en nombre est cependant hautement non linéaire et accroît les erreurs de mesure de façon très importante. Les questions de rapport signal sur bruit sont ainsi critiques de ce point de vue.

3.2.7.2 Particularités et limites techniques

▶ **Données accessibles**

La plage de tailles applicable est d'environ 20 nm à 1 000 nm, selon les masses volumiques relatives des particules et du liquide dispersant. La résolution en taille est importante (de l'ordre de la dizaine de nanomètres) et la présence de gros objets ne perturbe pas la mesure des plus petits.

▶ **Types d'échantillons analysables**

La détection par rayons X est adaptée principalement aux particules inorganiques. Pour obtenir une extinction suffisante des rayons X, des concentrations relativement élevées sont nécessaires (généralement dans la plage de 10 g/l à 100 g/l selon la nature du matériau dispersé). Dans le cas

(plus répandu aujourd'hui) d'une détection optique par turbidimétrie, les concentrations requises sont inférieures au gramme par litre.

► **Autres particularités**

Les morphologies non sphériques introduisent un biais dans la détermination des tailles. Les particules les plus petites (inférieures à quelques nanomètres, selon leur densité) ainsi que les gros objets (supérieurs à quelques micromètres, selon leur densité) ne sont pas détectés. Cette technique ne discrimine pas les particules individuelles au sein d'un agrégat ou agglomérat et mesure les agrégats ou agglomérats comme des particules individuelles. La densité des particules et leurs constantes optiques doivent être connues avec précision, surtout si la densité est proche de celle du milieu dispersant, cas de figure où les incertitudes augmentent fortement.

Cette technique devient imprécise dans le cas de mélange de particules de natures différentes, puisque les densités de chacune ne peuvent être utilisées séparément dans le modèle de calcul.

La limite basse de taille est limitée par la vitesse de l'instrument et la densité des particules.

3.2.7.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO 13318-1:2001, *Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods – Part 1: General principles and guidelines.*

ISO 13318-2:2007, *Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods – Part 2: Photocentrifuge method.*

ISO 13318-3:2004, *Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods – Part 3: Centrifugal X-ray method.*

ISO 15825:2004, *Rubber compounding ingredients – Carbon black – Determination of aggregate size distribution by disc centrifuge photosedimentometry.*

3.2.7.4 Accessibilité et coûts

Les appareils à disque centrifuge sont relativement répandus en milieu académique et industriel. Le coût d'un instrument à disque centrifuge est de l'ordre de 60 k€. Celui d'une analyse est de l'ordre de quelques centaines d'euros. Le niveau de compétences requis est intermédiaire.

3.2.8 **Diffusion de rayons-X aux petits angles (SAXS)**

3.2.8.1 Fonctionnement

► **Principe physique**

Le SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) est une technique d'analyse d'ensemble indirecte dont le principe est fondé sur la mesure de diffusion aux petits angles ($< 5^\circ$) de rayons X et utilise un rayonnement par synchrotron ou des sources de rayons X commerciales utilisées en laboratoire. Un faisceau de rayons X qui traverse un milieu non homogène (du fait de la présence de particules) est dévié sous un angle qui dépend de la longueur d'onde du rayonnement et de la taille de l'objet diffusant. La mesure des angles de diffusion donne accès à des informations de forme et de taille dans le domaine nanométrique dans les cas favorables (existence d'un domaine fractal sur une certaine étendue de tailles, faible polydispersité des particules élémentaires). Ces informations sont obtenues par un ajustement, à l'aide de modèles mathématiques, des courbes d'intensité diffusée en fonction de l'angle de diffusion. Une information sur la forme des objets (dimension fractale) peut être obtenue si l'ensemble des particules possède la même morphologie. La technique est adaptée à l'étude de systèmes dispersés dans un solvant mais elle peut s'adapter, contrairement à la DLS, à l'étude de poudres sèches.

► Préparation des échantillons

Les échantillons de poudre sont insérés entre deux films plastiques transparents aux rayons X. L'épaisseur du film d'échantillon est de l'ordre du millimètre. Les échantillons en dispersion liquide (quelques microlitres) peuvent être examinés tels quels après introduction dans un tube capillaire. Dans ce dernier cas, il est impératif que la dispersion soit homogène et stable dans le temps de durée de l'analyse. Cette dernière a une durée très courte (seconde voire milliseconde) lorsqu'on emploie le rayonnement synchrotron, ou moyennement longue (minute jusqu'à la dizaine de minutes) lorsqu'on emploie une source de rayons X commerciale.

► Analyse et exploitation des données brutes

L'intensité diffusée est enregistrée sur une caméra numérique bidimensionnelle. Le signal est alors intégré de manière azimutale pour obtenir un profil d'intensité en fonction de l'angle de diffusion, ou plus en général du vecteur d'onde, q , ce dernier étant proportionnel à l'inverse d'une distance et en relation à l'angle de diffusion par la relation de Bragg. Un profil de diffusion SAXS est donc généralement présenté depuis les petites valeurs de q (petits angles de diffusion, grandes distances) jusqu'aux grandes valeurs de q (grands angles, petites distances). Cette courbe est ensuite normalisée par rapport aux valeurs de diffusion de l'eau et une ligne de base (solvant + capillaire) est ensuite soustraite pour enfin obtenir un profil SAXS de l'échantillon. Cette courbe peut ensuite être analysée à l'aide de modèles assez complexes pour obtenir les informations de taille et, surtout, de forme mais il existe des analyses plus simples, indépendantes d'un modèle particulier. Une observation préalable en microscopie électronique permet le plus souvent de faciliter l'exploitation des données en orientant vers le modèle le plus adapté.

3.2.8.2 Particularités et limites techniques

► Données accessibles

Cette technique fournit une distribution en taille pondérée en volume ou en nombre dans une gamme comprise entre 1 et 100 nm environ. La gamme de concentrations analysables est très grande (de très faible à très élevée). La résolution en tailles et la justesse sont d'autant meilleures que les distributions de tailles sont étroites (même si elles possèdent plusieurs modes). Le grand atout de cette technique consiste en la possibilité de remonter à la forme des objets diffusants. Une approche indépendante d'un modèle (dénué de toute hypothèse) peut être utilisée et permet d'accéder surtout à des formes simples (sphère, fibre, surface plane), à une dimension fractale, mais aussi au rayon de giration (proportionnel au rayon physique) de l'objet diffusant et à sa surface spécifique. Une approche dépendante d'un modèle est en général suivie s'il est possible d'émettre une hypothèse raisonnable sur la forme de la courbe (par rapport à la littérature) ou si des données complémentaires obtenues par une technique d'analyse directe (microscopie électronique ou AFM) sont disponibles. L'utilisation de modèles est préconisée pour des utilisateurs plus expérimentés mais elle ne demeure pas moins puissante car les modèles disponibles au sein de bibliothèques en accès libre sont nombreux.

► Types d'échantillons analysables

Le SAXS est particulièrement adapté à l'étude de tout type de nanomatériaux, indépendamment de sa composition chimique ou de sa forme. La technique est particulièrement adaptée à l'étude d'échantillons dispersés dans un solvant et, en utilisant le rayonnement synchrotron, elle peut être employée pour des études avancées, visant à explorer l'effet d'un paramètre et/ou un stimulus sur le système (par exemple : température, pH, force ionique...).

► Autres particularités

La géométrie SAXS est particulièrement adaptée pour coupler d'autres techniques d'analyse telles que la chromatographie à exclusion de taille (SEC), la rhéologie...

Le SAXS est une des seules techniques à être sensibles à des variations légères de densité électronique et il est donc très adapté pour étudier des systèmes cœur-couronne, comme par exemple des nanoparticules d'oxyde stabilisées par un ligand organique. Une étude plus poussée de ces systèmes est néanmoins mieux approchée par l'utilisation de neutrons en diffusion aux petits angles au lieu de rayons-X, les neutrons étant mieux diffusés par l'hydrogène.

Le grand inconvénient du SAXS consiste en la nécessité d'avoir un matériau homogène et le plus monodisperse possible. Les incertitudes sont grandes dans le cas de polydispersités élevées, qui conduisent à une décroissance monotone de l'intensité diffusée en fonction de l'angle de diffusion, difficile à modéliser avec précision. La discrimination de particules individuelles au sein d'agrégats ou d'agglomérats n'est pas possible dans la majorité des cas. La présence d'agrégats rend difficile l'obtention d'informations sur les nanoparticules isolées. Par ailleurs, les gros objets (diamètre > 200 nm environ) sont peu ou pas accessibles et des analyses par une technique complémentaire de diffusion statique de la lumière deviennent nécessaires.

La sensibilité dépend de la densité électronique des particules (c'est elle qui entraîne la déviation des rayons X) ; des particules métalliques ou à base d'oxydes métalliques ont un meilleur contraste avec les rayons X que des systèmes organiques quel que soit le milieu dispersant (aqueux ou organique).

3.2.8.3 Normes associées et documents de référence principaux

L'utilisation de logiciels adaptés, à la fois pour le traitement et l'analyse des données, est crucial et leur utilisation requiert une certaine expérience. Néanmoins, le traitement des données est généralement fait « à la source », souvent par un ingénieur ou chercheur dédié à l'acquisition des données alors que l'analyse devient de moins en moins compliquée de par l'existence de nombreux logiciels très performants et en libre accès (par exemple, SasView).

ISO 17867:2015 Analyse granulométrique – Diffusion des rayons X aux petits angles.

ISO/PWI 20803 *Determination of particle size distribution – SAXS method* (à venir).

3.2.8.4 Accessibilité et coûts

Les instruments « de paillasse » sont encore assez peu répandus. Leur coût est de l'ordre de 150 k€. Le coût d'une analyse n'est pas très élevé, car la préparation de l'échantillon est limitée. Le niveau de compétences requis est très élevé. Deux installations de rayonnement synchrotron existent sur le territoire et peuvent également proposer des accès à des lignes de rayonnement X pour mener des expériences de SAXS. Par ailleurs, plusieurs plateformes d'analyse (hors synchrotron) existent sur le territoire national.

3.2.9 Spectromètre de mobilité électrique (SMPS)

3.2.9.1 Fonctionnement

► Principe physique

Le SMPS (*Scanning Mobility Particles Sizer*) est constitué d'un DMA (Analyseur à Mobilité Différentielle) et d'un CPC (Compteur de Particules à Noyaux de Condensation). Il s'agit d'une méthode individuelle indirecte.

Le DMA permet de sélectionner, à pression atmosphérique, des particules en fonction de leur mobilité électrique au sein d'un aérosol polydispersé, c'est-à-dire contenant différentes populations de particules de taille hétérogène. La sélection des particules dans le DMA se fait dans une colonne assimilable à un tube de vol. Les particules, après avoir été chargées par ionisation, y sont soumises à un champ électrique induit par une différence de potentiel entre deux électrodes cylindriques. Un flux laminaire d'air filtré circule entre ces deux électrodes. Le flux d'échantillon entre dans la colonne par le haut et se déplace parallèlement aux électrodes et au flux laminaire. Les particules sont alors soumises à trois forces : leur inertie, la force d'entraînement du champ

électrique et la force d'entraînement du débit laminaire. Ainsi, à un débit donné, dans un DMA de géométrie connue, la tension appliquée sur l'électrode centrale correspond à un diamètre de mobilité électrique donné qui est fonction notamment de la charge de la particule, d'où l'importance de maîtriser la distribution de charge de l'aérosol pour les mesures SMPS. Finalement, les particules dont la mobilité électrique correspond à la tension appliquée sont sélectionnées en fonction de leur mobilité électrique dans une fente de collection en bas de colonne. Si une rampe de tension est appliquée à l'électrode centrale (c'est-à-dire une évolution temporelle et continue de la tension), il est possible de sélectionner progressivement des particules de diamètre de mobilité croissant.

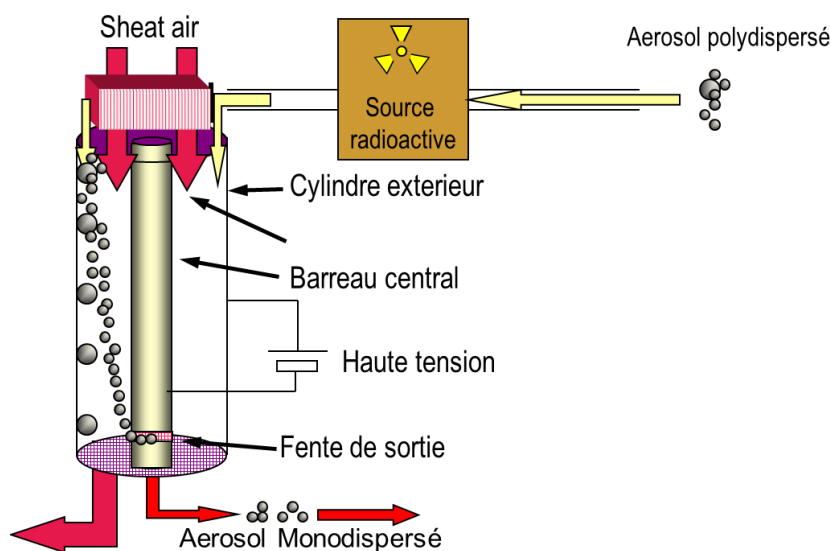


Figure 12 : Schéma de principe d'un analyseur à mobilité différentielle (DMA)

En sortie du DMA, les particules sélectionnées sont détectées par le compteur à noyau de condensation (CNC) qui permet de mesurer la concentration en nombre de particules pour chaque diamètre de mobilité électrique scanné. Pour ce faire, la condensation d'une vapeur sur la surface des particules permet leur grossissement pour ensuite les détecter optiquement. Lorsque les particules atteignent le système de détection optique, leur diamètre a suffisamment augmenté pour qu'elles puissent être détectées par diffusion de la lumière générée par un faisceau laser, focalisée par un système de lentilles. La lumière diffusée lors du passage des particules produit une impulsion lumineuse qui est convertie en un signal électrique associé au nombre de particules passées devant le détecteur. Le schéma d'un DMA est montré sur la Figure 12.

La distribution granulométrique en nombre de l'échantillon est alors reconstruite en utilisant le nombre de particules comptées sur le canal de diamètres particulaires considéré pour calculer la concentration en nombre de particules dans l'intervalle de diamètres.

► Préparation des échantillons

Afin de pouvoir réaliser ce type de mesure, il est nécessaire en amont d'avoir mis en phase aérosol l'échantillon à caractériser. Différents types de générateurs peuvent être utilisés selon que l'échantillon est une poudre (atomiseur) ou une dispersion (nébuliseur ou électrospray).

3.2.9.2 Particularités et limites techniques

► Données accessibles

Le SMPS est un instrument permettant la mesure de distributions granulométriques pour des aérosols sub-microniques en allant jusqu'à quelques nanomètres. Il effectue des mesures de

diamètre de mobilité électrique (diamètre équivalent) associées à des mesures de concentrations en nombre, la technique étant très sensible (quelques particules par cm³).

► **Autres particularités**

Une hypothèse de sphéricité des particules est réalisée lors du traitement des données, et même si des facteurs correctifs peuvent être appliqués dans le cas de particules non sphériques, les biais peuvent être importants. L'accès aux particules primaires peut être dans certains cas compliqué car cette technique ne différencie pas les particules primaires des agrégats ou agglomérats. La principale difficulté de cette approche réside cependant dans le fait que la distribution de taille des particules de l'aérosol généré soit similaire à celle de l'échantillon natif, de multiples paramètres instrumentaux devant être optimisés. Dans certains cas, une bonne corrélation avec les résultats de microscopie électronique sont obtenus (Motzkus *et al.* 2013). Une forte expertise sur le volet aérosol (génération à partir de différents types d'échantillons et leur caractérisation) est cependant nécessaire.

L'utilisation d'une source radioactive pour l'étape de neutralisation pose un problème de sécurité et nécessite l'obtention d'une autorisation de la part de l'autorité compétente en matière de sûreté nucléaire. De nouvelles sources RX sont néanmoins proposées sur certains nouveaux instruments commercialisés.

3.2.9.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO 15900 :2009 Détermination de la distribution granulométrique — Analyse de mobilité électrique différentielle pour les particules d'aérosol.

3.2.9.4 Accessibilité et coûts

Cette technique est historiquement utilisée dans le domaine des aérosols (qualité de l'air, mesure d'exposition) et le développement récent de différents types de systèmes commerciaux pour la génération d'aérosol à partir de poudres ou de dispersions ouvre de nouvelles perspectives. Le niveau de compétences requis est élevé. Le coût de l'instrument est de l'ordre de 50 k€ et celui d'une analyse de l'ordre de 1-2 k€.

3.2.10 **Compteur Coulter (TRPS)**

3.2.10.1 Fonctionnement

► **Principe physique**

Cette technique individuelle indirecte exploite le fait qu'une particule qui se déplace dans un électrolyte placé dans un champ électrique génère une perturbation mesurable de ce champ électrique, proportionnelle au volume de la particule. La suspension contenant les particules est très diluée et pompée dans un micro-canal que les particules traversent une à une, modifiant ainsi la résistance électrique au niveau de l'orifice de passage. Le suivi de cette résistance électrique dans le temps permet de déterminer un nombre de particules (nombre d'évènements) et leurs tailles (intensité de la perturbation), dont une distribution granulométrique pondérée en volume.

► **Préparation des échantillons**

Elle se limite à la préparation d'une dispersion aqueuse très diluée.

3.2.10.2 Particularités et limites techniques

► **Données accessibles**

La technique permet d'obtenir une distribution granulométrique pondérée en volume. La gamme de taille accessible est de l'ordre de 70 nm à quelques µm, donc les plus petits objets ne sont pas

vus. La résolution de la technique s'avère dans certains cas très intéressante pour séparer plusieurs populations d'objets (voir (Anderson *et al.* 2013) et Figure 13).

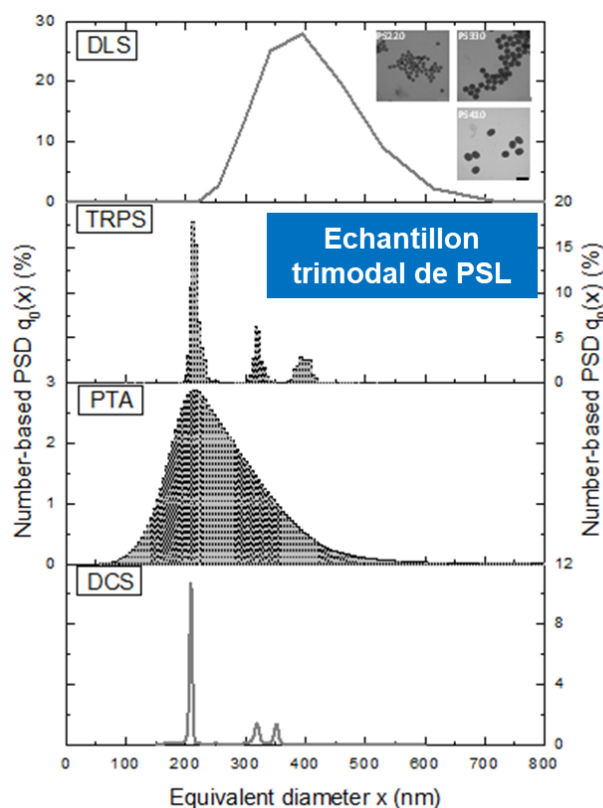


Figure 13 : Comparaison des résultats de différentes techniques sur des PSL (particules de latex) extrait de (Anderson *et al.* 2013)

► Types d'échantillons analysables

Les particules doivent pouvoir être dispersées dans un milieu aqueux (nécessité de disperser les particules dans une solution d'électrolyte).

► Autres particularités

Un étalonnage préalable est nécessaire mais il dépendra de la forme des particules (qui devrait donc être connue) et de leur conductivité électrique.

Elle ne discrimine pas les particules individuelles au sein d'un agrégat ou agglomérat et mesure les agrégats ou agglomérats comme des particules individuelles. Elle ne donne pas non plus d'informations sur la forme des objets.

3.2.10.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO 13319:2007, *Determination of particle size distributions – Electrical sensing zone method.*

3.2.10.4 Accessibilité et coûts

Cette technique est assez répandue en milieu académique et industriel. Le coût de l'instrument est modeste et l'analyse est rapide. Le niveau de compétences requis est faible.

3.2.11 Analyse par traçage des particules (PTA)

3.2.11.1 Fonctionnement

▶ Principe physique

Cette technique d'analyse individuelle indirecte utilise un microscope optique équipé d'un faisceau laser. La lumière diffusée de chaque particule est détectée par une caméra numérique (CCD ou CMOS). Le mouvement de chaque particule est suivi d'image en image par un logiciel d'analyse d'images. Le mouvement brownien de chaque particule (qui dépend de son diamètre hydrodynamique) est enregistré. Une distribution de diamètre hydrodynamique pondérée en nombre est ainsi obtenue à partir du coefficient de diffusion traité par la relation de Stokes-Einstein.

▶ Préparation des échantillons

Elle se limite à la préparation d'une dispersion aqueuse très diluée.

▶ Analyse et exploitation des données brutes

Elle se limite à la reconstitution, par le logiciel, des distributions de taille pondérées en nombre, par intégration des mesures de particules individuelles.

3.2.11.2 Particularités et limites techniques

▶ Données accessibles

Cette technique aboutit à l'établissement d'une distribution de diamètre hydrodynamique pondérée en nombre. La gamme de taille accessible est de l'ordre de 10 nm à 1 µm et dépend de la nature chimique de l'échantillon. Les particules plus petites que la limite de détection théorique de la microscopie optique sont cependant détectables. Comme en DLS, la viscosité du milieu de dispersion doit être connue.

La sensibilité diminue pour les très petites particules. La résolution en taille n'est pas très importante. La présence de grosses particules limite la détection des plus petites. Cependant, comme il s'agit d'une technique d'analyse individuelle des particules, la présence de grosses particules impacte beaucoup moins le résultat final qu'en DLS. Cela implique également que pour les échantillons polydispersés, de grandes statistiques de comptage doivent être utilisées pour réduire les incertitudes de la granulométrie.

Cette technique ne discrimine pas les particules individuelles au sein d'un agrégat ou agglomérat et mesure les agrégats ou agglomérats comme des particules individuelles. Elle ne donne pas d'informations sur la forme.

▶ Types d'échantillons analysables

Il s'agit de dispersions de particules dans un liquide (aqueux ou organique). La gamme de concentration doit être ajustée dans la plage d'utilisation de la technique (dont la largeur est de l'ordre de trois décades).

▶ Autres particularités

Un mode fluorescence peut être utilisé, pour donner accès à la distribution de taille et la concentration de particules marquées (utile en biologie/biochimie, par exemple).

3.2.11.3 Normes associées et documents de référence principaux

ASTM E2834-12, *Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)*.

3.2.11.4 Accessibilité et coûts

Les appareillages commerciaux existent et commencent à se répandre, car le coût n'est pas très élevé. Cependant, il n'existe actuellement qu'un seul fournisseur sur le marché.

3.2.12 Synthèse

Tableau 1 : Synthèse des caractéristiques des principales méthodes analytiques de caractérisation de la taille et des distributions de tailles

MÉTHODE DE MESURE	AVANTAGES ET PRINCIPALES LIMITATIONS	ACCESSIBILITÉ MATÉRIEL	NORMES
Taille et distribution de tailles			
DLS	Analyse de nanoparticules en dispersion. La gamme de mesure est large (~5 nm à 1 µm). Mesure rapide. Une forte polydispersité ainsi qu'un manque de stabilité de l'échantillon induisent des biais importants.	Très grande	ISO 22412 ISO 21501
SAXS	Renseigne sur la forme, la taille, la dimension fractale et la surface exposée d'objets. Elle ne peut pas indiquer une distribution de taille en routine si celle-ci est poly dispersée (nécessite la mise en place d'algorithmes de traitement du signal au cas par cas). S'applique à principalement à des dispersions en milieu liquide ou des poudres. Gamme de tailles accessible varie entre 1 nm et 100 nm en routine mais elle peut monter jusqu'à 300 nm. Interprétation délicate de données	Moyenne	ISO/TS 13762 ISO 17867
MEB MET	Permettent de différencier plusieurs catégories de particules dans un mélange complexe, sur des critères morphologiques ou de composition chimique. Renseigne de façon qualitative sur la taille, la forme et la composition chimique de toutes les particules élémentaires, agrégats et agglomérats. Le prélèvement et la préparation des échantillons peuvent induire des artefacts. Il existe des protocoles de dispersion (choix adéquat du milieu dispersant, hydrophilisation des membranes de carbone) qui limitent considérablement la survenue de ces artefacts. Une alternative de choix est la Cryo-MET, dans laquelle aucune modification de l'état de dispersion des suspensions ne se produit lors de la préparation des échantillons. Cependant, très peu de Cryo-MET sont disponibles pour réaliser ces analyses et la résolution est légèrement dégradée.	Moyenne	ISO 19749 ISO 10798 ISO 21363
AFM	Applicable à des dispersions aqueuses déposée sur un substrat plan. Grande résolution en Z mais effets de convolution par la pointe dans le plan XY. Temps d'analyse des résultats assez long. Domaine de taille explorée entre 1 nm et le µm	Faible.	ISO 11952 ISO 11775 ISO 13095
sp-ICPMS	S'applique à des dispersions très diluées. Permet d'obtenir simultanément la concentration et la distribution de tailles pour une espèce chimique donnée, y compris dans un mélange. La gamme de tailles accessible est restreinte et des écarts de reproductibilité interlaboratoires importants sont observés.	Moyenne	ISO/TS 19590
SMPS	Analyse de nanoparticules en matrice aérosol. Très largement utilisé. Fournit une taille équivalente (sphérique, densité unitaire). La mise en aérosols de poudres n'est pas aisée.	Très facile	ISO 15900
A4F-MALS-UV-ICPMS	Applicabilité A4F qui reste à démontrer sur les nanos car il faut définir et contrôler précisément les conditions physicochimiques (pH, force ionique...). Interprétation des résultats qui peut être délicate.	Faible	ISO/TS 21362
CLS	Applicable aux dispersions aqueuses. Fournit une bonne résolution en tailles et n'est pas perturbée par la polydispersité. La densité doit être connue.	Moyenne	ISO 13318 ISO 15825
TRPS	S'applique à des dispersions aqueuses. Technique rapide et peu onéreuse. Les faibles tailles (< 70 nm) ne sont pas vues.	Facile	ISO 13319
PTA	S'applique à des dispersions aqueuses. Gamme de tailles accessibles assez faible. Une grande polydispersité induit des biais importants.	Faible	ASTM E2834-12

Tableau 2 : Synthèse des domaines d'applicabilité des principales méthodes analytiques de caractérisation de la taille et des distributions de tailles

Méthode de mesure	Classification de la technique	Milieu	Forme	Accès aux particules primaires	Tailles accessibles		Identification chimique	Type de distribution	Commentaires
					Min	max			
DLS	Ensemble indirecte	Liquide	Sphérique	NON	10 nm	2 µm	NON	En intensité	Peu cher et répandu
MEB MET	Individuelle directe	Poudre (après une étape de mise en suspension et dépôt) Liquide (après une étape de dépôt)	Toute forme (compliqué pour nanoplaquettes)	OUI	~ nm	Plusieurs centaines de µm	OUI si couplé à EDX	En nombre	Cher / Forte expertise
AFM	Individuelle directe	Poudre (après une étape de mise en suspension et dépôt) Liquide (après une étape de dépôt)	Toute forme (mais accès à hauteur)	NON	~ nm	1 µm	NON	En nombre	Cher / Forte expertise
sp-ICPMS	Individuelle indirecte	Liquide Poudre (après une étape de mise en suspension)	Sphérique	NON	~ 20 nm *	500 nm	OUI	En nombre	Moyennement cher / Expertise
A4F-MALS-UV-ICPMS	Séparative indirecte	Liquide Poudre (après une étape de mise en suspension)	Toute forme	NON	~ nm	100 µm	OUI si ICP-MS couplé	En intensité	Cher / Forte expertise
SAXS	Ensemble indirecte	Liquide Poudre	Toute forme	NON	~ nm	250-300 nm (µm si complété par analyse de diffusion statique de la lumière)	NON	En intensité	Cher / Forte expertise
SMPS	Séparative indirecte	Poudre (après une étape de mise en phase aérosol) Liquide (après une étape de mise en phase aérosol)	Sphérique **	NON	~ nm	500 nm ***	NON	En nombre	Cher / Forte expertise

Méthode de mesure	Classification de la technique	Milieu	Forme	Accès aux particules primaires	Tailles accessibles		Identification chimique	Type de distribution	Commentaires
					Min	max			
CLS / DCS	Séparative indirecte	Liquide Poudre (après une étape de mise en suspension)	Sphérique	NON	20 nm	1 µm	NON	En masse	Peu cher / répandu / Expertise intermédiaire
TRPS	Individuelle indirecte	Liquide Poudre (après une étape de mise en suspension)	Sphérique	NON	70 nm	~ µm	NON	En volume	Peu cher et répandu
PTA	Individuelle indirecte	Liquide Poudre (après une étape de mise en suspension)	Sphérique	NON	10 nm	1 µm	NON	En intensité	Peu cher et pas encore très répandu

* selon la nature chimique des particules

**** Basée sur la mesure du coefficient de diffusion

** facteurs correctifs applicables pour d'autres formes

***** Emploi de modèles permettant de reconstruire un profil de diffusion à partir d'une forme donnée

*** autre technique à coupler type APS → 20 µm

4 Forme

4.1 Utilité pour l'évaluation des risques

Les effets de la forme sur le potentiel toxique des particules constituent une problématique de longue date, bien connue sur des matériaux de type amiante mais peu caractérisée sur les nouvelles classes de NOAA ; une attention particulière est cependant portée aux particules qui présentent un rapport longueur/diamètre important (HARN : *high aspect ratio nanoparticles*) car si elles sont peu ou pas solubles elles peuvent potentiellement se comporter comme des fibres biopersistantes.

4.2 Description des principales méthodes de caractérisation

Les techniques d'imagerie (MEB, MET, AFM) ainsi que le SAXS, en moindre mesure, sont les seules qui donnent accès à la description de la morphologie des nano-objets, agrégats et agglomérats.

Un logiciel d'analyse d'images donne accès aux distributions géométriques de taille pondérées en nombre (exprimées en diamètre de sphère équivalente ou en divers paramètres dimensionnels comme la longueur, la largeur, les diamètres de Feret, le périmètre et la surface projetée). Cela requiert généralement l'identification de l'objet et sa séparation par rapport à l'arrière-plan au moyen de seuils d'intensité appliqués à une image en niveaux de gris. Il est possible d'obtenir également des distributions de formes, par exemple en mesurant le rapport d'aspect individuel des NOAA (longueur divisée par largeur) ou des paramètres géométriques qui décrivent la morphologie (circularité, concavité, solidité...).

L'analyse d'images permet de quantifier des paramètres morphologiques dans certaines conditions et limites. Il est habituellement impossible d'obtenir des distributions de tailles séparées pour les nano-objets et leurs agglomérats et agrégats, les particules élémentaires étant très difficiles à isoler dans un agrégat ou un agglomérat avec les critères automatiques utilisés par un logiciel. Les nanofibres très longues comme les nanotubes de carbone peuvent être difficiles à séparer en particules individuelles, car elles sont souvent imbriquées dans des agglomérats complexes et il est délicat d'identifier le début et la fin d'une même fibre.

Il convient d'optimiser soigneusement la dispersion et la concentration des particules déposées sur le substrat. De faibles concentrations peuvent en effet limiter les statistiques de comptage tandis que des concentrations élevées peuvent nuire au comptage, des objets se chevauchant pouvant être vus par le logiciel comme une particule unique. L'étalonnage préliminaire de la taille des pixels doit être réalisé au moyen de matériaux de référence.

S'ajoutent à ces limitations celles inhérentes aux microscopies elles-mêmes, déjà décrites ci-dessus.

5 Surface spécifique

La surface spécifique est une notion majeure pour les phénomènes faisant intervenir les surfaces, par exemple les réactions de catalyse. C'est un paramètre très important dans les études de toxicité.

5.1 Utilité pour l'évaluation des risques

La surface spécifique représente la surface totale accessible par unité de masse (auquel cas, elle s'exprime en m^2/g) ou bien par unité de volume (et s'exprime alors en m^2/m^3 ou en m^{-1}) et constitue un paramètre très important pour l'évaluation du risque. Il a été montré pour plusieurs nanomatériaux que l'augmentation de la toxicité était corrélée avec l'augmentation de la surface spécifique (relation dose-réponse). Ce constat peut être lié au fait que les réactions chimiques survenant à la surface d'un matériau, un ensemble de nanoparticules présente plus de surface qu'une particule unique de même masse ou de même volume.

Il faut toutefois noter que lorsque l'on compare plusieurs matériaux, un objet poreux aura une plus grande surface spécifique mais cette surface ne sera pas toujours totalement accessible pour des interactions avec du matériel biologique. La méthode BET présentée ci-dessous est certainement la plus couramment utilisée dans la quantification de la surface spécifique d'un matériau. Il faut toutefois mentionner que d'autres techniques de caractérisation, moins courantes et avec plus de limites, sont aussi disponibles pour mesurer la surface spécifique de particules en suspension (SAXS par exemple). L'instrument ACORN AREA™ (encore en développement) permet la mesure de surface spécifique de nanoparticules en suspension dans un liquide grâce à une méthode basée sur la résonance magnétique nucléaire (RMN).

5.2 Description des principales méthodes de caractérisation

5.2.1 Adsorption de gaz (méthode BET)

5.2.1.1 Fonctionnement

► Principe physique

La méthode BET (Brunauer, Emmett, Teller) est la plus couramment utilisée en science des matériaux pour obtenir une valeur de surface spécifique de poudres et objets solides à partir d'isothermes d'adsorption de gaz effectuées sur ces mêmes matériaux. Elle repose sur l'adsorption à basse température de gaz à la surface d'un solide. Ce dernier est préalablement dégazé par chauffage sous balayage en présence d'une atmosphère contrôlée afin de pouvoir ensuite adsorber le gaz de mesure en monocouche. Le plus souvent le gaz utilisé sera de l'azote. Il est possible d'obtenir une isotherme complète d'adsorption/désorption (longue à obtenir) qui permet d'accéder à la fois à la surface totale, et à la taille des pores du matériau considéré, ou plus simplement d'une mesure « 1 point » à la pression atmosphérique (beaucoup plus rapide) qui donne une mesure globale de surface S_{BET} .

Dans le cas de matériaux secs, la mesure BET à l'azote peut être considérée comme une mesure de première intention aisée à obtenir, elle permet d'orienter vers des caractérisations supplémentaires en vue de préciser le caractère nano.

► Préparation des échantillons

L'adsorption du gaz de mesure ne peut se faire que sur une surface préalablement nettoyée de tous les contaminants éventuellement adsorbés sur cette surface et qui incluent aussi l'eau adsorbée. Pour ce faire, les échantillons sont soumis à une rampe de chauffage associée à une rampe de mise sous vide ou sous circulation d'une atmosphère contrôlée. La température et le temps de dégazage doivent être adaptés aux différents types d'échantillons, par exemple certains échantillons fragiles ne supportent pas la température de 300°C souvent préconisée. Un dégazage à une température plus basse est possible, au prix d'une durée plus importante. Une analyse préalable du comportement de l'échantillon en analyse thermique gravimétrique (ATG) peut être nécessaire pour déterminer les paramètres de ces rampes. L'automatisation du processus dans un accessoire dédié permet d'éviter la reprise d'eau par des échantillons hygroscopiques.

► Analyse et exploitation des données brutes

La surface spécifique est obtenue à partir de la courbe d'adsorption pour des pressions partielles assez faibles et qui correspondent à l'adsorption de la première monocouche de gaz adsorbé. Le modèle BET s'applique alors pour obtenir une valeur de la surface spécifique en m²/g ou surface volumique, m²/m³ ou m²/cm³, si la densité du matériau est connue. Dans le cas de poudres, si la forme des particules est sphérique, leur porosité faible et que le matériau est non agrégé et peu dispersé en taille, il est possible de remonter au diamètre équivalent des particules par la relation :

$$D = 6/(d \cdot S_{\text{BET}})$$

où d est la densité du matériau

Si ce dernier est poreux, il est nécessaire de mesurer au préalable sa densité réelle. Dans le cas de poudres, la densité est le plus souvent obtenue par pycnométrie, le plus souvent à l'hélium.

5.2.1.2 Particularités et limites techniques

► Données accessibles

Cette technique fournit la quantité de gaz adsorbé en fonction de sa pression partielle. La quantité de gaz est directement reliée à la surface accessible *via* les données structurales du gaz utilisé (par exemple, taille de la molécule) et donc permet d'accéder au calcul de la surface du matériau en faisant un certain nombre d'hypothèses, comme celle de l'adsorption couche par couche et d'une densité homogène du gaz adsorbé près et loin de la surface. La méthode ne donne pas d'informations sur la forme du matériau. Certains modèles de traitement des données (par exemple la méthode t -plot) permettent de remonter à la porosité ouverte du matériau, ainsi qu'à la taille des pores.

► Types d'échantillons analysables

Cette technique s'adresse à des matériaux secs (ou séchés).

► Autres particularités

Parmi les limites de la technique BET, il est à noter, particulièrement pour les matériaux poreux, que la surface accessible peut varier sensiblement en fonction du gaz utilisé (le type de porosité observé étant dépendant des dimensions des molécules de gaz adsorbées). Le type de surface joue aussi sur le résultat, par exemple dans le cas de matériaux hydrophobes comme les nanotubes de carbone bruts par exemple, il existe un écart significatif entre la surface spécifique à l'azote ou à la vapeur d'eau (facteur 50).

En pratique, dans le cas des échantillons à forte surface spécifique (et faible densité), toute erreur de pesée de la masse de l'échantillon conduit à une erreur importante (jusqu'à 20 %). Il faut aussi veiller à ce que tout l'échantillon à mesurer se trouve bien dans la zone refroidie où se fait l'adsorption de gaz. Ce point n'est pas toujours évident en présence d'échantillons fortement

électrostatiques ou légers qui peuvent être partiellement déplacés par le flux gazeux de mesure. De tels phénomènes de rétention de l'échantillon en dehors de la zone de mesure peuvent donc conduire à sous-estimer la surface spécifique.

Dans le cas d'échantillons organiques ou de particules présentant un revêtement organique ou des fonctions greffées, la phase de dégazage, indispensable à l'obtention de résultats fiables et reproductibles, peut être délicate. Ces substances peuvent en effet se dégrader aux températures habituellement utilisées lors de cette étape. Il faut dans ces cas-là utiliser la température maximale à laquelle la molécule ne se dégrade pas (une analyse ATG préalable présentera ainsi de l'intérêt), mais la mise en œuvre d'une température trop basse pourra limiter la désorption des impuretés présentes et donc fausser le résultat.

Une caractéristique classique des profils d'adsorption/désorption de gaz est la présence d'une hystérèse entre l'adsorption et la désorption. La présence et la forme de l'hystérèse renseignent sur la connectivité des pores. La présence d'une hystérèse n'affecte pas le calcul de surface spécifique par la méthode BET mais peut affecter l'évaluation du volume poreux. Dans ce cas, il faut généralement utiliser la courbe d'adsorption.

5.2.1.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO 9277:2010 - Détermination de l'aire massique (surface spécifique) des solides par adsorption de gaz — Méthode BET.

ISO 15901-3:2007 - Distribution des dimensions des pores et porosité des matériaux solides par porosimétrie au mercure et par adsorption de gaz — Partie 3: Analyse des micropores par adsorption de gaz.

5.2.1.4 Accessibilité et coûts

De nombreux appareils sont disponibles, qu'il s'agisse de « monopoint » ou de ceux plus complexes permettant d'obtenir les isothermes complètes. Le coût de ces appareils est de l'ordre de 30 k€.

6 Composition

Cette information n'est pas spécifique aux nanomatériaux, toutes les techniques classiques d'analyses chimiques peuvent être envisagées. Cette rubrique s'intéresse à l'analyse élémentaire globale des échantillons qui peut être réalisée par de nombreuses méthodes spectroscopiques, basées sur l'absorption ou l'émission de photons. Il y a généralement peu de biais expérimentaux (mis à part des interférences connues) car seule la nature des éléments et leur concentration est d'intérêt ici.

6.1 Utilité pour l'évaluation des risques

La connaissance de la composition d'un matériau est indispensable pour réaliser une évaluation du risque. Cette caractérisation doit aussi tenir compte des éventuelles impuretés qui, si elles proviennent d'un processus de synthèse catalytique, sont souvent plus réactives que le (nano)matériau étudié lui-même. Sous la rubrique composition on regroupe souvent :

- Les phases cristallines ou amorphes présentes et leurs proportions (par exemple pour le TiO_2 : 10 % phase rutile et 90 % phase anatase) ;
- la nature et le degré d'oxydation des éléments chimiques ;
- et dans certains cas (polymères), la conformation moléculaire.

6.2 Description des principales méthodes de caractérisation

6.2.1 Spectrométrie de masse à source plasma induit (ICP-MS) et Spectroscopie d'émission optique (ICP-OES)

6.2.1.1 Fonctionnement

► Principe physique

Les méthodes à source plasma à couplage inductif permettent de doser un grand nombre d'éléments, avec quelques limites comme par exemple l'hydrogène pour lequel la précision est limitée. La première étape consiste à ioniser l'échantillon dans un plasma à haute température. L'échantillon finement divisé (taille maximale de l'ordre du micromètre) est introduit au centre du plasma et subit un changement de phase : fusion (pour les solides), vaporisation, ionisation puis est dirigé vers le détecteur.

Pour la détection par spectrométrie de masse, les ions sont séparés les uns des autres selon leur masse atomique et leur charge électrique. Dans l'hypothèse où les éléments sont ionisés une fois et que les ions sont filtrés en vitesse avant l'analyse, les éléments sont séparés simplement en fonction de leur masse. L'ICP-MS, en particulier dans son mode particule unique, qui permet de remonter à la taille, est décrit en section 3.2.5 et n'est donc pas repris ici

Pour la spectroscopie OES, l'émission des photons lors du retour des éléments vers leur état fondamental est utilisée pour détecter les éléments présents. Cette longueur d'onde d'émission est en effet spécifique à chaque élément et permet donc son identification. De plus, son intensité permet de quantifier la teneur en cet élément par comparaison à un étalon analysé dans les mêmes conditions.

► Préparation des échantillons

Il est utile d'avoir une idée préalable de la composition chimique des échantillons ; en effet, la préparation de l'échantillon sera différente s'il s'agit par exemple d'un carbure ou d'un carbone. Il convient, avant la mesure, de minéraliser l'échantillon ou de le dissoudre, souvent par l'acide nitrique. Une autre solution robuste et applicable à la quasi-totalité des échantillons est la dissolution par traitement HF, éventuellement assisté d'un traitement micro-onde. Pour certains cas particuliers, il existe des protocoles adaptés (par exemple pour les NTC voir (Ayouni-Derouiche *et al.* 2014)).

► Analyse et exploitation des données brutes

Après la mesure d'une référence choisie par l'opérateur, les appareils commerciaux fournissent directement une mesure quantitative des éléments considérés.

6.2.1.2 Particularités et limites techniques

► Données accessibles

La sensibilité de l'ICP-MS peut aller jusqu'au ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) selon les éléments considérés, alors que celle de l'ICP-OES sera plutôt de l'ordre du ppm (mg/kg).

► Types d'échantillons analysables

Parmi les limites de ces techniques, il est à noter leur caractère destructif, les coûts de fonctionnement et d'entretien des appareils. Dans la majorité des cas, la préparation des échantillons nécessite leur dissolution (on parle souvent de minéralisation) avant analyse, cette étape n'étant pas toujours simple ou connue d'avance. Dans le cas de NTC ou de graphène, l'étape de minéralisation nécessite de mettre en œuvre des températures plus élevées que celles utilisées classiquement pour ce type d'analyse et donc des équipements spécifiques. Des protocoles sont notamment actuellement en cours d'harmonisation au sein du VAMAS⁶ sur ce sujet.

► Autres particularités

6.2.1.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO 17294-1 :2004 Qualité de l'eau — Application de la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) — Partie 1: Lignes directrices générales.

ISO 22036:2008 Qualité du sol — Dosage des éléments traces dans des extraits de sol par spectrométrie d'émission atomique avec plasma induit par haute fréquence (ICP-AES).

ISO/TS 16965:2013 Qualité du sol — Détermination des éléments en traces par spectrométrie de masse avec plasma induit par haute fréquence (ICP-MS).

6.2.1.4 Accessibilité et coûts

Les analyses avec ces appareils sont rapides. Le niveau de compétence requis est intermédiaire. Les appareils ICP-MS et ICP-OES sont répandus à la fois dans les laboratoires de recherche et industriels, le coût d'un ICP-OES étant de l'ordre de 50 k€ et celui d'un ICP-MS de 200/250 k€. Le niveau de compétences requis est intermédiaire.

⁶ Le VAMAS (Versailles Project on Advanced Materials and Standards) a pour objet de promouvoir le commerce mondial par l'innovation en mettant en place des collaborations internationales pour l'harmonisation des méthodes de mesure. Graphene and Related 2D Materials, Technical Work Area 41, <http://www.vamas.org/twa/projects.html>

6.2.2 Spectrométrie par fluorescence X

6.2.2.1 Fonctionnement

▶ Principe physique

La spectrométrie de fluorescence des rayons X (SFX ou FX, ou en anglais XRF pour *X-ray fluorescence*) permet aussi de remonter à la composition chimique de la matière. En effet, lorsque l'on bombarde de la matière avec des rayons X, celle-ci réémet de l'énergie sous la forme, entre autres, de rayons X ; c'est la fluorescence X, ou émission secondaire de rayons X. Le spectre des rayons X émis par la matière est caractéristique de la composition de l'échantillon ; en analysant ce spectre, on peut en déduire la composition élémentaire, c'est-à-dire les concentrations massiques en éléments. L'analyse du spectre peut se faire par dispersion en longueur d'onde (WD-XRF, *wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry*) ou par dispersion en énergie (ED-XRF, *energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry*).

Les appareils dispersifs en énergie permettent une acquisition très rapide (moins de quelques minutes), ils existent sous une forme portable et compacte mais la séparation des éléments n'est pas toujours bonne. La mesure est de première intention, plutôt de type semi-quantitatif.

Les appareils dispersifs en longueur d'onde sont plus encombrants, l'acquisition peut être plus longue mais ils ont une meilleure sensibilité (détection de traces) et une meilleure résolution. Le dosage des éléments peut être considéré comme quantitatif.

Une variante de ces techniques est la spectrométrie de fluorescence des rayons X en réflexion totale (TXRF), qui permet d'atteindre une sensibilité élevée, elle est donc utilisée pour l'analyse de traces. Cette sensibilité est liée à l'angle d'incidence du faisceau primaire, qui est très faible (0,1° à comparer à 45° en XRF). Ainsi, l'essentiel du signal vient de la surface de l'échantillon (quelques nm de profondeur au maximum) avec peu d'interférences, par exemple du substrat.

▶ Préparation des échantillons

Ces méthodes sont adaptées aux échantillons solides. Il est possible de travailler avec des poudres sous forme de pastille, la pastille peut être constituée du matériau pur ou dilué dans un liant. L'analyse de liquides est possible avec la TXRF.

▶ Analyse et exploitation des données brutes

Les appareils fournissent le plus souvent une analyse directe en éléments, sur les modèles portables il n'est généralement pas possible d'accéder aux données brutes.

6.2.2.2 Particularités et limites techniques

▶ Données accessibles

Avec les appareils dispersifs en énergie (portables), la séparation des différents éléments n'est pas toujours bonne à cause des recouvrements de raies. La profondeur d'échantillon analysé est de l'ordre du micron, de quelques nanomètres pour la TXRF.

▶ Types d'échantillons analysables

Ces appareils travaillent sous vide. Il est difficile de détecter les éléments légers *i.e.* jusqu'au magnésium. Le plus souvent, les échantillons sont des solides plans. Les poudres sont analysables sous forme de pastilles. Il peut être possible d'analyser des liquides en les mettant dans une cuve couverte d'un film transparent aux rayons X.

6.2.2.3 Normes associées et documents de référence principaux

ASTM E1621 – 13, *Standard Guide for Elemental Analysis by Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry*.

6.2.2.4 Accessibilité et coûts

Ce type d'analyse est courant en laboratoire et aussi chez des industriels, il existe des appareils portables depuis une vingtaine d'années. Le niveau de compétences requis est intermédiaire.

6.2.3 Diffraction de rayons X (DRX)

Comme les précédentes, cette technique n'est pas spécifique « nano » du point de vue de l'analyse chimique. Cependant, elle se prête bien à l'analyse des tailles de cristallites dans le domaine nanométrique.

6.2.3.1 Fonctionnement

► Principe physique

La diffraction de rayons X sur les solides est une analyse de routine. Un faisceau d'électrons X à partir d'une haute tension et d'une cible (le plus souvent du cuivre, ou du molybdène) est envoyé sur une cible plane. Lorsque ce faisceau, incident avec un angle θ par rapport au substrat, rencontre une structure cristalline, il est diffracté selon la loi de Bragg avec un angle 2θ par rapport au rayon incident. Cette géométrie, connue sous le nom de θ - 2θ , ou Bragg-Brentano, est la plus souvent employée, bien que des géométries en transmission (incidence directe du faisceau sur l'échantillon) peuvent aussi être employées. Cette dernière approche est connue sous le nom de WAXS, pour *Wide Angle X-ray Scattering* ou Diffusion de rayons-X aux grands angles. L'analyse des pics de diffraction permet de remonter aux formes cristallines présentes dans l'échantillon. En ce sens, il apporte des éléments sur l'analyse chimique. La largeur des pics permet aussi d'obtenir, par exemple par le modèle de Scherrer, des informations sur la taille des cristallites. Les informations obtenues peuvent être rapprochées des tailles de grains obtenues par BET et surtout par MET, donnant des informations sur les aspects poly ou monocristaux.

► Préparation des échantillons

Dans une géométrie θ - 2θ , les échantillons doivent le plus souvent être sous forme de poudres aplaties sur un substrat plan. L'utilisation de porte échantillons spécifiques permet l'analyse de poudres sans préparation particulière. En mode WAXS, il est possible de travailler avec des poudres mais aussi, et surtout, avec des dispersions liquides, plus difficiles à mettre en œuvre sur un appareil en géométrie θ - 2θ . Des portes-échantillons de type capillaires en verre borosilicaté, ou l'utilisation de deux films en plastiques transparents aux rayons-X (par exemple, Kapton) peuvent être utilisés. La quantité d'échantillon varie entre le gramme en mode θ - 2θ et le mg en mode WAXS, bien que des porte-échantillons adaptés permettent l'analyse au mg en géométrie θ - 2θ . Le mode WAXS est particulièrement intéressant sur des échantillons sensibles à l'air (possibilité de sceller les capillaires).

► Analyse et exploitation des données brutes

On obtient des pics de diffraction en fonction de l'angle d'analyse, les formes cristallines peuvent être identifiées par comparaison avec une base de données contenant les diagrammes de milliers de substances connues (fiches ICDD⁷). Dans certains cas, on ne trouvera que des fiches théoriques (calculées). Cette technique permet donc d'accéder indirectement à la nature chimique via l'identification des phases cristallographiques.

⁷ <http://www.icdd.com/index.php/how-to-cite-the-pdf/>

6.2.3.2 Particularités et limites techniques

► **Données accessibles**

Il est généralement possible d'accéder à la nature de la phase cristalline mais aussi à la taille des cristallites et, en cas de mélange de phases, aux proportions entre les deux (ou plusieurs) phases.

► **Types d'échantillons analysables**

Cette méthode est adaptée aux échantillons sous forme de poudres, solides en θ - 2θ , poudres et suspensions pour le WAXS.

► **Autres particularités**

Cette technique sonde typiquement quelques micromètres de la matière et nécessite une surface (et donc une quantité de matière) relativement importante (plusieurs mm^2) en mode θ - 2θ par rapport au mode WAXS (quelques grains de poudre suffisent).

La DRX, quel que soit son mode de travail, est presque inutile lorsque la taille des cristallites se situe en dessous de quelques nm. En effet, la largeur des raies, dépendant de l'inverse de la taille des cristallites, devient significativement large pour être analysée ou même observée. Ce biais devient donc crucial pour l'analyse de nanoparticules individuelles ou d'agrégats dont la taille des cristallites descend en dessous de 2-3 nm. Pour résoudre ce problème, il convient d'utiliser des techniques d'analyse avancées et peu courantes de type PDF, *Pair Distribution Function*, ou distribution de fonctions de paires.

6.2.3.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO 16258-1:2015 Air des lieux de travail — Fraction alvéolaire de la silice cristalline par diffraction de rayons X — Partie 1: Méthode directe d'analyse sur filtre.

ISO 16258-2:2015 Air des lieux de travail — Fraction alvéolaire de la silice cristalline par diffraction de rayons X — Partie 2: Méthode indirecte d'analyse.

ISO 24095:2009 Air des lieux de travail — Lignes directrices pour le mesurage de la fraction alvéolaire de la silice cristalline.

6.2.3.4 Accessibilité et coûts

De très nombreux appareils en mode θ - 2θ sont commercialisés, ils permettent d'atteindre une résolution plus ou moins bonne. Un appareil de routine permet une analyse de phases cristallines en configuration θ - 2θ en quelques dizaines de minutes. Notons depuis quelques années l'arrivée sur le marché d'analyseurs fonctionnant avec un couple courant-tension inférieur au seuil de déclaration à l'ASN. Les compétences de mise en œuvre requises sont de niveau intermédiaire. Les appareils en géométrie WAXS sont en revanche peu répandus. Ils sont souvent couplés au mode SAXS (paragraphe 3.2.8) et ils se situent sur des lignes de lumière synchrotron ou alors sur des plateformes d'analyse SAXS-WAXS (par exemple Paris Saclay).

6.3 **Autres techniques innovantes**

En complément des techniques d'analyses courantes décrites ci-dessus, il faut citer une technique à l'accès plus confidentiel (uniquement en synchrotron) et nécessitant une expertise de pointe, mais au potentiel très fort dans le domaine des nanomatériaux. L'imagerie et tomographie par nano-sonde à rayons-X permet de combiner la reconstruction 3D d'un objet/matériau avec sa composition cartographie chimique. Exception faite d'une accessibilité très limitée, raison pour laquelle nous l'isolons du reste, cette technique combine tous les avantages des techniques de visualisation décrites dans la section 3.2 avec ceux des techniques spectroscopiques décrites dans les sections 5.2 et 6.2 :

- la résolution est de l'ordre de 30 nm et peut descendre jusqu'à quelques nanomètres, selon les performances de la ligne de lumière et du synchrotron ;
- une hypothèse sur la forme n'est pas nécessaire. Tout matériau quelle que soit sa forme peut être étudié ;
- s'agissant d'une technique de tomographie, on obtient une reconstruction en 3D de l'objet, de ses constituants primaires ainsi que de sa cartographie chimique ;
- il n'y a pas de limite haute ou basse en matière de quantité analysée. Il est possible de travailler avec quelques mg d'échantillon et jusqu'à des objets de taille au-delà du cm ;
- le temps d'acquisition est très rapide, de l'ordre de quelques dizaines de minutes. Bien que l'analyse des données brutes soit complexe, elle est réalisée par le responsable de ligne ;
- l'accessibilité est restreinte, mais la technique existe sur plusieurs synchrotrons européens : ligne Nanoscopium à SOLEIL⁸ (France), ID16 à l'ESRF⁹ (France), cSAXS beamline at PSI (Suisse)¹⁰.

⁸ <https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/lignes-de-lumiere/nanoscopium>

⁹ <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments/XNP/ID16A>

¹⁰ <https://www.psi.ch/en/sls/csaxs>

7 Chimie / analyse de surface

7.1 Utilité pour l'évaluation des risques

En général, on entend par caractérisation de la chimie de surface la caractérisation des fonctionnalisations et/ou des revêtements de surface. Du point de vue de l'évaluation du risque, les surfaces hydrophobes attirent plus l'attention pour leur potentiel réactif dans les milieux biologiques. Les caractéristiques des propriétés de surface des nano-objets sont importantes pour évaluer leur comportement dans les milieux aqueux (stabilité, agglomérats), les interactions avec les protéines (couronnes, ou *corona* en anglais) et les membranes cellulaires (internalisation). La modification de la chimie de surface d'un matériau est également une voie souvent proposée pour modifier ou atténuer le potentiel toxique de certains (nano)matériaux (approche "*safer by design*").

7.2 Description des principales méthodes de caractérisation

En général, les techniques dites « de surface » sondent typiquement une épaisseur de quelques nm à la surface de l'échantillon. Les plus courantes sont :

- la spectrométrie d'électrons Auger (AES), qui détecte les électrons émis par la matière lors de la désexcitation après interaction avec un rayonnement X. Les informations sont souvent complexes à traiter. Cette technique ne sera pas détaillée ;
- la spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS) ;
- la spectrométrie de photoélectrons X (XPS / ESCA) - *X-ray photoelectron spectroscopy* ou *electron spectroscopy for chemical analysis*. Ces deux dernières techniques (XPS et SIMS) sont souvent utilisées de façon complémentaire.

7.2.1 Spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS)

7.2.1.1 Fonctionnement

► Principe physique

La technique SIMS est une technique d'analyse *in situ* destructive. Elle permet de détecter tous les éléments du tableau périodique avec une sensibilité variable pouvant atteindre les 10 ppb atomiques. On mesure l'intensité du faisceau d'ions secondaires produit par l'abrasion de l'échantillon à analyser par des ions primaires, en général des ions oxygène, césium ou argon. Ce faisceau peut être statique ou bien balayer la surface de l'échantillon sur une zone carrée comprise entre quelques micromètres et quelques centaines de micromètres. La vitesse d'abrasion de l'ordre du nanomètre par seconde est ajustée en jouant sur l'intensité du faisceau primaire, la taille du balayage et les potentiels d'accélération des ions. L'analyse SIMS laisse donc un cratère dans l'échantillon analysé. La résolution latérale est inférieure au micron.

► Préparation des échantillons

C'est une technique d'analyse sous vide qui se prête bien à l'analyse des solides, les poudres déposées sur membrane ou sous forme de pastille peuvent aussi être analysées. La planéité de l'échantillon est un paramètre important (source d'incertitudes de mesures).

► **Analyse et exploitation des données brutes**

L'analyse du spectre d'absorption obtenu requiert l'identification des raies d'absorption spécifiques aux éléments recherchés, dont l'intensité de chacune permet d'atteindre des données quantitatives relatives aux éléments en question.

7.2.1.2 Particularités et limites techniques

► **Données accessibles**

Cette technique permet de réaliser des profils de concentration élémentaire en profondeur, avec une résolution en profondeur de quelques nanomètres, sur une profondeur totale de l'ordre du micromètre. Elle permet également de réaliser des cartographies élémentaires avec une résolution latérale de l'ordre du micromètre, voire moins.

► **Types d'échantillons analysables**

Le SIMS est une technique d'analyse destructive, l'échantillon doit être mis sous vide. Un échantillon préparé pour une analyse par SIMS doit être solide, plan, poli, électriquement conducteur ou semi-conducteur.

► **Autres particularités**

Un échantillon étalon est indispensable pour une caractérisation quantitative.

7.2.1.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO 18115-2 :2013 - Analyse chimique des surfaces — Vocabulaire — Partie 2: Termes utilisés en microscopie à sonde à balayage.

ISO18116 :2005 - Analyse chimique des surfaces — Lignes directrices pour la préparation et le montage des échantillons destinés à l'analyse.

ISO 18117 :2009 - Analyse chimique des surfaces — Manipulation des échantillons avant analyse.

7.2.1.4 Accessibilité et coûts

L'accessibilité requiert un niveau de compétence élevé.

7.2.2 **Spectrométrie photoélectronique (XPS)**

7.2.2.1 Fonctionnement

► **Principe physique**

Lorsque les rayons X frappent la matière, ils éjectent des électrons par effet photoélectrique ; on les appelle photoélectrons. Si l'on utilise une source monochromatique de rayons X, et que l'on analyse l'énergie cinétique des électrons éjectés, alors l'énergie de liaison électron/noyau est la différence entre l'énergie cinétique de l'électron et l'énergie du photon X. Cette énergie est propre à chaque élément ainsi qu'à son environnement, la mesure de la vitesse de l'électron nous donne donc la nature chimique de l'atome auquel l'électron a été arraché, ce qui permet de déterminer la composition de l'échantillon.

L'absorption des électrons par la matière est très importante, on n'aura donc accès qu'aux électrons issus des quelques premiers nanomètres de l'échantillon.

► Préparation des échantillons

C'est une technique d'analyse sous vide qui se prête bien à l'analyse des solides, les poudres déposées sur membrane ou sous forme de pastille peuvent aussi être analysées. La planéité de l'échantillon est un paramètre important (source d'incertitudes de mesures).

► Analyse et exploitation des données brutes

Les données sont obtenues sous forme de spectres. L'analyse chimique est relativement aisée par la mesure des intégrales des spectres, sous réserve de tenir compte de l'efficacité de réponse de chacun des éléments. Les appareils donnent automatiquement le résultat de cette mesure. En ce qui concerne l'environnement chimique, le traitement est plus complexe et est souvent fait directement par l'opérateur. Chaque pic d'un élément peut en effet être composé de plusieurs pics qui se chevauchent, chacun d'entre eux correspondant à un environnement différent.

7.2.2.2 Particularités et limites techniques

► Données accessibles

Cette technique permet d'identifier les liaisons et types d'atomes en surface dans les échantillons étudiés ainsi que d'obtenir des informations sur les types de liaisons engagées (niveaux d'oxydation d'un élément donné par exemple). On considère qu'il s'agit d'une technique de surface car les photoélectrons produits en XPS donnent des informations sur une profondeur de 5 à 10 nm de solides. Lorsqu'une source de type rayonnement synchrotron est utilisée, on peut accéder à des profondeurs plus grandes (micromètre).

► Types d'échantillons analysables

Pour une analyse qualitative, l'élément doit avoir une concentration plus élevée que 0,1 %, tandis qu'une analyse quantitative peut être effectuée si 5 % de l'élément est présent. Notons que seules les surfaces planes se prêtent bien à l'analyse quantitative. La rugosité de certains échantillons peut poser problème.

► Autres particularités

L'analyse quantitative et, dans une certaine mesure l'analyse qualitative, sont peu fiables sur l'atome de carbone, et cela à cause des impuretés carbonées omniprésentes dans tout matériau. L'analyse de liaisons spécifiques (e.g., esters, amides...) par rapport à des liaisons plus courantes (C-C) doit être privilégiée pour minimiser les artefacts.

L'analyse quantitative des spectres doit être effectuée avec le plus grand soin car la résolution spectrale est généralement mauvaise, ce qui entraîne des superpositions de pics et la nécessité d'effectuer un travail de déconvolution.

L'analyse quantitative nécessite un échantillon étalon interne, mais elle donne accès non seulement à la composition mais aussi à l'épaisseur (nécessité d'avoir un support plan).

7.2.2.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO 16243:2011 Analyse chimique des surfaces — Enregistrement et notification des données en spectroscopie de photoélectrons par rayons X (XPS).

7.2.2.4 Accessibilité et coûts

Ces appareils sont très utilisés en laboratoire de recherche. Le coût est de quelques centaines de k€. Un niveau de compétence élevé est nécessaire. L'accessibilité pose cependant souvent problème dans le cas de l'analyse de poudres, du fait du risque élevé de contamination de l'équipement en cas de mauvaise préparation d'échantillon. Les pannes sont fréquentes.

7.2.3 Spectrométries vibrationnelles (FTIR / Raman)

7.2.3.1 Fonctionnement

▶ Principe physique

Ces deux techniques (non spécifiques aux nano) sont tout à fait complémentaires et permettent d'obtenir des informations sur les liaisons de surface dans les échantillons. Elles sont basées sur les états vibrationnels des liaisons présentes dans les espèces en cours d'analyse et sont non destructives. Dans le cas de l'infrarouge, on peut penser à l'ATR qui ne nécessite aucune préparation d'échantillon et permet l'analyse de solides ou de suspensions.

Lors de la pénétration du faisceau incident dans le cristal, celui-ci subit une réflexion totale atténuée à l'interface entre le cristal et l'échantillon, avant d'être capté par le détecteur. Ainsi, au contraire de l'analyse par transmittance, l'ATR offre une pénétration limitée dans l'échantillon. Ceci permet de ne pas atténuer le signal et d'être capable d'analyser des échantillons plus absorbants, comme dans certaines solutions aqueuses. Le produit à analyser est déposé sur le cristal et la principale contrainte est un bon contact sur toute la surface du cristal. Les solides doivent bien épouser toute la surface de contact du cristal.

En Raman, le micro-Raman est devenu d'usage courant grâce à de nouvelles optiques qui permettent d'analyser de petites zones de matière et de « cartographier » une surface.

▶ Préparation des échantillons

Pour l'infrarouge, si l'on travaille en transmission, la méthode la plus courante pour les poudres est de réaliser une pastille contenant une fraction du matériau à analyser diluée dans une matrice KBr. Ce type de préparation convient bien aux poudres. Les liquides peuvent être analysés dans une cuve transparente au rayonnement infrarouge.

Pour le Raman, les poudres sont également bien adaptées. Il suffit de les déposer sur un substrat plan (ne donnant pas de contribution au signal Raman), typiquement une simple lame de verre. Le Raman est particulièrement adapté à des études en milieu aqueux *via* l'utilisation de sondes à immersion, et il est facilement couplé à un microscope optique.

▶ Analyse et exploitation des données brutes

Les données se présentent sous forme de spectres d'absorption en fonction de la longueur d'onde. Chaque pic est associé à une liaison chimique donnée et la lecture et l'analyse sont très simples, par comparaison avec des données tabulées.

7.2.3.2 Particularités et limites techniques

▶ Données accessibles

Ces deux techniques (non spécifiques aux nano) sont tout à fait complémentaires et permettent d'obtenir des informations sur les liaisons covalentes (en particulier l'infrarouge) mais aussi, dans une moindre mesure, sur les interactions faibles entre groupements chimiques (par exemple, liaison hydrogène).

▶ Types d'échantillons analysables

La nature des échantillons peut être très variée : poudres, liquides, matériaux massiques... Les quantités nécessaires sont dans les deux cas de l'ordre du mg.

▶ Autres particularités

La spectroscopie Raman est particulièrement adaptée à l'étude des matériaux carbonés, tels que les nanotubes ou le graphène. L'analyse des bandes D et G du carbone fournit en effet de précieuses informations sur l'organisation des objets. Il faut cependant être prudent car, par

exemple, le changement de la longueur d'onde d'excitation pourra conduire à une réponse différente des matériaux étudiés. Ceci est particulièrement vrai pour les matériaux carbonés. Par ailleurs, l'intensité du laser d'excitation peut modifier l'échantillon pendant la mesure. En effet, la puissance du rayon laser peut poser un problème pour des échantillons organiques, qui ont tendance à se dégrader sous le faisceau très rapidement.

L'analyse de solutions aqueuses est particulièrement problématique en infrarouge (forte adsorption de la part de l'eau), mais tout à fait courante en Raman.

7.2.3.3 Normes associées et documents de référence principaux

ISO/TS 80004-13 :2017 Nanotechnologies — Vocabulaire — Partie 13: Graphène et autres matériaux bidimensionnels.

7.2.3.4 Accessibilité et coûts

Ces dispositifs sont très répandus dans les laboratoires de recherche ou industriels, leur coût peut très sensiblement varier en fonction des options, mais il est typiquement de l'ordre de la centaine de k€ pour un modèle de base en Raman. La compétence requise pour utiliser un spectromètre infrarouge est intermédiaire alors qu'elle est plus élevée pour une analyse Raman.

8 Charge de surface : potentiel zéta

Les caractéristiques des propriétés de surface des nano-objets sont importantes pour évaluer leur comportement dans les milieux liquides, en particulier aqueux (stabilité, agglomérats), les interactions avec les protéines (*corona*) et les membranes cellulaires (internalisation). La charge de surface a un impact sur le potentiel d'agglomération de particules ainsi que sur leur interaction avec les protéines et donc l'internalisation dans les cellules. Elle est donc considérée comme un paramètre important pour « prédire » le potentiel d'internalisation et d'accumulation des particules dans les cellules et les systèmes biologiques. Cependant, c'est un paramètre dont les valeurs sont instables et dépendantes de l'environnement direct du nanomatériau. Son importance pour une évaluation prédictive est donc difficile à établir.

La détermination de la charge de surface est surtout recommandée pour évaluer la stabilité d'une dispersion de particules dans le cas d'études toxicologiques en laboratoire. Elle est généralement caractérisée par la mesure du potentiel zéta. Le potentiel zéta correspond au potentiel électrique mesuré au niveau du diamètre hydrodynamique (voir DLS) de particules en suspension dans un liquide. Il permet ainsi de rendre compte des interactions entre les particules et les espèces chargées présentes en solution. Ce potentiel varie en fonction du pH. Pour les études de milieu biologique, on se fixe le plus souvent un pH proche de 7. Il est généralement recommandé d'ajouter un sel dissout en concentration « majoritaire » afin de tamponner la force ionique, en particulier lorsque des mesures à différents pH sont réalisées (par ajout d'une base ou d'un acide).

Il est admis que la stabilité des suspensions de nanoparticules diminue généralement très vite avec l'augmentation de la force ionique. Le potentiel zéta est exprimé en mV et peut être positif ou négatif. On admet que pour des valeurs absolues au-delà de 30 mV, les suspensions sont généralement considérées comme stables. Il existe différents modèles permettant de calculer le potentiel zéta en fonction de la mobilité électrophorétique, le plus commun étant celui de Smoluchowski. Son application nécessite cependant de connaître la permittivité électrique (dont la valeur est souvent inconnue pour les nanomatériaux) et la viscosité du milieu qui peut varier avec la concentration en nanomatériaux.

S'il s'avère qu'à pH 7 le potentiel zéta est inférieur à 30 mV en valeur absolue, il est probable que les particules s'agglomèrent rapidement et qu'on ne puisse travailler avec une suspension stable et bien caractérisée.

Il est recommandé de détailler précisément tous les paramètres expérimentaux lorsqu'une valeur de potentiel zéta est fournie. Des études comparatives inter-laboratoires (Lamberty *et al.* 2011, Roebben *et al.* 2011) ont mis en évidence que, même lorsque toutes les précautions sont prises (matériau « de référence », conditions de pH et de force ionique précises), les mesures de potentiel zéta sont relativement dispersées. En pratique, il ne semble donc pas que ces mesures soient réellement reproductibles.

Il faut tout de même être prudent sur les valeurs absolues de potentiel zéta, car ce dernier est calculé à partir de la mobilité électrophorétique pondérée par le rayon de l'objet. Une forte incertitude sur ce dernier, surtout dans le cas d'objet agrégés, agglomérés ou avec un facteur de forme important, conduit à des valeurs absolues erronées, bien que la valeur de la charge reste correcte. Il est donc plus judicieux de ne garder que la valeur de mobilité électrophorétique comme utile.

8.1 Utilité pour l'évaluation des risques

La charge de surface est souvent considérée comme un paramètre important pour « prédire » le potentiel d'internalisation et d'accumulation des particules dans les cellules et les systèmes biologiques. La charge de surface a un impact sur le potentiel d'agglomération de particules ainsi que sur leur interaction avec les protéines et donc l'internalisation dans les cellules. Cependant, c'est un paramètre dont les valeurs sont instables et dépendantes de l'environnement direct du nanomatériau (en particulier le pH et la force ionique). Son importance pour une évaluation prédictive est donc difficile à établir.

8.2 Description des principales méthodes de caractérisation

8.2.1 Mobilité électrophorétique

Une méthode de mesure décrite par la norme ISO 13099-2:2012 est basée sur la mesure de la mobilité électrophorétique des NOAA placés dans un champ électrique par analyse de phase de la lumière diffusée. Reconnue par les autorités de santé, cette méthode est bien implantée dans les laboratoires de recherche et dans l'industrie et elle est souvent mesurée avec un appareil de DLS standard. Cependant, il peut être noté qu'aucun critère de qualité destiné à juger de la fiabilité des données produites par cette méthode n'est donné dans la littérature. Certains travaux ont néanmoins permis de définir des critères qualité et d'identifier certaines précautions expérimentales (Varenne *et al.* 2015).

Les principales normes applicables sont les suivantes :

- ISO 13099-2:2012 - Systèmes colloïdaux — Méthodes de détermination du potentiel zêta — Partie 2: Méthodes optiques.
- ISO 13099-1:2012 - Systèmes colloïdaux — Méthodes de détermination du potentiel zêta — Partie 1: Phénomènes électroacoustiques et électrocinétiques.
- ISO 13099-3:2014 - Systèmes colloïdaux — Méthodes de détermination du potentiel zêta — Partie 3: Méthodes acoustiques.
- ISO/TR 19997:2018 : Lignes directrices relatives aux bonnes pratiques pour la mesure du potentiel zêta.

9 État d'agglomération et d'agrégation

L'état d'agrégation et l'état d'agglomération décrivent la présence d'agrégats et d'agglomérats dans un milieu donné et relèvent d'interactions chimiques (liaisons covalentes) ou physicochimiques (électrostatiques) entre objets. Il décrit également la taille et le nombre de ces objets et idéalement leur forme. Il faut donc caractériser ces états avec des techniques capables de mesurer des distributions de taille et idéalement de forme.

9.1 Utilité pour l'évaluation des risques

L'état d'agglomération du matériau est une information importante pour caractériser l'exposition réelle de l'organisme. La propension qu'ont les particules à s'agglomérer et se désagglomérer a un impact sur la taille réelle des particules auxquels l'organisme, l'environnement, est exposé. De même, en ce qui concerne les aérosols, il a déjà été montré pour certains matériaux (par exemple les nanotubes de carbone), que des agglomérats se formaient rapidement et que les tailles de particules mesurées près de la source n'étaient plus du tout pertinentes pour une évaluation de l'exposition d'un opérateur situé à un mètre ou deux de celle-ci. Par ailleurs, la stabilité des agglomérats inhalés et ingérés est difficile à évaluer, mais cette information n'en demeure pas moins importante pour estimer l'exposition réelle de l'organisme.

9.2 Description des principales méthodes de caractérisation

Les techniques incapables de différencier des particules individuelles d'agrégats ou d'agglomérats peuvent cependant être utilisées dans des cas particuliers, notamment si l'état d'agrégation et/ou d'agglomération varie dans le temps et que les techniques sont suffisamment rapides pour saisir une évolution d'une distribution granulométrique : par exemple en DLS, PTA ou SAXS.

Les techniques d'imagerie directe (microscopies électroniques, AFM) sont à privilégier puisque ce sont les seules qui peuvent discriminer les particules individuelles de leurs agrégats et agglomérats.

Dans tous les cas, il faut apporter un soin particulier à la préparation de l'échantillon : l'utilisation d'ultrasons casse en général les agglomérats mais pas les agrégats, il faut donc ajuster l'énergie apportée lors de l'étape de dispersion des particules à l'objectif de la caractérisation. Cependant, les agrégats étant beaucoup moins sensibles que les agglomérats aux conditions physicochimiques du milieu dispersant, il vaut mieux porter l'accent sur leur caractérisation, et donc s'efforcer de désagglomérer suffisamment la dispersion.

Les principes de mesure et limites sont ceux des techniques correspondantes, déjà décrites plus haut.

10 Dispersibilité - solubilité

10.1 Utilité pour l'évaluation des risques

La dispersibilité est décrite comme le degré auquel un matériel peut être dispersé uniformément dans une matrice (matériau, solvant). Elle est exprimée de la même manière que la solubilité, avec une masse ou une concentration maximum de matériau qui peut être dispersée dans un volume ou une masse de milieu. La dispersibilité n'est pas un paramètre intrinsèque, puisqu'elle dépend à la fois des caractéristiques de la substance et de celles du solvant ou du milieu dispersant dans lequel elle est introduite. Le résultat de la mesure de ces paramètres est donc intimement lié aux conditions physicochimiques de la mesure, qui doivent être parfaitement décrites (nature du solvant ou du milieu dispersant, pH, force ionique, présence d'additifs éventuels...). En outre, la dispersibilité n'est pas mesurée de manière directe et *via* une méthode standardisée. Cependant, les techniques utilisées sont finalement les mêmes que pour la détermination de la distribution des tailles (DLS), même si d'autres peuvent être utilisées comme la rhéologie, la microscopie et la colorimétrie, la sédimentation ou encore la turbidimétrie (Goalard 2005).

À noter que la notion de dispersibilité est différente de celle de solubilité, qui est définie comme étant la capacité d'une substance à se dissoudre dans un solvant. Cette dernière peut être mesurée en masse ou concentration de matériau dans une unité de masse ou un volume de solvant, une des méthodes utilisées pour la mesure de la solubilité peut être l'ICP-MS.

Également de nature extrinsèque, la solubilité constitue un paramètre d'importance pour déterminer la nature particulaire ou non de l'exposition et donc, la nécessité de recourir ou non à une évaluation des risques nanospécifique. Dans le cas d'un matériau soluble dans un milieu aqueux ou biologique, sa nature particulaire n'est plus pertinente, on considère alors sa forme moléculaire ou ionique et l'évaluation du risque ne diffère pas de celle réalisée pour les formes physiques non nanométriques (habituelles) du matériau. La solubilité peut également être un facteur à considérer dans une évaluation des risques nanospécifique (atteinte de compartiments biologiques sous forme nanoparticulaire puis dissolution suivant des conditions particulières dans ces compartiments et potentiellement phénomènes de recristallisation sous une autre forme nano cristalline).

La caractérisation de ce paramètre doit ainsi être réalisée au regard de conditions externes précises (nature du solvant, pH, force ionique, etc.) spécifiques aux situations étudiées (voies d'exposition, conditions d'exposition, etc.). Par conséquent, de par sa nature extrinsèque, ce paramètre ne peut pas être considéré comme un critère d'identification d'un nanomatériau en abstraction de ces conditions environnementales.

Dans le cas d'un matériau soluble, le seul impact de la réduction du matériel à l'échelle nanométrique sera une plus grande rapidité de dissolution.

Solubilité et dispersibilité sont traités simultanément dans le document de l'ISO (ISO/TR 13014) car il y est considéré qu'il est souvent difficile en pratique de faire la différence entre une solution colloïdale (qui est à proprement parler une suspension stable et bien dispersée de nanoparticules) et une solution.

10.2 Description des principales méthodes de caractérisation

L'évaluation de la dispersibilité nécessite tout d'abord de disperser la substance dans le milieu dispersant (en utilisant un apport d'énergie contrôlé et connu, par exemple par l'intermédiaire

d'ultrasons). Un prélèvement est ensuite effectué dans l'échantillon homogène et caractérisé immédiatement en matière de distribution de tailles de particules élémentaires, d'agrégats et d'agglomérats. Les techniques utilisées sont les mêmes que celles décrites ci-dessus aux chapitres 3 et 9. La température joue un rôle particulièrement important.

Une limitation importante qui intervient ici est la stabilité de la dispersion. En effet, si la substance possède une forte tendance à l'agglomération dans les conditions physicochimiques du test, sa dispersibilité va évoluer (se dégrader) dans le temps puisque la taille caractéristique des éléments en dispersion va croître. Si l'on veut caractériser une dispersibilité de façon répétable, il faut donc maîtriser le facteur temps lors de la mesure, ou bien disposer de protocoles de ré-homogénéisation fiables appliqués juste avant toute caractérisation. Le protocole OCDE 318¹¹ donne une méthodologie pour suivre par spectrophotométrie UV le comportement d'échantillons de NOAA dans un milieu environnemental simulé contenant des matières organiques en suspension. Cette approche n'est néanmoins valable que pour des nanomatériaux présentant une densité supérieure à 1. Dans le cas contraire, des méthodes alternatives doivent être considérées, comme celles basées sur la sédimentation, qui consisteront à suivre dans le temps, *via* des mesures DLS, l'augmentation de la taille des agglomérats dans le milieu considéré. Certains nouveaux équipements dans le domaine des techniques optiques (SMLS / *Static Multiple Light Scattering*) commencent cependant à voir le jour et permettent de suivre la distribution de tailles de NOAA dans le temps et dans la colonne d'eau, apportant de précieuses informations sur les questions de dispersibilité et de solubilité. Une norme à ce sujet est en cours de préparation au sein de la normalisation internationale (ISO/AWI TS 21357 Nanotechnologies - Évaluation de la taille moyenne des nano-objets dans les dispersions liquides par diffusion statique multiple de la lumière (SMLS)).

En ce qui concerne la solubilité, il est possible de mentionner que la technique sp ICP-MS permet de suivre, dans certains cas, pour un élément donné, l'évolution dans le temps des teneurs de ce dernier entre la phase dissoute et la phase particulaire. Des informations sur la solubilité peuvent ainsi être déterminées. Les avantages et limitations de la technique sp ICP-MS sont données dans les chapitres qui précèdent.

Notons l'existence sur le marché d'appareils modernes permettant de suivre facilement dans le temps la variation de la stabilité d'une suspension (courbes de sédimentation par exemple).

¹¹ OECD Guideline for the testing of chemicals, TG 318, Dispersion stability of nanomaterials in simulated environmental media, 2017

11 Détermination de l'aspect nanométrique d'un échantillon : recommandations et arbre de décision

Compte tenu de la multitude d'approches analytiques disponibles pour beaucoup des paramètres à déterminer et des domaines d'applicabilité respectifs de ces différentes techniques (pas toujours connus ou encore évalués de façon solide), l'obtention de données fiables passe très souvent par le recours à plusieurs techniques complémentaires. Ce constat s'applique en particulier aux questions de tailles/distributions de tailles et de chimie de surface. Selon la forme dans laquelle l'échantillon se trouve (poudre ou dispersion en milieu liquide), les techniques à privilégier ne seront par ailleurs pas forcément les mêmes.

L'ensemble de ces techniques est très utile pour la caractérisation complète des nanomatériaux, par exemple dans le cadre de la déclaration annuelle dans le registre R-Nano. En revanche, elle n'est pas forcément nécessaire pour déterminer la nature « nano » d'une substance. Dans ce cas particulier, une approche simplifiée peut être mise en œuvre et un arbre de décision (*cf.* Figure 14) est proposé et discuté dans cette section.

Des éléments succincts sur les approches à privilégier pour le cas central de la caractérisation de la taille et de la distribution de tailles sont précisés dans ce qui suit, avec quelques contre-exemples soulignant le fait qu'il n'y a pas d'approche universelle. De façon générale, il convient de mettre en œuvre au moins deux techniques, l'une d'elles devant être de la microscopie électronique (MEB ou MET)¹². La Figure 14 ci-après, extraite des conclusions du projet européen NanoDefine, présente l'arbre de décision qui y a été développé pour avancer dans l'étude de la classification d'une substance comme nanomatériau ou non selon la recommandation de définition de la Commission Européenne.

¹² EFSA Journal 2018, "Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health"

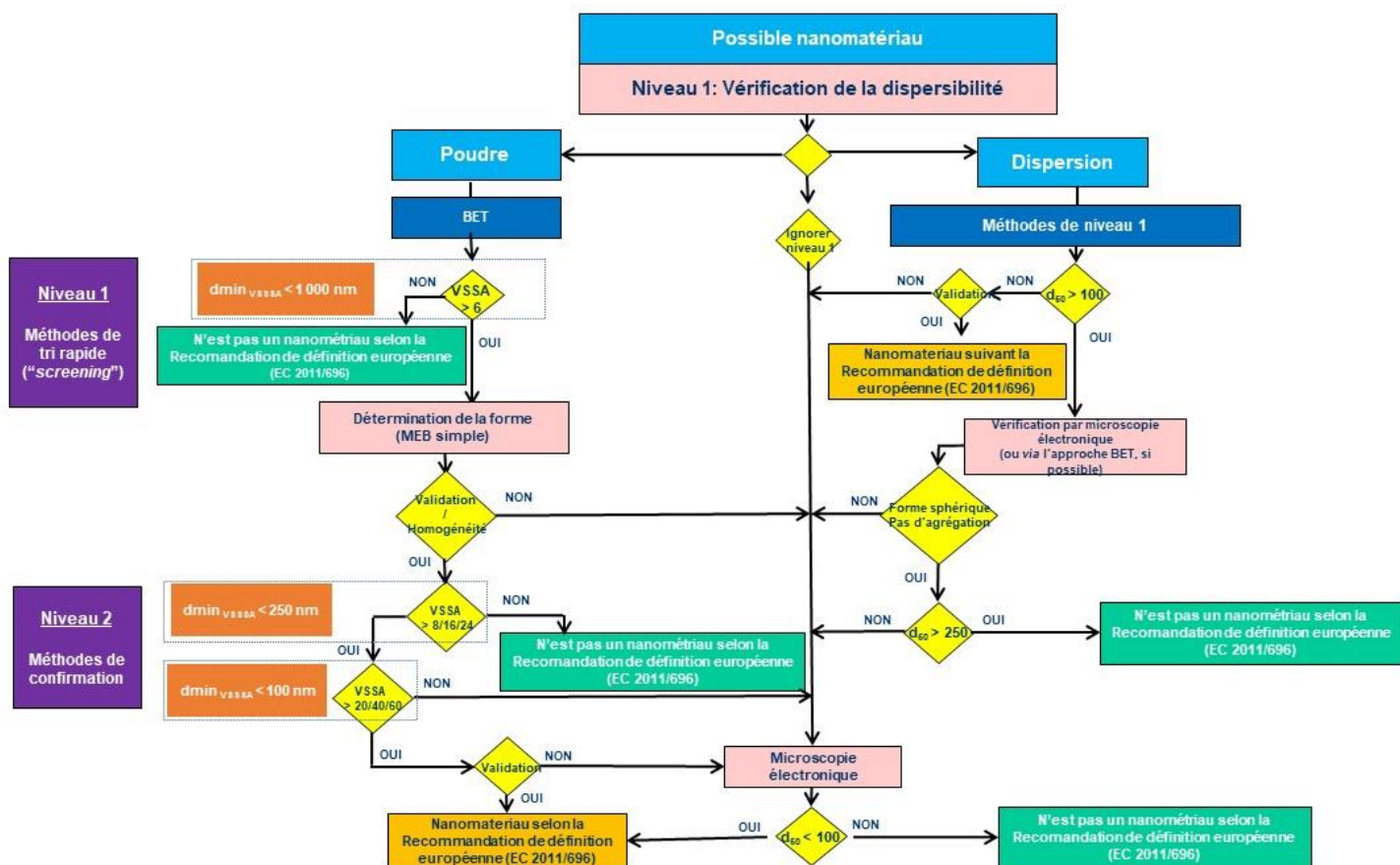


Figure 14 : Arbre de décision pour appuyer la classification d'une substance chimique comme nanomatériau ou non, selon la recommandation de définition de la Commission Européenne (extrait traduit du projet européen NanoDefine)

11.1 Cas général

Dans le cas des poudres, une approche échelonnée combinant en première intention une caractérisation de l'aire de surface spécifique volumique (VSSA en m^2/cm^3) par méthode BET, suivie d'une caractérisation par microscopie électronique (MEB ou MET) permet, dans une grande majorité de cas, de pouvoir statuer sur la classification d'une substance particulière donnée comme étant un nanomatériau ou non selon la Recommandation de définition EC 2011/696. Il faut noter que le passage de la surface spécifique obtenue au BET (m^2/g) à la VSSA exprimée en m^2/cm^3 implique de connaître la densité réelle, alors qu'il existe plusieurs mesures dans le cas des poudres (densité tassée ou non, différents équipements de mesure).

La méthode BET est en effet très reproductible (Hackley et Stefaniak 2013), des normes existent sur le sujet depuis plusieurs années et l'obtention d'une VSSA supérieure à $60 m^2/cm^3$ est l'un des critères indiqués dans la définition d'une nanoforme. La réciproque n'est cependant pas vraie, une nanoforme pouvant avoir une VSSA inférieure à cette valeur seuil. La connaissance de la densité réelle de la poudre (mesurée le plus souvent par pycnométrie Hélium) et de l'éventuelle porosité des particules est par ailleurs indispensable au calcul de la VSSA. Le projet NanoDefine¹³ ainsi que des travaux de l'INRS (Dazon *et al.* 2019) ont permis de raffiner cette approche en donnant une méthodologie, validée par des résultats de microscopie électronique, permettant de

¹³ www.nanodefine.eu

s'affranchir de l'impact sur le résultat obtenu de la forme des particules (sphérique, bâtonnet, plaquette).

Cette méthodologie, publiée par Wohlleben *et al.* (Wohlleben et al. 2017), définit plusieurs cas de figure :

- a) Si le diamètre D_m dérivé des mesures BET est supérieur à 1 000 nm, la substance ne sera pas à considérer comme un nanomatériau du point de vue de la Recommandation de définition EC 2011/696.
- b) Si le diamètre D_m dérivé des mesures BET est inférieur à 1 000 nm, il convient alors de déterminer la forme des particules *via* la réalisation d'images par microscopie électronique (MEB ou MET) afin de déterminer le facteur correctif à appliquer. Ce dernier est un nombre entier (1, 2 ou 3) correspondant aux nombres de dimensions D des particules inférieures à 10 nm. Dans le cas de particules sphériques ou quasi sphériques D = 3, dans le cas de particules allongées, D = 2 et dans le cas de plaquettes D = 1 (Figure 1).

Il est ainsi possible de corriger la valeur de Dm pour obtenir la plus petite dimension d'une particule Dmin VSSA, selon l'équation ci-après :

$$D_{min\ VSSA}(D) = 2\ 000 \times D / VSSA$$

- Si le diamètre corrigé obtenu par BET, $D_{min\ VSSA}$, est inférieur à 100 nm, **la substance sera à considérer comme un nanomatériau** du point de vue de la Recommandation de définition EC 2011/696 ;
- Si le diamètre corrigé obtenu par BET, $D_{min\ VSSA}$, est supérieur à 250 nm, **la substance ne sera pas à considérer comme un nanomatériau** du point de vue de la Recommandation de définition EC 2011/696 ;
- Si le diamètre corrigé obtenu par BET, $D_{min\ VSSA}$, est compris entre 100 nm et 250 nm, **il ne sera pas possible de conclure sur la base des résultats donnés par la méthode BET**, car différents facteurs peuvent venir introduire des biais significatifs (population de particules présentant plusieurs modes, porosité des particules, ...). Une analyse avancée par microscopie électronique (MEB ou MET) est alors nécessaire pour déterminer la distribution de tailles en nombre des particules et pouvoir conclure.

Cette approche par BET ne sera cependant valide que si la poudre est pure et l'échantillon monomodal (une seule population de particules présentes) – ce qui ne peut pas être connu « *a priori* ».

La réalisation d'analyse par microscopie électronique (MEB ou MET) nécessitera la plupart du temps une remise en suspension de l'échantillon dans un solvant bien choisi afin de pouvoir réduire les phénomènes d'agglomération qui pourraient masquer certaines particules (agglomérats 3D).

Cette approche n'exclut pas la mise en œuvre d'autres techniques que la mesure par BET (sp ICP-MS, CLS, etc.), dès lors que leurs résultats sont corrélés à ceux donnés par la microscopie électronique.

11.2 Dispersions en milieu liquide

Dans le cas de solutions colloïdales, l'approche à privilégier consiste à mettre en œuvre, dans un premier temps, une technique de premier niveau (DLS, sp ICP-MS, CLS, DMA, ...) afin d'obtenir une première valeur pour la taille médiane (D50) des particules présentes dans l'échantillon. Le choix de la technique à utiliser va dépendre directement des propriétés physico-chimiques connues *a priori* sur la substance. Ainsi, la sp ICP-MS sera par exemple à éviter s'il s'agit de particules de SiO₂ ou de noir de carbone du fait de la nature chimique des particules, alors que la plupart des techniques (exceptée la microscopie électronique) ne seront pas pertinentes si les particules sont agrégées.

Dans le cas où le D50 est inférieur à 100 nm, la substance est une nanoforme. En revanche, si le D50 obtenu est supérieur à 100 nm, il s'avère indispensable de vérifier au moyen de microscopie électronique (MEB ou MET) la forme des particules ainsi que leur état agrégé ou non. Une analyse plus poussée par microscopie électronique peut être nécessaire pour déterminer la distribution de tailles en nombre.

11.3 Exemples de cas particuliers

11.3.1 Nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone (NTC) sont considérés de façon systématique comme des nanomatériaux dans la recommandation de définition 2011/696/UE. La caractérisation de leurs propriétés dimensionnelles est cependant rendue très complexe par leur rapport d'aspect élevé, qui exclut toutes les techniques autres que la microscopie électronique. Le fait qu'ils soient la plupart du temps regroupés en faisceaux confère à leur caractérisation un degré supplémentaire de difficulté. Enfin, le fait que l'élément constitutif des NTC soit le carbone rend impossible la mise en œuvre de la sp ICP-MS, l'élément carbone n'étant pas analysable par ICP-MS (et de toute manière difficile à discerner dans toutes les matrices organiques).

11.3.2 Silices amorphes de synthèse (SiO₂) / noir de carbone

Dans le cas de substances très agrégées comme la silice amorphe de synthèse (SAS = E551 dans le domaine agro-alimentaire) ou certains noirs de carbone, des techniques comme la DLS, l'A4F-MALS, la CLS ou encore la DMA ne permettent pas de déterminer la distribution de tailles en nombre des particules constitutives. Les objets mesurés sont au mieux des agrégats, voire même des agglomérats d'agrégats, ce qui biaise bien évidemment le D50. La seule approche fiable consiste à utiliser la microscopie électronique.

11.3.3 Substances organiques

Le cas de particules organiques est également à différencier de celui des particules métalliques ou d'oxydes métalliques. En effet, pour ce type de substances, la caractérisation de la VSSA peut être rendue plus complexe, voire même biaisée. Il est en effet nécessaire, dans une première étape, de chauffer l'échantillon autour de 300°C afin de désorber les impuretés présentes en surface de la matière et pouvoir ensuite réaliser l'analyse BET proprement dite. Or, un certain nombre de substances organiques se dégradent à de telles températures. Il faut donc au préalable connaître la température maximale à laquelle la substance peut être soumise ; pour cela une analyse ATG est recommandée.

La sp ICP-MS est également non applicable à ces substances en raison du principe physique mis en œuvre pour détecter les particules.

12 Bibliographie

12.1 Publications

- Anderson, Will, Darby Kozak, Victoria A. Coleman, AAsa K. Jämting, et Matt Trau. 2013. "A comparative study of submicron particle sizing platforms: accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions." *Journal of colloid and interface science* 405:322-330.
- Anses. 2014. "Évaluation des risques liés aux nanomatériaux : Enjeux et mise à jour des connaissances." ; .
- Ayouni-Derouiche, Linda, Marie Méjean, Pauline Gay, Marie-Laure Milliand, Pierre Lantéri, Laury Gauthier, et Emmanuel Flahaut. 2014. "Development of efficient digestion procedures for quantitative determination of cobalt and molybdenum catalyst residues in carbon nanotubes." *Carbon* 80:59-67.
- Crouzier, Loïc, Alexandra Delvallee, Sébastien Ducourtieux, Laurent Devoille, Guillaume Noircler, Christian Ulysse, Olivier Tache, Elodie Barruet, Christophe Tromas, et Nicolas Feltin. 2019. "Development of a new hybrid approach combining AFM and SEM for the nanoparticle dimensional metrology." *Beilstein journal of nanotechnology* 10 (1):1523-1536.
- Dazon, Claire, Olivier Witschger, Sébastien Bau, Vanessa Fierro, et Philip L. Llewellyn. 2019. "Nanomaterial identification of powders: comparing volume specific surface area, X-ray diffraction and scanning electron microscopy methods." *Environmental Science: Nano* 6 (1):152-162.
- Delvallée, Alexandra. 2014. "Métrologie dimensionnelle de nanoparticules mesurées par AFM et par MEB." PhD Thesis, Palaiseau, École nationale supérieure de techniques avancées, Google Scholar.
- Goalard. 2005. "Etude physico-chimique du procédé de dispersion des poudres libres et agglomérées en milieu liquide."
- Hackley, Vincent A., et Aleksandr B. Stefaniak. 2013. ""Real-world" precision, bias, and between-laboratory variation for surface area measurement of a titanium dioxide nanomaterial in powder form." *Journal of Nanoparticle Research* 15 (6):1742.
- JRC. 2012. "Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term "nanomaterial"." ; .
- JRC. 2015. "Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term "nanomaterial": Part 3: Scientific-technical evaluation of options to clarify the definition and to facilitate its implementation." Text. ; .
- JRC. 2019a. "Identification of nanomaterials through measurements." ; .
- JRC. 2019b. "An overview of concepts and terms used in the European Commission's definition of nanomaterial." ; .
- Lamberty, Andrée, Katrin Franks, Adelina Braun, Vikram Kestens, Gert Roebben, et Thomas P. J. Linsinger. 2011. "Interlaboratory comparison for the measurement of particle size and zeta potential of silica nanoparticles in an aqueous suspension." *Journal of Nanoparticle Research* 13 (12):7317-7329.
- Motzkus, C., T. Macé, F. Gaie-Levrel, S. Ducourtieux, A. Delvallee, K. Dirscherl, V. D. Hodoroaba, I. Popov, O. Popov, et I. Kuselman. 2013. "Size characterization of airborne SiO₂

nanoparticles with on-line and off-line measurement techniques: an interlaboratory comparison study." *Journal of Nanoparticle Research* 15 (10):1919.

NanoDefine. 2015. "Technical Report D7.6 : the nanoDefine methods manual." ; .

NanoMétrologie, Club. 2018. "Première comparaison inter-techniques et inter-laboratoires française pour la caractérisation de la taille de nanoobjets." *Spectra Analyse* 321.

Roebben, Gert, Sonia Ramirez-Garcia, Vincent A. Hackley, Matthias Roesslein, Fred Klaessig, Vikram Kestens, Iseult Lynch, C. M. Garner, Alan Rawle, et Allison Elder. 2011. "Interlaboratory comparison of size and surface charge measurements on nanoparticles prior to biological impact assessment." *Journal of Nanoparticle Research* 13 (7):2675.

Takahashi, Kayori, John A. Kramar, Natalia Farkas, Keiji Takahata, Ichiko Misumi, Kentaro Sugawara, Satoshi Gonda, et Kensei Ehara. 2019. "Interlaboratory comparison of nanoparticle size measurements between NMIJ and NIST using two different types of dynamic light scattering instruments." *Metrologia* 56 (5):055002.

Teulon, Jean-Marie, Christian Godon, Louis Chantalat, Christine Moriscot, Julien Cambedouzou, Michael Odorico, Johann Ravaux, Renaud Podor, Adèle Gerdil, Aurélie Habert, Nathalie Herlin-Boime, Shu-wen W. Chen, et Jean-Luc Pellequer. 2019. "On the Operational Aspects of Measuring Nanoparticle Sizes." *Nanomaterials* 9 (1):18. doi: 10.3390/nano9010018.

Tsuji, Masaki. 1993. "Hydrophilization of Specimen Supports using Glow Discharge for Transmission Electron Microscopy."

Varenne, Fanny, Jérémie Botton, Claire Merlet, Jean-Jacques Vachon, Sandrine Geiger, Ingrid C. Infante, Mohamed Chehimi, et Christine Vauthier. 2015. "Toward a standardization of physico-chemical protocols for nanomedicine characterization: II. Zeta potential measurements." 2015.

Wohlleben, Wendel, Johannes Mielke, Alvis Bianchin, Antoine Ghanem, Harald Freiberger, Hubert Rauscher, Marion Gemeinert, et Vasile-Dan Hodoroaba. 2017. "Reliable nanomaterial classification of powders using the volume-specific surface area method." *Journal of Nanoparticle Research* 19 (2):61.

12.2 Normes

ASTM E1621 – 13, Standard Guide for Elemental Analysis by Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry

ASTM E2490-09, Standard guide for measurement of particle size distribution of nanomaterials in suspension by Photon Correlation Spectroscopy (PCS)

ASTM E2834-12, Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

CEN/TS 17010 (2016) Nanotechnologies - Guide sur les mesurandes pour la caractérisation de nano-objets et des matériaux les contenant

FD ISO/TR 13014 (2012) Nanotechnologies - Directives relatives à la caractérisation physico-chimique des nano-objets manufacturés soumis aux essais toxicologiques

FD ISO/TR 18196 (2017) Nanotechnologies – Matrices de méthodes de mesure pour les nano-objets manufacturés

FD ISO/TR 19733 (2019) Nanotechnologies - Matrice des propriétés et des techniques de mesure pour le graphène et autres matériaux bidimensionnels (2D)

ISO 11952 (2014) Analyse chimique des surfaces -- Microscopie à sonde à balayage -- Détermination des quantités géométriques en utilisant des microscopes à sonde à balayage: Étalonage des systèmes de mesure.

ISO 13099-1 (2012) Systèmes colloïdaux — Méthodes de détermination du potentiel zêta — Partie 1: Phénomènes électroacoustiques et électrocinétiques ;

ISO 13099-2 (2012) Systèmes colloïdaux — Méthodes de détermination du potentiel zêta — Partie 2: Méthodes optiques

ISO 13099-3 (2014) Systèmes colloïdaux — Méthodes de détermination du potentiel zêta — Partie 3: Méthodes acoustiques;

ISO 13318-1 (2001) Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods – Part 1: General principles and guidelines.

ISO 13318-2 (2007) Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods – Part 2: Photocentrifuge method.

ISO 13318-3 (2004) Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods – Part 3: Centrifugal X-ray method.

ISO 13319 (2007) Determination of particle size distributions – Electrical sensing zone method.

ISO 15825 (2004) Rubber compounding ingredients – Carbon black – Determination of aggregate size distribution by disc centrifuge photosedimentometry

ISO 15900 (2009) Détermination de la distribution granulométrique — Analyse de mobilité électrique différentielle pour les particules d'aérosol

ISO 15901-3 (2007) Distribution des dimensions des pores et porosité des matériaux solides par porosimétrie au mercure et par adsorption de gaz — Partie 3: Analyse des micropores par adsorption de gaz

ISO 16243 (2011) Analyse chimique des surfaces — Enregistrement et notification des données en spectroscopie de photoélectrons par rayons X (XPS)

ISO 16258-1 (2015) Air des lieux de travail — Fraction alvéolaire de la silice cristalline par diffraction de rayons X — Partie 1: Méthode directe d'analyse sur filtre

ISO 16258-2 (2015) Air des lieux de travail — Fraction alvéolaire de la silice cristalline par diffraction de rayons X — Partie 2: Méthode indirecte d'analyse

ISO 17294-1 (2004) Qualité de l'eau — Application de la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) — Partie 1: Lignes directrices générales

ISO 17867 (2015) Analyse granulométrique – Diffusion des rayons X aux petits angles

ISO 18115-2 (2013) Analyse chimique des surfaces — Vocabulaire — Partie 2: Termes utilisés en microscopie à sonde à balayage ;

ISO 18117 (2009) Analyse chimique des surfaces — Manipulation des échantillons avant analyse

ISO 22036 (2008) Qualité du sol — Dosage des éléments traces dans des extraits de sol par spectrométrie d'émission atomique avec plasma induit par haute fréquence (ICP-AES)

ISO 22412 (2017) Analyse granulométrique - Dispersion lumineuse dynamique (DLD)

ISO 24095 (2009) Air des lieux de travail — Lignes directrices pour le mesurage de la fraction alvéolaire de la silice cristalline

ISO 9277 (2010) Détermination de l'aire massique (surface spécifique) des solides par adsorption de gaz — Méthode BET

ISO 13095 (2014) Analyse chimique des surfaces - Microscopie à balayage de sonde - Procédure pour la caractérisation *in situ* des sondes AFM utilisées pour mesurer la nanostructure.

ISO 21501-2 (2007) Détermination de la distribution granulométrique - Méthodes d'interaction lumineuse de particules uniques - Partie 2 : Compteur de particules en suspension dans un liquide par diffusion de la lumière

ISO/PWI 20803 Determination of particle size distribution – SAXS method (à venir)

ISO/TS 19590 (2017) Nanotechnologies – Distribution granulométrique et concentration de nanoparticules inorganiques en milieu aqueux par spectrométrie de masse à plasma induit en mode particule unique

ISO/TS 21362 (2018) Nanotechnologies – Analyse des nano-objets par fractionnement par couplage flux-force asymétrique et à force centrifuge

ISO18115-2 (2010) Analyse chimique des surfaces — Vocabulaire — Partie 2: Termes utilisés en microscopie à sonde à balayage

ISO18116 (2005) Analyse chimique des surfaces — Lignes directrices pour la préparation et le montage des échantillons destinés à l'analyse ;

ISO/TR 19997 (2018) Lignes directrices relatives aux bonnes pratiques pour la mesure du potentiel zéta

ISO/TS 80004-13 (2017) Nanotechnologies — Vocabulaire — Partie 13: Graphène et autres matériaux bidimensionnels

ISO/TS 80004-6 (2013) Nanotechnologies - Vocabulary -- Part 6: Nano-object characterization (en cours de révision)

ISO/TS 10798 (2011) Nanotechnologies – Caractérisation des nanotubes de carbone à simple paroi par microscopie électronique à balayage et spectroscopie à dispersion d'énergie

ISO/TS 16965 (2013) Qualité du sol — Détermination des éléments en traces par spectrométrie de masse avec plasma induit par haute fréquence (ICP-MS)

NF ISO 19749 (2019) Nanotechnologies – Détermination de la taille et de la distribution en taille des nano-objets par microscopie électronique à balayage

NF ISO 21363 (2019) Nanotechnologies – Détermination de la distribution de taille et de forme des particules par microscopie électronique à transmission

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

XP ISO/TS 80004-1 (2013) Nanotechnologies — Vocabulaire — Partie 1 : Termes « cœur »

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine

2018 -SA- 0 1 6 8

COURRIER ARRIVE

10 JUL. 2018

DIRECTION GENERALE

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE**Ministère de la Transition écologique
et solidaire**Direction générale
de la prévention des risques**Ministère des Solidarité
et de la Santé**

Direction générale de la santé

**Ministère de l'Economie et des
Finances**Direction générale de la concurrence, de
la consommation et de la répression des
fraudes**Ministère de l'Agriculture**

Direction générale de l'alimentation

Ministère du TravailDirection générale
du travail

Les Directeurs généraux

à

Monsieur le Directeur général

de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de
l'Alimentation, de l'Environnement et du
Travail

14 rue Pierre et Marie Curie

94701 MAISONS ALFORT CEDEX

Paris, le 10 juillet 2018

Objet : Demande d'appui scientifique et technique relative à l'élaboration d'une proposition de définition actualisée du terme « nanomatériaux » à partir de la Recommandation 2011/696/UE relative à la définition des nanomatériaux.

L'utilisation croissante des substances à l'état nanoparticulaire dans des secteurs d'activité très variés a conduit les pouvoirs publics à faire évoluer la réglementation nationale et européenne pour prendre en compte les spécificités de ces substances. La France s'est d'ailleurs dotée dès 2013 d'un outil dédié : le registre « r-Nano ».

Les substances à l'état nanoparticulaire ont été développées pour leurs propriétés spécifiques, comme vecteurs d'innovation. Cependant les connaissances de leurs effets potentiels sur l'environnement et la santé restent très limitées, souvent insuffisantes pour en évaluer les risques.

Une première étape vers une meilleure connaissance a été d'élaborer une définition et des critères communs pour caractériser ces substances tels que leur taille, leur distribution, leur surface spécifique etc. Au niveau européen, la recommandation 2011/696/UE de la Commission a servi de référence à plusieurs reprises dans les travaux législatifs d'adaptation des textes. La Commission européenne avait proposé de s'appuyer sur cette définition pour adapter celle figurant dans le règlement n°1169/2011 relatif à l'information du consommateur sur les denrées alimentaires, notamment en y introduisant le

seuil de 50 % de particules en nombre. Cette proposition a été rejetée par le Parlement européen au motif que rien ne justifiait l'introduction d'un tel seuil, inadapté en l'occurrence pour répondre à la demande d'information du consommateur. A ce stade, dans ses contrôles destinés à s'assurer de la bonne information du consommateur sur le caractère nano des ingrédients mis en œuvre, la DGCCRF applique la définition figurant dans le règlement relatif aux nouveaux aliments, à laquelle renvoie le règlement n°1169/2011. Cette définition ne comporte pas de seuil, de sorte qu'un ingrédient est déclaré nano dès lors que la présence de particules nano est avérée. En pratique, selon la méthodologie de contrôle développée par le Service commun des laboratoires, l'étiquetage est exigé lorsque 10 % au moins des particules en présence sont de taille nano.

Actuellement, plusieurs règlements européens (règlements sur les produits biocides, sur les produits cosmétiques, sur les nouveaux aliments, sur l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires) comportent leur propre définition des nanomatériaux sans pour autant être identiques. Les travaux portant sur la révision des annexes du règlement 1907/2006 « Reach » pour l'adapter aux substances à l'état nanoparticulaire devraient également bientôt se conclure. Le projet de la Commission a été voté en comité le 26 avril dernier et devrait entrer en application le 01 janvier 2020. Le texte se réfère à la définition de la recommandation européenne.

Les définitions actuelles proposées dans la recommandation de la Commission de 2011 et dans les différents règlements comportent des différences et des imprécisions (seuil de 50 % en nombre, taille, insolubilité ou bio-persistance dans le règlement cosmétique...), qui sont régulièrement mises en avant par les parties prenantes qui souhaitent obtenir une définition plus claire et harmonisée. La Commission européenne avait annoncé dans plusieurs communications¹ relatives à cette recommandation son intention d'en réviser la définition avant décembre 2014 pour mieux prendre en compte les spécificités de ces substances et préciser certains points de la définition.

Le Joint Research Center (JRC), service de recherche de la Commission a publié un rapport en 2014² comportant des propositions relatives aux critères pouvant être considérés pour définir les nanomatériaux.

Après plusieurs phases de discussion engagées dès 2012, la Commission a soumis en septembre 2017 le projet de feuille de route relative à la révision de la définition des nanomatériaux dans le cadre d'une procédure de consultation publique : la Commission envisage une mise à consultation du public de son projet à l'été 2018 pour une durée de 14 semaines. Cette révision doit permettre d'obtenir une définition harmonisée qui serait déclinable aux différents secteurs d'activité.

En perspective de ces travaux, l'expertise de l'ANSES est demandée pour l'élaboration d'une contribution à cette consultation du public pour l'échéance qui sera fixée par la Commission. L'ANSES évaluera l'existence de méthodes de mesure compatibles avec la proposition de définition, et présentera dans son avis les adaptations qui lui paraissent nécessaires à la définition actuelle proposée dans la recommandation 2011/696/UE.

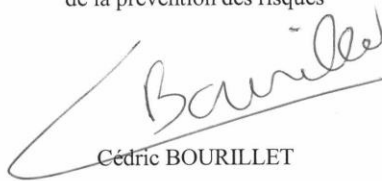
¹ Notamment <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:52012DC0572&from=fr>

² <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/towards-review-ec-recommendation-definition-term-nanomaterial-part-2-assessment-collected>

Vous voudrez bien produire les résultats de l'expertise à l'échéance de la consultation publique mentionnée plus haut.

Nous vous remercions de bien vouloir accuser réception de la présente demande.

Le Directeur général
de la prévention des risques



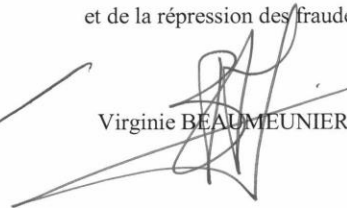
Cédric BOURILLET

Le Directeur général
de la santé



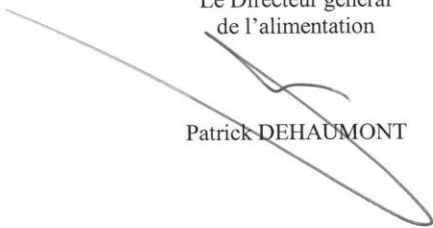
Jérôme SALOMON

La Directrice générale
de la concurrence,
de la consommation
et de la répression des fraudes



Virginie BEAUMEUNIER

Le Directeur général
de l'alimentation



Patrick DEHAUMONT

Le Directeur général
du travail



Yves STRILLOU

Notes

