



Détection et caractérisation des nanoparticules de dioxyde de titane dans les aliments par AF4-ICP-MS et Sp-ICP-MS

Lucas Givelet

► To cite this version:

Lucas Givelet. Détection et caractérisation des nanoparticules de dioxyde de titane dans les aliments par AF4-ICP-MS et Sp-ICP-MS. Génie chimique. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAI037 . tel-02309590

HAL Id: tel-02309590

<https://theses.hal.science/tel-02309590>

Submitted on 9 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Matériaux, Mécanique, Génie Civil, Electrochimie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Lucas GIVELET

Thèse dirigée par **Jean-François DAMLENCOURT (CEA)**
et codirigée par **Thierry GUERIN (Anses)**

préparée au sein du **Laboratoire de Recherche en Nanosécurité
et Nanocaractérisation** dans l'**École Doctorale IMEP-2** de
Grenoble et du **Laboratoire de Sécurité des Aliments**

Détection et caractérisation des nanoparticules de dioxyde de titane dans les aliments par AF4-ICP-MS et Sp-ICP-MS

Thèse soutenue publiquement le **21 juin 2019**
devant le jury composé de :

Dr Marie Hélène ROPERS

Chargée de recherche, INRA Nantes, Rapporteur

Dr Olivier DONARD

Directeur de recherche, Rapporteur

Pr Didier MORIN

Professeur, INCIA Bordeaux, Président

Pr Marc BENEDETTI

Professeur, Université Paris Diderot, Examineur

Dr Georges FAVRE

Ingénieur de recherche, LNE, Examineur

Dr Jean-François DAMLENCOURT

Ingénieur de recherche, CEA-LETI Grenoble, Directeur de thèse

Dr Delphine BOUTRY

Ingénieur de recherche, CEA-LETI Grenoble, Responsable

Dr Petru JITARU

Chargé de recherche, Anses Maisons-Alfort, Responsable

Dr Thierry GUÉRIN

Directeur de recherche, Anses Maisons-Alfort, Co-directeur de thèse



REMERCIEMENTS

Après cette expérience unique de 3 ans, je souhaite profiter de cet espace pour remercier toutes les personnes qui ont contribué à cette thèse directement ou indirectement.

Je souhaite tout d'abord remercier Didier Morin d'avoir accepté de présider la soutenance de thèse et pour sa bienveillance à mon égard. Je remercie également Marie-Hélène Ropers et Olivier Donard d'avoir accepté d'être rapporteurs et pour leur apport scientifique et leurs remarques très pertinentes. Je remercie aussi Marc Benedetti et Georges Favre d'avoir examiné mon travail et pour les riches échanges que nous avons pu avoir. Je souhaite faire savoir que ce fut un immense honneur de pouvoir présenter mes travaux devant ce jury.

Je tiens à exprimer mes remerciements à mon co-directeur Jean François Damlencourt, pour m'avoir offert la chance de faire une thèse. Merci pour tous ses précieux conseils que ce soit pour les présentations ou pour le manuscrit final, c'est en partie grâce à lui que ce rapport a pu atteindre cette qualité.

J'aimerais aussi remercier vivement mon deuxième co-directeur, Thierry Guérin pour m'avoir grandement aidé pendant toute la deuxième moitié de thèse. Merci pour tes conseils et remarques qui m'ont toujours aidé. C'était un réel plaisir de travailler avec toi !

Je tiens également à remercier Petru Jitaru qui m'a encadré et conseillé durant cette thèse. Tu as toujours su te rendre disponible et les discussions avec toi sont toujours riches scientifiquement et ça, c'est super ok !

Un énorme merci à Delphine Boutry pour son investissement dans l'encadrement de ma thèse pendant ces 3 ans. Merci d'avoir été là à chaque fois (dans les bons et les mauvais moments), d'avoir débloqué de nombreuses situations, de m'avoir toujours motivé, d'avoir gardé ton optimisme et de m'avoir toujours donné des conseils, corrections et commentaires qui m'ont été très précieux. Je suis fier d'avoir été au bout de ce projet et c'est aussi grâce à toi !

Je souhaite également remercier Samir Derrough pour son aide, sa disponibilité et son soutien pour la fin de thèse.

Côté CEA, je tiens vivement à remercier Sylvie Motellier pour sa grande aide que ce soit pour la publication ou pour les manips au labo. Merci pour ta patience, ton investissement et tes précieux conseils !

Un gros merci également à Arnaud Guiot pour m'avoir aidé pour les images MEB. Un grand merci mon p'tit pour ta bonne humeur, ta disponibilité et pour avoir maintenu une relation épistolaire après mon départ !

Merci également à Sébastien Artous et Dominique Locatelli pour votre aide à la BET et pour les analyses d'images MEB. Merci Marie Carrière pour les différents lots de TiO_2 , merci Olivier Sicardy pour les analyses DRX et merci à Nathalie Pelissier pour les analyses au TEM.

Merci aux personnes du L2N et plus globalement de la PNS pour votre accueil et votre bonne humeur, c'était agréable de travailler avec vous dans ces conditions. Donc merci à Christophe, Hervé, Sébastien J., Cécile, Simon, Caroline, Catherine, Maïté, Chantal.

Enfin, un gros merci à Vincent Bartolomei pour avoir fait les dernières manips après mon départ, pour tous les bons moments passés au labo sans quoi ça n'aurait pas été pareil !

Côté Anses maintenant ! Tout d'abord merci Nathalie pour ton accueil, ta bonne humeur et pour ton aide quand j'en avais besoin. Merci aussi Rachida pour tes conseils et ta disponibilité surtout le vendredi soir quand je supprime un chapitre complet sur le réseau ! Merci également Axelle, Mme Qualité :p, pour ton aide au début sur l'IcapQ. Un gros merci Claude pour ta bienveillance et toute ton aide pour les missions et les commandes (On n'aura pas réussi à avoir ces fichus NPs d'Ag !). Merci Christian pour tes blagues et tes photos (je sais maintenant reconnaître un Pinson ! ^^). Merci Alin pour ton soutien et les petites discussions :-). Merci également Clémence pour ton aide au labo et ta gentillesse.

Je ne peux évidemment pas oublier de remercier les deux HeiHei du bureau du fond, Micha et Marina et leurs imitations au labo pour l'animation le soir ! Merci Micha pour toutes les discussions d'experts quand il ne restait plus grand monde au bureau. Courage pour la dernière ligne droite et j'espère te revoir bientôt 😊 « D'accord faisons comme ça ! ». Et Marina, mille mercis pour toute l'aide avec les manips, et pour toutes les pauses. Si tu as besoin d'assistance pendant la dernière année au Danemark, n'hésite pas :D !

Je souhaite remercier également les personnes de l'unité PBM pour les bons moments passés avec vous : Gwenaëlle, Dary, Ronel, Julien, Inès, Hanen, Caroline, Antoine, Jacques, Vincent, Marion, Marine, Sophie, Patricia, Kam Eng et notamment Marina pour sa bienveillance et son soutien.

Dans l'ensemble, un gros merci au département chimie pour votre accueil et votre gentillesse, ce fut très agréable de travailler parmi vous.

J'aimerais également remercier Katrin Loeschner pour m'avoir accueilli au Laboratoire Technique du Danemark et pour m'avoir énormément appris sur la méthode Sp-ICP-MS.

J'ai une très grosse pensée qui va à l'Unité de Squatteurs d'Élites et plus globalement aux Sardines ! Même si j'aurais bien aimé vous voir plus souvent, merci d'être là ça fait toujours du bien au moral ! Merci Simon, YannD, Morgui, Flo, Élo, Guillaume, Anja, Max, Cassandra, Teddy pour les weekends grenoblois/parisiens, pour les relectures du manuscrit ou des présentations, pour m'avoir aidé à trouver les échantillons avec le fameux E171, pour les déménagements, pour être venus à la soutenance et pour ce que vous êtes, MERCI ! Un gros merci à PP pour l'hébergement très régulier à Grenoble et ton aide pour tout ce que j'ai déjà cité ; on ressortira PES pour que tu comprennes qui est le meilleur ! Et merci aussi à Robin mon binôme qui m'a accompagné et motivé dans le choix de faire de la recherche et une thèse 😊

Un énorme merci à la famille, aux frères Alex, Maxime et Jules aux beaux-parents Valérie et Pascal et surtout au Papa et à la Maman pour toutes les aides diverses et variées pendant ces trois ans et surtout pour toute la préparation de la soutenance. C'est grâce à vous mes parents chéris si j'en suis arrivé là, donc merci pour le soutien à vie dont j'ai bénéficié :D

Pour finir, je ne sais pas comment te remercier puisque ton aide, ton amour, ton soutien, ta gentillesse, ton humanité, vont bien au-delà du cadre de la thèse. Merci de m'avoir supporté, de m'avoir écouté, de m'avoir toujours motivé, d'avoir consacré tant d'heures aux relectures, d'avoir géré tant de choses pendant ces trois ans et surtout pour tout l'amour que tu m'as apporté et que tu continues d'apporter. Mon bonheur a un nom, il s'appelle Alexia ♥.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	i
TABLE DES MATIERES	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX	xiv
GLOSSAIRE	xvi
INTRODUCTION	1
Chapitre I : État de l'art.....	4
I.1 Sommaire	5
I.2 Généralités sur les nanomatériaux	6
I.2.1 Définitions	6
I.2.2 Propriétés spécifiques des NPs.....	11
I.2.3 Usages et applications des NPs	14
I.3 Nanoparticules de dioxyde de titane	18
I.3.1 Généralités	18
I.3.2 Utilisation du dioxyde de titane dans les aliments.....	22
I.4 Bilan	33
II. Chapitre II : Principe des méthodes de caractérisation des NPs	34
II.1 Sommaire	35
II.2 Détermination de la masse volumique	36
II.3 Détermination de la surface spécifique	37
II.4 Détermination de la structure cristalline	39
II.5 Détermination de la taille, forme et composition des NPs	40
II.6 Détermination du diamètre hydrodynamique des NPs	42
II.7 Détermination du potentiel zêta des NPs	44
II.8 Fractionnement par couplage flux-force (FFF)	46
II.8.1 Utilisation de l'AF4 en mode normal.....	48

II.8.2	Utilisation de l'AF4 en mode stérique	48
II.8.3	Utilisation de l'AF4 en mode hyperlayer	49
II.8.4	Etapas de la séparation	49
II.8.5	Les principaux paramètres influençant la séparation par AF4.....	51
II.8.6	Couplage avec un détecteur de diffusion de la lumière multi angles	56
II.8.7	Détermination du potentiel zêta des membranes	57
II.9	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode « Single particle » (Sp-ICP-MS).....	58
II.9.1	Détermination de l'efficacité de transport (TE)	60
II.9.2	Etalonnage à partir d'étalons sous forme ionique	65
II.9.3	Dilution des échantillons	65
II.9.4	Traitement des données.....	66
II.10	Bilan	71
III.	Chapitre III : Développement de la méthode AF4-ICP-MS pour la caractérisation des NPs de TiO₂.....	72
III.1	Sommaire	73
III.2	Caractérisation de NM-102	75
	Résultats de la caractérisation du NM-102	75
III.3	Evaluation du potentiel zêta des NPs de TiO ₂ du NM-102 et des membranes AF4.....	79
III.3.1	Réactifs	79
III.3.2	Détermination expérimentale des Concentrations Micellaires Critiques (CMC) des tensioactifs	80
III.3.3	Détermination du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique des NPs de TiO ₂ du NM-102.....	83
III.3.4	Détermination du potentiel zêta des membranes AF4	87
III.3.5	Choix des conditions d'éluant pour l'analyse AF4-ICP-MS.....	90
III.4	Analyses des NPs de TiO ₂ du NM-102 par AF4-ICP-MS	92
III.4.1	Méthode	92
III.4.2	Résultats	97

III.5	Bilan	103
IV.	Chapitre IV Optimisation du traitement de données de la méthode « Single particle »-ICP-MS.....	105
IV.1	Sommaire	106
IV.2	Évolution du traitement de données en Sp-ICP-MS.....	107
	Temps d'acquisition (Dt)	108
IV.3	Optimisation de la feuille de calcul du RIKILT	110
IV.3.1	Présentation de la feuille de calcul du RIKILT.....	110
IV.3.2	Développement d'une feuille de calcul interne	114
IV.4	Traitement des données : Comparaisons entre le module npQuant (Thermo) et la méthode de calcul interne	129
IV.4.1	Identification des paramètres à comparer.....	129
IV.4.2	Méthode de comparaison	130
IV.4.3	Résultats et discussion	131
IV.4.4	Conclusion	134
IV.5	Bilan	135
V.	Chapitre V Caractérisation des NPs de TiO₂ dans les aliments par Sp-ICP-MS	136
V.1	Sommaire	137
V.2	Optimisation de la méthode Sp-ICP-MS.....	139
V.2.1	Données de la littérature.....	139
V.2.2	Matériels et méthodes	144
V.2.3	Optimisation du temps d'acquisition (Dt)	146
V.2.4	Calcul du seuil bruit de fond-particule	148
V.2.5	Optimisation de la stabilité des suspensions de NPs en fonction du type de flacon..	150
V.2.6	Détermination du mode d'introduction de l'échantillon dans l'ICP-MS	152
V.2.7	Optimisation du mode d'analyse de l'ICP-MS.....	154
V.2.8	Choix du milieu de dispersion pour l'analyse de NPs.....	155
V.2.9	Sélection de l'isotope de titane le plus adapté pour l'analyse des NPs.....	157

V.2.10	Détermination du calcul de l'efficacité de transport (TE)	160
V.2.11	Bilan	170
V.3	Analyse d'échantillons alimentaires	171
V.3.1	Choix des denrées alimentaires	171
V.3.2	Protocole d'extraction des NPs de TiO ₂ des échantillons alimentaires	173
V.3.3	Échantillons alimentaires	175
V.4	Bilan	186
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES		187
ANNEXES		193
Annexe A : Théorie des différentes méthodes de caractérisation des NPs ou membrane.		194
Pycnométrie		194
Méthode Brunauer Emmett et Teller (BET)		195
Diffraction des Rayons-X		197
Microscopie électronique		198
Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)		199
Électrophorèse laser doppler		203
Analyseur électrocinétique		204
Annexe B : Figures et tableaux complémentaires du Chapitre III		207
Annexe C : Publication "Characterisation of TiO ₂ nanoparticles in food additives by Asymmetric flow field flow fractionation -coupled to Inductively coupled plasma-mass spectrometry – a pilot study"		210
Annexe D		247
BIBLIOGRAPHIE		249

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des différents types de nanomatériaux	9
Figure 2 : Images de microscopie électronique à transmission ou à balayage de différentes géométries de NPs d'argent (A) pyramidales, (B) cubiques et de NPs d'or de forme (C) octaédrique, (D) en étoile, (E) en bâtonnet et (F) sphérique. (Adapté de Wang and Yu, 2012 ; Khodashenas and Ghorbani, 2015 ; Khan et al., 2017).....	9
Figure 3 : Différentes structures d'une nanoparticule (adapté de Wu et al., 2015).....	10
Figure 4 : Classification des nanomatériaux existants selon leur nature et leur provenance (adapté de Le Trequesser, 2014)	10
Figure 5 : Relation entre le diamètre d'une particule et le pourcentage	12
Figure 6 : Température de fusion des particules d'or en fonction de leur diamètre.....	13
Figure 7 : Évolution des propriétés optiques des NPs d'or en fonction de.....	13
Figure 8 : Les secteurs d'activités présentant le plus grand nombre de déclarations en 2017 (adapté de R-Nano, 2017).....	14
Figure 9 : Classement des cinq premiers descripteurs de secteurs d'utilisation	15
Figure 10 : Somme des quantités produites et importées pour chacune des familles de.....	15
Figure 11 : Représentation 3D des structures cristallines (A) rutile, (B) anatase et (C) brookite (adapté de Landmann et al., 2012).....	18
Figure 12 : Absorption du TiO ₂ dans le domaine des UV (Pardis, 2012)	19
Figure 13 : Schéma de la photocatalyse à la surface d'une particule de TiO ₂	20
Figure 14 : Distribution en taille des particules d'un échantillon de E171 obtenue par MET par Weir et al., 2012.....	22
Figure 15 : Répartition des rejets de nanomatériaux estimés dans	26
Figure 16 : Toxicocinétique et voies d'accumulation des NPs de TiO ₂ . Les flèches en pointillé indiquent les incertitudes (adapté de Shakeel et al., 2016)	28
Figure 17 : Mécanisme d'action des NPs de TiO ₂ mis en avant par Peng et al., 2019	29
Figure 18 : Chronologie des évènements clés liés à la législation du E171	32
Figure 19 : Schéma d'un pycnomètre hélium	36
Figure 20 : Présentation du Belsorp Max (MicrotracBel, Japon)	37
Figure 21 : Schéma du balayage angulaire effectué par le détecteur du diffractomètre.....	39
Figure 22 : Image de NPs de TiO ₂ d'un E171 par (A) MET et (B) MEB.....	40

Figure 23 : Représentation du diamètre de Féret minimum et maximum d'une particule	41
Figure 24 : Schéma du principe de la diffusion dynamique de la lumière	42
Figure 25 : Distributions en taille, en nombre, en volume et en intensité, d'une dispersion de particules de 5 nm et 50 nm de diamètre, présentes en quantité égale, obtenues par DLS	43
Figure 26 : Schéma du modèle de la double couche électrique	44
Figure 27 : Cellule utilisée en DLS	45
Figure 28 : Schéma d'un système AF4.....	46
Figure 29 : Représentation d'un système classique AF4 en mode (A) chargement et (B) élution. En vert est représenté le chemin de la phase mobile jusqu'au détecteur, en rouge la vanne à six voies et en bleu là où est injecté l'échantillon (adapté de Gimbert et al. 2003).....	47
Figure 30 : Schéma des différents modes d'élution pour la méthode AF4.....	48
Figure 31 : Représentation des étapes d'injection-concentration et de concentration-relaxation au niveau du canal AF4.....	50
Figure 32 : Représentation de l'étape d'élution au niveau du canal AF4	50
Figure 33 : Représentation d'un détecteur MALS (adapté de Zimm, 1948)	56
Figure 34 : Schéma d'un analyseur électrocinétique utilisé pour mesurer le potentiel zêta d'un échantillon solide	57
Figure 35 : Atomisation et ionisation d'une particule dans le plasma.....	58
Figure 36 : Schéma du principe de la méthode Sp-ICP-MS.....	59
Figure 37 : Schéma des différentes méthodes pour déterminer l'efficacité de transport (TE).....	60
Figure 38 : Représentation complémentaire de la méthode de calcul du TE basée sur la masse des particules	63
Figure 39 : Schéma de l'impact de la concentration en particules sur le signal obtenu.....	65
Figure 40 : Exemple de signal classique obtenu par Sp-ICP-MS (A) ainsi que son échelle agrandie avec la représentation graphique du seuil bruit de fond-particule (B)	67
Figure 41 : Exemple de distribution des signaux ICP-MS en fonction de leur fréquence	68
Figure 42 : Exemple d'une distribution en taille obtenue par Sp-ICP-MS.....	69
Figure 43 : Analyses Sp-ICP-MS (A) d'un échantillon contenant peu d'analyte sous forme ionique avec un Dt élevé, (B) d'un échantillon contenant une concentration élevée d'analyte ionique avec un Dt élevé et (C) d'un échantillon contenant une concentration élevée d'analyte ionique avec un Dt faible	70
Figure 44 : Synthèse des méthodes de caractérisation des NPs utilisées et des paramètres évalués .	71
Figure 45 : Diffractogramme de rayon X de la poudre de NM-102 avec les signaux théoriques de la forme cristallographique anatase en rouge et de celle du rutile en bleu.....	75

Figure 46 : Isotherme d'adsorption de l'azote sur le NM-102, en rouge la gamme de pression relative (P/P_0) pour calculer la surface spécifique.....	76
Figure 47 : Image obtenue à l'aide d'un MET en mode STEM et cartographies EDS des NPs de NM-102	77
Figure 48 : Distribution en taille du NM-102 obtenue à partir de 45 particules	77
Figure 49 : Analyse EDS des NPs de NM-102	78
Figure 50 : Exemple de comportement d'une substance tensioactive par rapport à sa CMC	80
Figure 51 : Variation de la conductivité en fonction de la concentration du SDS (A), du CTAC (B) et du FL-70 (C).....	81
Figure 52 : Variation du potentiel zêta (A) et du diamètre hydrodynamique (B) du NM-102 en fonction du pH et de la force ionique (modifiée par ajout de NaNO_3).....	84
Figure 53 : Variation des potentiels zêta des NPs de TiO_2 en fonction du pH et de l'addition de différents tensioactifs avec une concentration en NaNO_3 de 0 mM (A) et 10 mM (B)	85
Figure 54 : Potentiel zêta des membranes RC 10 kDa en fonction du pH et de la force ionique	87
Figure 55 : Potentiel zêta des membranes AF4 (RC 10 kDa) en fonction du pH et de la présence de différents tensioactifs à 50% de leur CMC avec du NaNO_3 à 0 mM (A) et 10 mM (B).....	89
Figure 56 : Ligne de concentration visible avec du bleu dextran durant l'étape de concentration-relaxation.....	93
Figure 57 : Signal MALS obtenu et diamètre de giration mesuré lors de l'analyse de NM-102 avec différentes phases mobiles : SDS (A), sans tensioactif (B), CTAC (C), FL-70 (D) et Triton X-100 (E).....	97
Figure 58 : Signal ICP-MS obtenu lors de l'analyse de NM-102 avec différentes phases mobiles : SDS (A), sans tensioactif (B), CTAC (C), FL-70 (D) et Triton X-100 (E)	98
Figure 59 : Taux de récupération du NM-102 pour une analyse sans rétention et avec rétention. Répulsion = même signe de potentiel zêta des NPs et de la membrane. Attraction = signe opposé du potentiel zêta des NPs et de la membrane	100
Figure 60 : Différents cas retrouvés en analyse Sp-ICP-MS conventionnelle : (A) Analyse idéale, (B) deux particules détectées dans un Dt, (C) fraction de particule détectée et (D) forte concentration de l'analyte sous forme ionique	108
Figure 61 : Impact du type de traitement de données sur des résultats en taille de NPs.....	109
Figure 62 : Extrait de la feuille de calcul en accès libre du RIKILT	111
Figure 63 : Interface complète de la feuille de calcul en accès libre du RIKILT.....	112
Figure 64 : Extrait de la feuille de calcul interne. Onglet concernant le calcul du seuil bruit de fond-particule avec en rouge les corrections itératives.	114
Figure 65 : Nouvel onglet dédié au calcul de la sensibilité	116
Figure 66 : Exemple d'analyse de plusieurs étalons de titane sous forme ionique	117

Figure 67 : Droite d'étalonnage obtenue à partir d'une dispersion de NPs d'or de 50 nm, d'une masse de 1,25 fg.....	119
Figure 68 : Distribution en taille du matériau NM-100 présentée avec un pas de 2 nm (A) jusqu'à 200 nm ; (B) jusqu'à 700 nm ou (C) avec un pas de 20 nm jusqu'à 700 nm	120
Figure 69 : Nouvelle interface de la feuille de calcul modifiée du RIKILT	121
Figure 70 : Tableaux des résultats Sp-ICP-MS de la feuille de calcul interne.....	122
Figure 71 : Extrait de la feuille de calcul interne mettant en avant la correction des signaux consécutifs (entouré en jaune).....	123
Figure 72 : Impact de la correction sur une distribution en taille de particules d'une dispersion de NPs d'or ayant une taille de 50 nm (en rouge, la gamme de taille corrigée).....	123
Figure 73 : Exemple d'une distribution en taille de NPs avec l'indication du diamètre le plus fréquent (bleu) et du diamètre moyen (rouge).....	124
Figure 74 : Paramètres de qualité proposés dans la feuille de calcul interne	125
Figure 75 : Interface de la nouvelle feuille de traitement de données Sp-ICP-MS.....	127
Figure 76 : Comparaison entre la feuille de calcul interne et le module npQuant pour l'analyse du NM-100 (n=15) pour différents paramètres : Sensibilité en mode ionique (A), LDt (B), TE basé sur la masse des particules (C), TE basé sur la concentration des particules (D), et le diamètre moyen (E)	132
Figure 77 : Diamètre moyen et fraction nanoparticulaire mesurés pour le NM-100 en fonction de plusieurs temps d'acquisition.....	147
Figure 78 : Distribution en taille des NPs d'or en fonction du paramètre nxET pour calculer le seuil bruit de fond-particule.....	148
Figure 79 : Distribution en taille des NPs de TiO ₂ du NM-100 en fonction de plusieurs paramètres nxET pour calculer le seuil bruit de fond-particule.....	149
Figure 80 : Protocole de lavage appliqué pour les différents types de flacon.....	150
Figure 81 : Concentration moyenne en TiO ₂ en fonction des différents types de flacon et isotopes du Ti.....	151
Figure 82 : Concentration des dispersions de TiO ₂ dans des flacons de polypropylène ayant subi ou non le protocole de lavage (détaillé dans la Figure 80) pour les 5 isotopes du titane	152
Figure 83 : Comparaison du signal brut d'un blanc en fonction de deux types de prélèvement (avec pompe péristaltique et par aspiration libre).....	153
Figure 84 : Extrait des données brutes de l'analyse du NM-100 en mode STDS et KEDS.....	154
Figure 85 : Fraction nanoparticulaire (A) et diamètre moyen (B) du NM-100 en fonction du solvant de dispersion utilisé. La ligne verte représente la valeur référence du JRC	155
Figure 86 : Concentration de Ti mesurée à partir des différents isotopes en mode STDS en fonction de la concentration en interférents. Le graphique à droite est un agrandissement de celui de gauche.	158

Figure 87 : Concentration de Ti mesurée à partir des différents isotopes en mode KEDS en fonction de la concentration en interférents. Le graphique à droite est un agrandissement de celui de gauche.	159
Figure 88 : Suivi de l'efficacité de transport (TE) sur plusieurs jours d'analyse, calculée à partir de la méthode masse et de la méthode concentration.....	161
Figure 89 : Comparaison de la fraction nanoparticulaire du NM-100 calculée à partir des deux TE avec la valeur référence obtenue par le JRC	162
Figure 90 : Comparaison du diamètre moyen du NM-100 mesuré à partir des deux méthodes de calcul du TE et de la valeur estimée par le JRC.....	163
Figure 91 : Comparaison avec la littérature de la fraction nanoparticulaire (A) et de la taille moyenne (B) obtenues avec les TE issus des méthodes basées sur la masse ou la concentration des particules.	164
Figure 92 : Efficacité de transport déterminée par les méthodes basées sur la masse et sur la concentration en particules pour différentes tailles de NPs d'or	165
Figure 93 : Comparaison du TE (concentration) avec celui obtenu par Geertsen et al. (2018) en fonction du diamètre des NPs d'or	166
Figure 94 : Etalonnage à partir de différentes tailles de NPs d'or (indiquées pour chaque point) pour la détermination du TE avec la méthode basée sur la masse des NPs	167
Figure 95 : Comparaison des diamètres des NPs d'or de référence avec les diamètres calculés à partir des TE basés sur la méthode de la masse et sur la méthode de la concentration	168
Figure 96 : Concentration de titane (forme non précisée) dans les aliments analysés par Weir et al. (2012) – (figure provenant de Tg 5 Stelle (média italien))	171
Figure 97 : Protocole d'extraction des NPs de TiO ₂ testé sur des aliments	173
Figure 98 : Ecart des diamètres obtenus en fonction des écarts entre les valeurs de TE mesurées via les deux méthodes (masse et concentration)	178
Figure 99 : Distribution en taille des particules des échantillons alimentaires déterminée par la méthode Sp-ICP-MS	184
Figure A1 : Exemple d'une isotherme d'adsorption expérimentale d'azote avec un additif E171. Le cercle rouge délimite la gamme de P/P0 où la relation BET s'applique	196
Figure A2 : Schéma du principe de la méthode DRX avec la représentation d'interférences des ondes diffusées	197
Figure A3 : Schéma simplifié du MEB et du MET	199
Figure A4 : Influence de la taille d'une particule sur la diffusion de la lumière.....	200
Figure A5 : (A) Fluctuation de l'intensité de la lumière diffuse au cours du temps et (B) la fonction d'autocorrélation générée	200
Figure A6 : Modèle de la double couche électrique	204

Figure A7 : Représentation de l'interface d'un solide (A) lorsque aucune force mécanique n'est appliquée et (B) lorsque la création d'une différence de potentiel est générée à la surface du solide par application du flux tangentiel..... 205

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des définitions des nanomatériaux employées par différents organismes.....	7
Tableau 2 : Surface spécifique d'une particule sphérique de dioxyde de titane de masse volumique 3,9 g/cm ³ en fonction de son diamètre.....	12
Tableau 3 : Principales applications des NPs inorganiques	16
Tableau 4 : Indice de réfraction et valeur énergétique de la bande interdite des phases du TiO ₂ (d'après Pardis, 2012 ; Le Trequesser, 2014)	19
Tableau 5 : Synthèse des études de caractérisation du E171.....	24
Tableau 6 : Résumé des paramètres utilisés pour la caractérisation de NPs de TiO ₂ par AF4. Les paramètres retenus/recommandés par les auteurs de l'étude sont en vert.....	52
Tableau 7 : Synthèse des matériaux de référence utilisés pour calculer le TE	64
Tableau 8 : Liste des composés du FL-70	79
Tableau 9 : CMC des différents tensioactifs étudiés.....	82
Tableau 10 : Synthèse des signes des potentiels zêta des particules et de la membrane RC 10 kDa, obtenus en fonction de la présence de tensioactif, de la force ionique et du pH de l'éluant. Les conditions retenues pour les analyses AF4-ICP-MS sont encadrées en pointillé.	90
Tableau 11 : Potentiels zêta des NPs de TiO ₂ (NM-102) et des membranes AF4 (RC 10 kDa) obtenus pour différentes conditions de phase mobile	91
Tableau 12 : Paramètres du programme d'élution pour contrôler la ligne de concentration avec le bleu dextran	93
Tableau 13 : Paramètres du programme d'élution pour mesurer la concentration du NM-102 sans rétention.....	95
Tableau 14 : Paramètres du programme d'élution pour mesurer la concentration du NM-102 avec rétention.....	96
Tableau 15 : Différents types de diamètre de giration du NM-102 mesurés pour chaque condition : diamètre le plus fréquent et diamètre à 10% de la hauteur du pic.	99
Tableau 16 : Comparaison des sensibilités calculées à partir de la moyenne ou de la médiane des intensités mesurées (en bleu, étalonnage impacté par l'entrée d'air dans le système)	118
Tableau 17 : Nombre de données obtenues par Sp-ICP-MS en fonction du temps d'analyse et du temps d'acquisition	126
Tableau 18 : Résumé des optimisations effectuées sur la feuille de calcul interne	128

Tableau 19 : Liste des paramètres pertinents en Sp-ICP-MS disponibles avec le traitement de données par npQuant ou avec la feuille de calcul interne	130
Tableau 20 : Conclusion du test statistique de Student par pair pour différents paramètres entre npQuant et la feuille de calcul interne	133
Tableau 21 : Avantages et inconvénients d'utilisation du logiciel ou de la feuille de calcul pour traiter les données.....	134
Tableau 22 : Résumé des différents paramètres de la méthode Sp-ICP-MS utilisés dans la dernière décennie	140
Tableau 23 : Comparaison des coefficients de détermination des droites d'étalonnage avec les différents solvants.....	156
Tableau 24 : Isotopes et principaux interférents du titane	157
Tableau 25 : Liste des interférents et des différents produits chimiques utilisés pour évaluer l'impact des interférents sur les différents isotopes du titane	158
Tableau 26 : Choix retenu pour la méthode de calcul du TE en fonction des analyses effectuées....	169
Tableau 27 : Liste des paramètres optimisés pour la méthode Sp-ICP-MS	170
Tableau 28 : Liste des produits alimentaires retenus pour l'analyse des NPs de TiO ₂ par Sp-ICP-MS	172
Tableau 29 : Fraction du produit alimentaire prélevée pour l'analyse des NPs de TiO ₂ par Sp-ICP-MS	174
Tableau 30 : Résultats obtenus sur différents produits alimentaires avec un TE calculé via la méthode basée sur la masse des particules	176
Tableau 31 : Résultats obtenus sur différents produits alimentaires avec un TE calculé via la méthode basée sur la concentration des particules.....	176
Tableau 32 : Comparaison des avantages et inconvénients des méthodes AF4-ICP-MS et Sp-ICP-MS	191

GLOSSAIRE

AF4 :	Fractionnement par couplage Flux-Force par Flux Asymétrique
Anses :	Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
BET :	Méthode Brunauer Emmett Teller
CEA :	Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives
CV :	Coefficient de Variation
DLS :	<i>Dynamic Light Scattering</i> , Diffusion dynamique de la lumière
DRX :	Diffraction des Rayons-X
Dt :	<i>Dwell Time</i> , temps d'acquisition
E171 :	Identification de l'additif alimentaire dioxyde de titane
EFSA :	<i>European Food Safety Authority</i> , Autorité européenne de sécurité des aliments
ET :	Écart-type
ICP-MS :	Spectrométrie de Masse à Plasma à Couplage Inductif
JRC :	<i>Joint Research Center</i> , Centre commun de recherche
FFF :	Fractionnement par couplage Flux-Force
LDt :	Limite de Détection en taille
MEB :	Microscope Électronique à Balayage
MET :	Microscope Électronique à Transmission
MR :	Matériau de Référence
MRC :	Matériau de Référence Certifié
NPs :	Nanoparticules
Sp-ICP-MS :	Spectrométrie de Masse à Plasma à couplage Inductif en mode « Single particle »
TE :	Efficacité de transport

INTRODUCTION

Depuis une vingtaine d'années, les nanotechnologies font l'objet de nombreux projets de recherche. Grâce aux avancées technologiques, il est maintenant possible d'observer, de manipuler et de quantifier la matière à l'échelle nanométrique. L'intérêt pour les nanomatériaux est en plein essor car ils possèdent des propriétés spécifiques inédites qui peuvent être optiques, mécaniques ou encore électriques. Ajouté au fait que les nanomatériaux peuvent se présenter sous une multitude de formes (nanoparticule, nanofilament, nano-feuillet...), cela permet d'entrevoir une infinité d'applications. Les nanomatériaux sont par exemple utilisés dans la microélectronique pour miniaturiser les appareils électroniques ([Hedrick et al., 2002](#) ; [Goesmann and Feldmann, 2010](#)), en médecine pour cibler les zones de l'organisme dans lesquelles délivrer des substances médicamenteuses ([Ghosh et al., 2008](#) ; [Singh and Lillard, 2009](#) ; [Alkilany et al., 2012](#)), dans les peintures ou les vernis pour protéger les matériaux utilisés dans le bâtiment ([Lee et al., 2010](#)) ou dans les cosmétiques ([De la Calle et al. 2017](#) ; [Sogne et al. 2017](#)).

Alors que les recherches sur le développement et l'application de ces matériaux se multiplient à grande vitesse, les risques liés à leur exposition ou leur relargage dans l'environnement sont encore trop peu étudiés. Le cadre réglementaire vis-à-vis de ces produits est encore flou et non homogène suivant le type d'application. Depuis peu, les substances à l'échelle nanométrique sont soumises à des déclarations obligatoires dans plusieurs pays comme les États-Unis ([Regulations.gov, 2017](#)), le Danemark ([Virk Indberet, 2014](#)), la Belgique ([Service Public Fédéral Santé Publique Sécurité de la chaîne alimentaire et Environnement, 2014](#)) ou encore la France qui est le premier pays à avoir mis en place cette action ([R-Nano, 2013](#)). L'encadrement au niveau européen est en développement constant mais des règlements obligent déjà l'indication de la présence de nanomatériaux dans les biocides ([Parlement européen, 2012](#)), les cosmétiques ([Parlement européen, 2009](#)) et l'alimentation ([Parlement européen, 2011](#)). Ces précautions s'avèrent nécessaires au vu du manque d'information quant à la toxicité des nanomatériaux. L'évaluation des risques est d'autant plus complexe qu'il existe une très grande variété de nanomatériaux. Pour les États-Unis en 2009, il a été estimé entre 249 millions et 1,18 milliard de dollars l'investissement nécessaire pour l'évaluation des risques avec une durée de travail de 34 à 53 ans ([Choi et al., 2009](#)).

Lors de l'utilisation de produits contenant des nanomatériaux comme les peintures, les revêtements, les cosmétiques ou les textiles, les nanoparticules (NPs) ont une forte probabilité d'être relarguées

dans l'environnement ([Keller and Lazareva, 2014](#)). Le relargage des nanomatériaux dans l'environnement contribue alors à l'augmentation des risques d'exposition de l'homme à ces substances ([Keller et al., 2013](#)) et peut avoir des effets néfastes sur les écosystèmes ([Bottero et al., 2011](#)). C'est pourquoi il est nécessaire de bien caractériser les nanomatériaux, dans une optique de maîtriser leur cycle de vie et d'acquérir plus de données pour les études de toxicité et d'évaluation des risques. De nombreux paramètres physico-chimiques peuvent être déterminés comme la composition chimique, la surface spécifique, la taille, ou encore la phase cristalline.

Le dioxyde de titane (TiO_2) est largement utilisé sous forme nanoparticulaire en tant que photocatalyseur et/ou pigment. Par conséquent, les NPs de TiO_2 sont utilisées dans de nombreux produits cosmétiques comme dans les crèmes solaires pour filtrer les rayons ultraviolets (UV) ([de la Calle et al., 2017](#)), ou dans les peintures et le traitement des eaux usées pour son effet photocatalytique ([Reddy et al., 2015](#) ; [Truffier-Boutry et al., 2017](#)). En France le TiO_2 nanoparticulaire représente plus de 10 000 t importées ou produites en 2017, ce qui le classe en tonnage dans les quatre matériaux les plus déclarés en 2017 ([R-Nano, 2017](#)).

Les travaux de cette thèse se focalisent donc sur les particules de TiO_2 et spécifiquement celles présentes dans les aliments en tant que colorant. Cet additif est nommée E171 dans les denrées alimentaires depuis 1994 ([Parlement européen, 1994](#)). La présence de NPs de TiO_2 dans cet additif n'a été prouvée que 18 ans plus tard ([Weir et al., 2012](#)). La forme nanoparticulaire du TiO_2 crée des interrogations concernant sa toxicité au vu de sa présence dans les produits de consommation. Il est alors nécessaire de développer des méthodes d'analyse pour caractériser les particules de TiO_2 . Dans les aliments, la principale méthode employée pour caractériser cet additif est la microscopie électronique, dont le principal avantage est de pouvoir observer directement les NPs avec une haute résolution. Néanmoins, cette méthode est coûteuse et demande un temps de préparation d'échantillon et d'observation conséquent, ce qui la rend difficile d'accès aux laboratoires de contrôles et d'analyses.

L'objectif de cette thèse consiste à étudier des méthodes alternatives/complémentaires pour caractériser les NPs de TiO_2 dans les aliments. Ce projet a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire de Nanocaractérisation et Nanosécurité (L2N) du Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA) de Grenoble et le Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSAL) de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) à Maisons-Alfort. Ces deux laboratoires sont des partenaires du projet EquipEx NanoID qui met à disposition des appareils capables de détecter et d'identifier la nature chimique des NPs dans des matrices complexes. Ainsi, la méthode fractionnement flux-force par flux asymétrique couplée à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (AF4-ICP-MS) a été étudiée au sein de la

Plateforme de NanoSécurité (PNS) du L2N, et la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode « Single particle » (Sp-ICP-MS) au sein de l'Unité Élément Traces Métalliques et Minéraux (UET2M) du Département des Contaminants Chimiques dans les Aliments du LSAL. Ces deux méthodes récentes ont été choisies car elles sont complémentaires à la microscopie électronique et permettent de pallier ses inconvénients avec des analyses rapides d'échantillons liquides tout en détectant un nombre de particules plus élevé. De plus, ces méthodes permettent également de quantifier la concentration des particules, contrairement à la microscopie. Néanmoins, ces techniques nécessitent d'être optimisées avant de pouvoir être utilisées en laboratoire d'analyses, ce qui justifie ces travaux de thèse.

Ce manuscrit se décompose en cinq chapitres :

Le premier chapitre est dédié à l'état de l'art des nanomatériaux, de leurs propriétés spécifiques ainsi que de leurs usages. Il se concentre ensuite sur les NPs de TiO_2 en présentant le contexte et les problématiques liées à ce produit, ainsi que les différentes études de caractérisation dans les aliments qui ont été menées. Il décrit également l'évolution de la législation autour de l'additif alimentaire E171.

Le second chapitre présente les différentes méthodes de caractérisation qui ont été employées, en décrivant leur principe ainsi que les informations qu'elles apportent. Il détaille aussi les méthodes AF4-ICP-MS et Sp-ICP-MS qui ont été choisies pour analyser les NPs de TiO_2 .

Dans le troisième chapitre sont présentés les travaux qui ont été menés au L2N du CEA-Grenoble, avec différentes méthodes de caractérisation. L'étude des charges de surface des NPs de TiO_2 en fonction de différents paramètres, comme le pH ou la force ionique a également été réalisée. Ce chapitre se focalise ensuite sur les analyses AF4-ICP-MS des NPs de TiO_2 en utilisant différentes conditions d'éluant, afin de déterminer des conditions optimales.

Le quatrième chapitre met en avant les travaux d'optimisation du protocole de traitement de données de la méthode Sp-ICP-MS. Une fois optimisé, ce protocole a été comparé à celui du logiciel dédié à l'analyse Sp-ICP-MS pour évaluer les avantages et inconvénients de chacun.

Le dernier chapitre se concentre sur l'optimisation de la méthode Sp-ICP-MS sur plusieurs paramètres fondamentaux tels que le temps d'acquisition ou le calcul de l'efficacité de transport. La méthode a ensuite été appliquée à différents échantillons alimentaires susceptibles de contenir des NPs de TiO_2 afin de caractériser celles-ci.

Enfin, les avantages et inconvénients des deux principales méthodes seront discutés.

Chapitre I :

État de l'art

I.1 Sommaire

Chapitre I : Etat de l'art.....	Error! Bookmark not defined.
I.1 Sommaire	Error! Bookmark not defined.
I.2 Généralités sur les nanomatériaux	Error! Bookmark not defined.
I.2.1 Définitions	Error! Bookmark not defined.
I.2.2 Propriétés spécifiques des NPs.....	Error! Bookmark not defined.
I.2.3 Usages et applications des NPs	Error! Bookmark not defined.
I.3 Nanoparticules de dioxyde de titane	Error! Bookmark not defined.
I.3.1 Généralités	Error! Bookmark not defined.
I.3.2 Utilisation du dioxyde de titane dans les aliments.....	Error! Bookmark not defined.
I.4 Bilan	Error! Bookmark not defined.

L'objectif de ce premier chapitre est de faire un état de l'art concernant les problématiques liées aux nanoparticules (NPs) de dioxyde de titane (TiO_2) dans l'alimentation. Pour se faire, la définition des nanomatériaux sera introduite, suivie de la présentation de leurs propriétés spécifiques. Puis ce chapitre abordera les usages et applications des nanomatériaux avant de se focaliser sur les NPs de TiO_2 dans les produits alimentaires.

I.2 Généralités sur les nanomatériaux

I.2.1 Définitions

D'un point de vue étymologique, le terme « nanotechnologie » se décompose en deux parties. Le préfixe « nano » provient du mot grec « νάνος » qui signifie « nain » et le suffixe « technologie », issu du grec « τέχνη », signifie « art » ou « habileté de la main ». Ces termes permettent de déduire que la « nanotechnologie » pourrait être l'art de la manipulation à petite échelle. Cette signification est similaire aux définitions actuelles, comme par exemple celle de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) qui est la suivante : « application de connaissances scientifiques à des fins de manipulation et de contrôle de la matière principalement à l'échelle nanométrique, afin d'utiliser les propriétés et phénomènes dépendants de la taille et de la structure différents de ceux associés aux atomes ou molécules individuels, ou aux extrapolations par rapport à des dimensions plus grandes du même matériau » (ISO, 2015). Le concept de nanotechnologie a été abordé pour la première fois dans un discours du physicien Richard Feynman en 1959 lors de la réunion annuelle de l'American Physical Society à Caltech (Feynman, 1959). Celui-ci évoquait les possibilités liées à la miniaturisation des appareils, comme les ordinateurs et leurs composants, ce qui permettrait d'accroître les performances de calcul. Il a aussi évoqué le fait que les microscopes électroniques devaient être améliorés d'un facteur 100 au niveau de la résolution, afin d'améliorer les recherches en biologie. C'est seulement dans les années 1980 que le terme de « nanotechnologie » s'est développé avec l'apparition du microscope à effet tunnel (Binnig and Rohrer, 1983) et du microscope à force atomique (AFM) (Binnig et al., 1986) qui ont permis d'atteindre des résolutions de l'ordre de l'angström (1 angström = 10^{-10} m). Actuellement, de nombreuses définitions concernant les nanomatériaux coexistent, avec des critères qui peuvent différer comme le montre le [Tableau 1](#).

Tableau 1 : Liste des définitions des nanomatériaux employées par différents organismes

Organisme	Définition	Document	Référence
Organisation internationale de normalisation (ISO)	Matériau ayant une dimension externe à l'échelle de longueur s'étendant approximativement de 1 nm à 100 nm ou ayant une structure interne ou une structure de surface à l'échelle nanométrique.	ISO/TS 80004-1:2015	(ISO, 2015)
Commission Européenne (CE)	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.	Recommandation 2011/696/UE	(Commission européenne, 2011)
Parlement Européen	Substance active ou une substance non active, naturelle ou manufacturée, 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.	Règlement 528/2012 (Règlement biocide)	(Parlement européen, 2012)
Parlement Européen	Matériau produit intentionnellement présentant une ou plusieurs dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins, ou composé de parties fonctionnelles distinctes, soit internes, soit à la surface, dont beaucoup ont une ou plusieurs dimensions de l'ordre de 100 nm ou moins, y compris des structures, des agglomérats ou des agrégats qui peuvent avoir une taille supérieure à 100 nm mais qui conservent des propriétés typiques de la nanoéchelle.	Règlement 1169/2011 (Règlement INCO)	(Parlement européen, 2011)
Parlement Européen	Matériau insoluble ou bio-persistant fabriqué intentionnellement et se caractérisant par une ou plusieurs dimensions externes, ou une structure interne, sur une échelle de 1 à 100 nm.	Règlement 1223/2009 (Règlement cosmétique Européen)	(Parlement européen, 2009)
Ministère de la Transition écologique et solidaire	Substance fabriquée intentionnellement à l'échelle nanométrique contenant des particules non liées ou sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont 50% des particules, dans la distribution des tailles en nombre, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm.	R-Nano.fr	(R-Nano, 2013)
Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis (EPA)	Classe de substances dont les composants structurels sont inférieurs à 100 nm dans au moins une dimension.	Technical Fact Sheet Nanomaterials, 2014	(United States Environmental Protection Agency, 2017)

Certaines définitions prennent en compte le profil granulométrique, c'est le cas de la recommandation européenne ([Commission européenne, 2011](#)) ou le registre R-nano ([R-Nano, 2013](#)) qui a été mis en place par le gouvernement français et géré par l'Anses. Certaines définitions ne s'appliquent qu'à une certaine catégorie de produits comme les aliments avec le Règlement INCO ([Parlement européen, 2011](#)) ou les cosmétiques avec le Règlement cosmétique Européen ([Parlement européen, 2009](#)). Enfin, la notion de « structure » est prise en compte par l'Agence de Protection de l'Environnement (EPA), ainsi que par l'ISO. Cette notion permet d'inclure les agrégats et les agglomérats qui peuvent être une structure composée de nanomatériaux. Or la structure n'est pas systématiquement prise en compte dans les définitions.

Un agrégat est un ensemble de particules fortement liées ou fusionnées, quasiment impossible à casser, tandis qu'un agglomérat est une association de particules ou d'agrégats qui adhèrent ensemble du fait de liaisons physiques faibles. La surface externe globale d'un agglomérat correspond à la somme des surfaces de ses constituants alors que dans le cas d'un agrégat, la surface externe globale est inférieure à la somme des surfaces de ses constituants.

Parmi les nanomatériaux, il est possible de distinguer plusieurs catégories qui sont présentées dans la [Figure 1](#).

Les nano-feuillets sont des nanomatériaux qui peuvent être nommés de différentes façons comme nano-couches, nano-plats, nano-films... et qui sont définis comme des nanomatériaux possédant une seule dimension inférieure à 100 nm, les deux autres dimensions pouvant être significativement supérieures.

Les nanofibres, nanotubes, nanofilaments ou nano-bâtonnets sont des nanomatériaux longilignes dont deux dimensions (section) sont inférieures à 100 nm avec une longueur comprise entre 500 et 10 000 nm.

Les nanoparticules (NPs) désignent les nanomatériaux dont les trois dimensions externes sont inférieures à 100 nm.

Il existe aussi des matériaux nanostructurés comme les agglomérats, agrégats ainsi que les nanocomposites qui sont des composés multiphasés dont l'une des phases possède une dimension à l'échelle nanométrique.

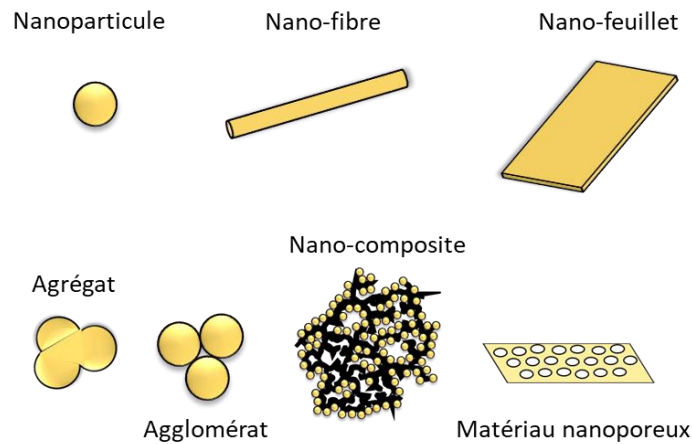


Figure 1 : Représentation des différents types de nanomatériaux

Concernant les NPs, celles-ci peuvent avoir des géométries très différentes telles que des formes sphériques, cubiques, sous forme de bâtonnets, d'étoiles ou encore polyédriques comme le montre la Figure 2.

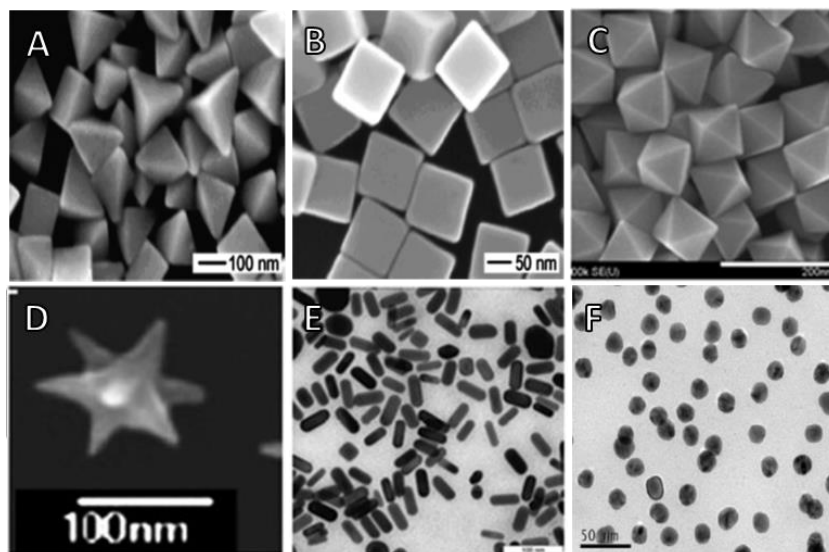


Figure 2 : Images de microscopie électronique à transmission ou à balayage de différentes géométries de NPs d'argent (A) pyramidales, (B) cubiques et de NPs d'or de forme (C) octaédrique, (D) en étoile, (E) en bâtonnet et (F) sphérique. (Adapté de Wang and Yu, 2012 ; Khodashenas and Ghorbani, 2015 ; Khan et al., 2017)

Les NPs peuvent aussi exister avec des différences structurales selon l'application pour laquelle elles sont destinées. La structure cœur/coquille permet par exemple de rendre la particule plus stable, biocompatible ou encore conductrice (Cortie and Mcdonagh, 2011 ; Chaudhuri and Paria, 2012 ; Chauviré, 2014). La Figure 3 montre les différents types de NPs que l'on peut retrouver.

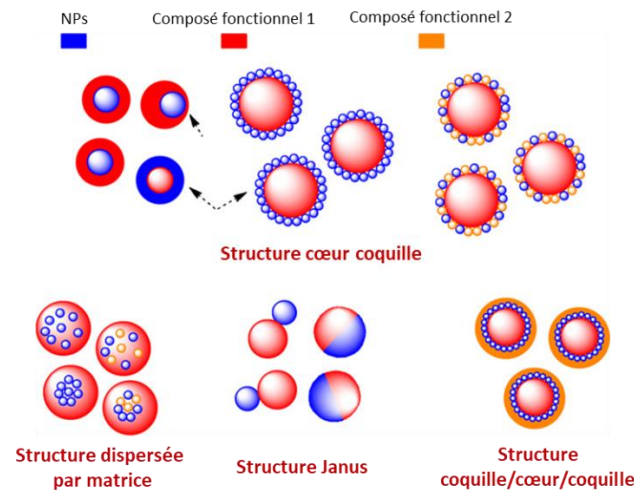


Figure 3 : Différentes structures d'une nanoparticule (adapté de [Wu et al., 2015](#))

Les nanomatériaux peuvent provenir de sources naturelles comme l'érosion des sols, les sels océaniques, les virus ou les particules ultrafines présentes dans les fumées volcaniques ([Taylor, 2002](#) ; [Nowack and Bucheli, 2007](#)). Les nanomatériaux peuvent aussi être d'origine anthropique, soit en étant produits non intentionnellement, comme les particules fines issues de combustions (émission de moteur, gaz de cuisine) ou d'abrasions (plaquette de frein) ([Hasegawa et al., 2004](#) ; [Oberdörster et al., 2005](#) ; [Pedata et al., 2016](#)). Soit, en étant produits intentionnellement pour une application spécifique, tel que le dioxyde de titane, largement utilisé pour filtrer les UV ou encore le carbone pour ses propriétés mécaniques ([Guo and Tan, 2009](#) ; [Maynard and Michelson, 2014](#)). La [Figure 4](#) résume les différentes provenances et natures des nanomatériaux.

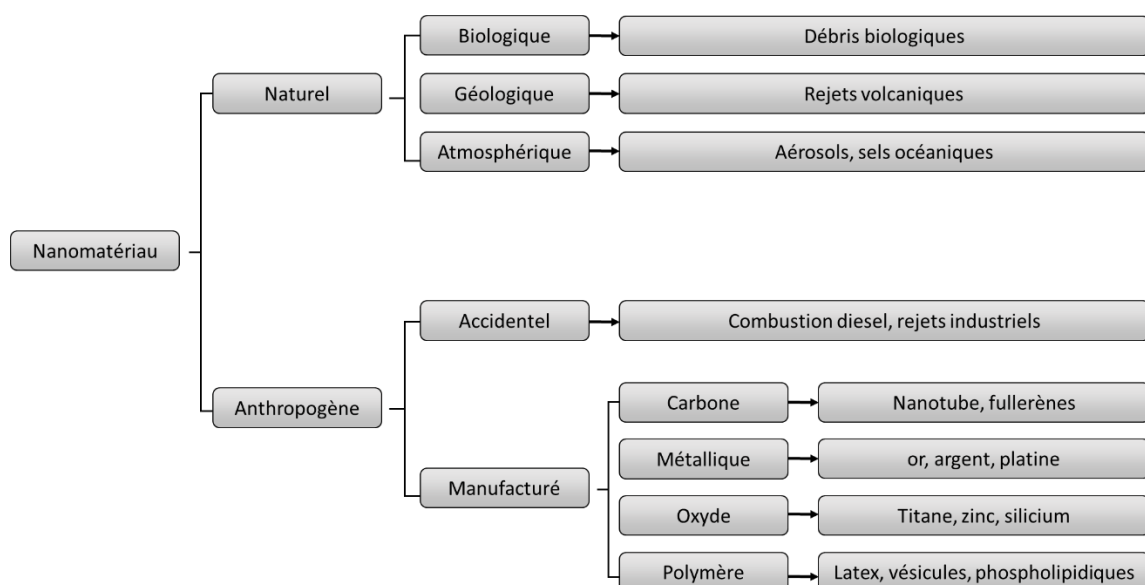


Figure 4 : Classification des nanomatériaux existants selon leur nature et leur provenance (adapté de [Le Trequesser, 2014](#))

I.2.2 Propriétés spécifiques des NPs

Les nanomatériaux, et plus particulièrement les NPs, sont réputés pour leurs propriétés remarquables qui permettent d'obtenir de nouvelles applications. Ces nouvelles propriétés peuvent venir de trois principaux facteurs que sont les effets de taille, les effets de surface et les effets quantiques. Ces différents facteurs peuvent donc modifier les propriétés mécaniques, optiques, électriques et magnétiques de ces matériaux (Roduner, 2006 ; Goesmann and Feldmann, 2010 ; Krug and Wick, 2011).

I.2.2.1 Effets de taille

La plupart du temps, la taille a un effet direct sur les propriétés des NPs. Ces dernières, possèdent une taille inférieure aux longueurs d'onde du domaine visible, ce qui rend leur visibilité grandement diminuée. Ainsi, elles peuvent être utilisées comme revêtement possédant les propriétés de l'élément tout en gardant leur transparence comme, par exemple, dans les crèmes solaires ou les vernis pour le domaine du bâtiment (Althues et al., 2007 ; Latthe et al., 2019 ; Mba and Netto, 2019). Grâce à leurs faibles dimensions, les NPs peuvent atteindre des endroits peu accessibles et permettent de nouvelles applications en médecine (Le Trequesser et al., 2013 ; Nicolas and Couvreur, 2017). Les NPs peuvent théoriquement circuler à travers tous les vaisseaux sanguins (1 μm de diamètre) et même traverser certaines barrières biologiques afin de délivrer des principes actifs en vue de traitement anticancéreux (Jallouli et al., 2007). Néanmoins, cela implique un potentiel toxique plus élevé puisque de nombreuses parties du corps peuvent être atteintes (Wang et al., 2007). Un autre effet de taille est que les NPs sont moins soumises à la gravité, ce qui modifie leur comportement dans les fluides (gaz, liquide) et rend leur suspension plus stable (Le Trequesser, 2014).

I.2.2.2 Effet de surface

La réactivité des nanomatériaux est décuplée, principalement grâce à la forte augmentation de la surface spécifique. En effet, plus une particule est petite, plus le pourcentage d'atomes à sa surface augmente (Figure 5).

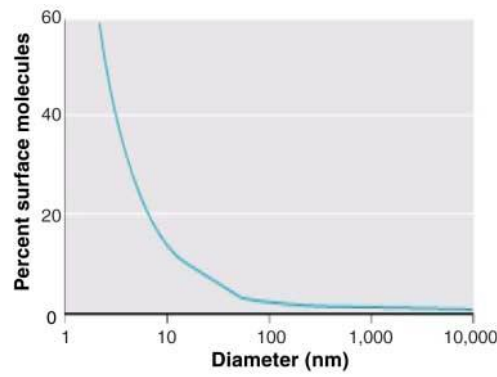


Figure 5 : Relation entre le diamètre d'une particule et le pourcentage d'atomes à la surface de celle-ci (Nel, 2006)

La surface spécifique, qui correspond à la surface pour une masse donnée, est nettement augmentée en diminuant la taille des particules, ce qui a pour impact d'accroître drastiquement la réactivité du matériau (Tableau 2).

Tableau 2 : Surface spécifique d'une particule sphérique de dioxyde de titane de masse volumique $3,9 \text{ g/cm}^3$ en fonction de son diamètre

Diamètre de la particule	Surface spécifique (cm^2/g)
1 mm	15
1 μm	15 385
10 nm	1 538 462

Cette augmentation de la réactivité permet par exemple aux NPs d'argent (Ag) d'être plus réactives et d'avoir un effet antibactérien efficace (Dallas et al., 2011 ; Le Ouay and Stellacci, 2015).

A l'échelle nanométrique, l'énergie de liaison entre les atomes de surface diminue car les atomes ont moins d'atomes voisins. Les propriétés de certaines NPs métalliques peuvent alors se voir modifiées, telles que les particules d'or dont le point de fusion est abaissé à l'échelle nanométrique (Figure 6).

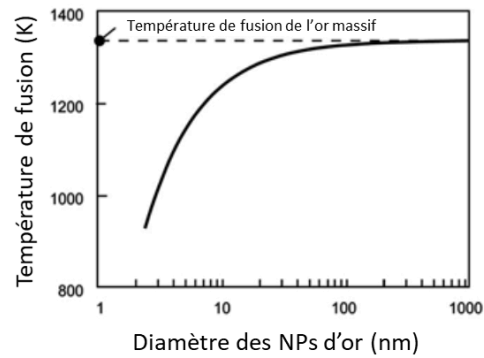


Figure 6 : Température de fusion des particules d'or en fonction de leur diamètre (adapté de [Buzea et al., 2007](#))

1.2.2.3 Effets quantiques

Si la structure électronique des atomes ou composés des NPs est influencée directement par la taille, les phénomènes sont appelés effets quantiques ([Goesmann and Feldmann, 2010](#)). Ces effets sont définis par une modification des lois physiques classiques à la surface des NPs, qui peut modifier leurs propriétés optiques. Par exemple, un nuancier de couleur centré sur la teinte rouge est obtenu lorsque différentes tailles de NPs d'or sont mises en solution ([Figure 7](#)).

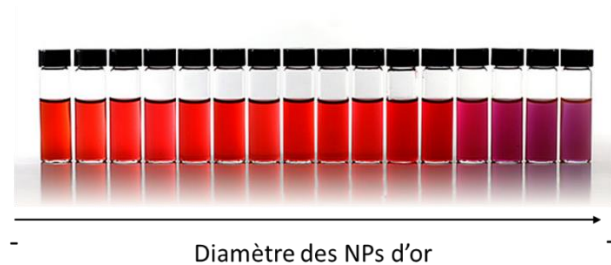


Figure 7 : Évolution des propriétés optiques des NPs d'or en fonction de leur diamètre (adapté de [Le Trequesser, 2014](#))

Cette modification est due à une oscillation collective des électrons, appelé aussi « résonance plasmonique » qui interagit avec certaines fréquences lumineuses du domaine visible ([Tame et al., 2013 ; Le Trequesser, 2014](#)). Un autre effet quantique peut être mis en avant dans le cas des semi-conducteurs et de leur luminescence. Les « quantum dots » sont des semi-conducteurs à l'échelle nanométrique qui permettent, en fonction de la taille, de moduler la bande interdite (ensemble de barrières énergétiques entre la bande de valence et de conduction) du matériau. Ainsi, les photons émis peuvent avoir une longueur d'onde différente suivant la taille du quantum dot ([Yahia Ammar, 2015](#)). Ces nanomatériaux permettent ainsi des applications dans le domaine de l'imagerie médicale ou dans la construction d'écran de télévision.

I.2.3 Usages et applications des NPs

Grâce à ces propriétés inédites, les NPs sont employées dans de nombreux domaines tels que la médecine, la construction, les cosmétiques, l'alimentation... Le registre R-nano, mis en place par le Ministère de la Transition écologique et solidaire en 2013, fait état des déclarations obligatoires de « substance à l'état nanoparticulaire » fabriquée, importée ou mise sur le marché en France. D'après le dernier rapport des déclarations de 2017, les cinq secteurs d'activités concernés les plus déclarés sont présentés dans la [Figure 8](#).

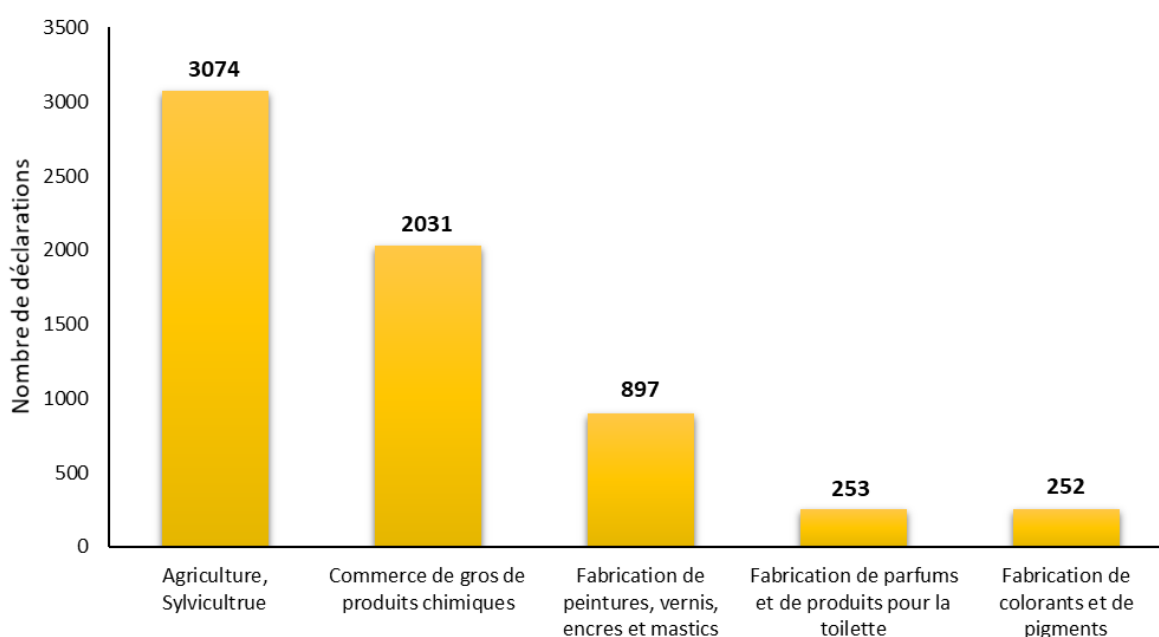


Figure 8 : Les secteurs d'activités présentant le plus grand nombre de déclarations en 2017 (adapté de [R-Nano, 2017](#))

L'agriculture est le secteur d'activité le plus déclaré. Les substances manipulées dans ce secteur entrent principalement dans la formulation de préparations phytosanitaires ([R-Nano, 2017](#)). Concernant les secteurs d'utilisation, l'alimentation figure en quatrième position ([Figure 9](#)).

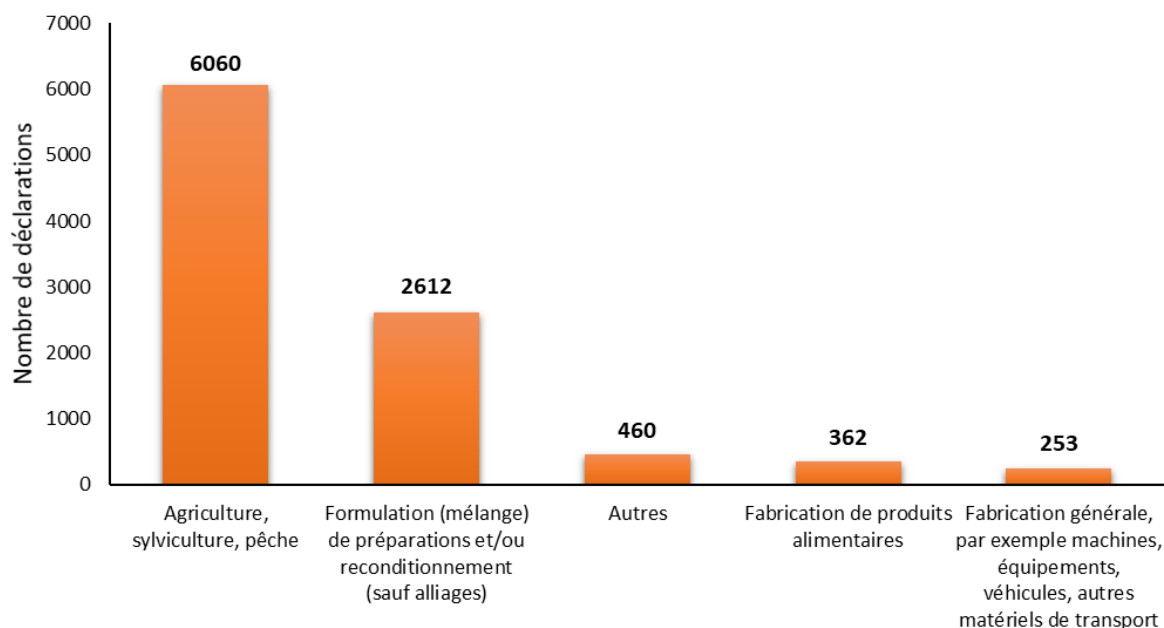


Figure 9 : Classement des cinq premiers descripteurs de secteurs d'utilisation selon leur occurrence en 2017 (adapté de *R-Nano, 2017*)

Ces figures permettent d'avoir un aperçu sur les nombreux domaines d'utilisation des nanomatériaux. Dans le rapport *R-Nano, 2017*, plusieurs familles de nanomatériaux sont distinguées et leur tonnage est présenté dans la *Figure 10*.

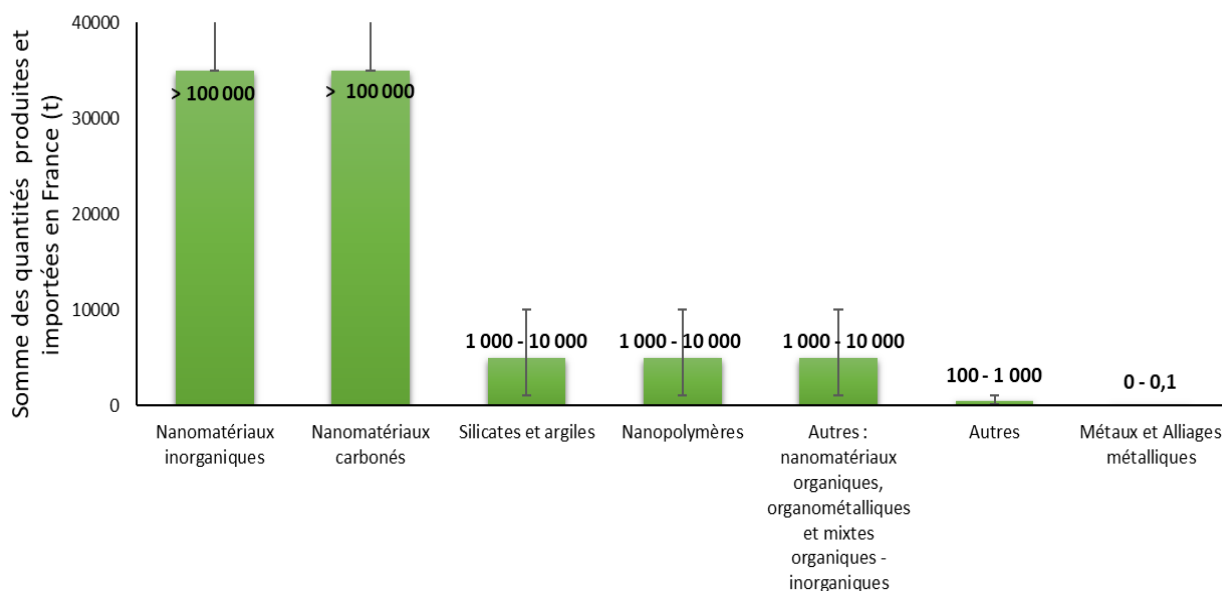


Figure 10 : Somme des quantités produites et importées pour chacune des familles de substances à l'état nanoparticulaire en 2017 (adapté de *R-Nano, 2017*)

Les nanomatériaux inorganiques et carbonés représentent la plus grande quantité déclarée. Le [Tableau 3](#) résume les différentes applications des nanomatériaux inorganiques dont fait partie le dioxyde de titane.

Tableau 3 : Principales applications des NPs inorganiques

Élément NPs	Applications	Références
Ag	Photocatalyse	(Akhavan, 2009; Wang et al., 2010)
	Antibactérien, antifongique et antivirale	(Brannon-Peppas and Blanchette, 2004 ; Galdiero et al., 2011 ; Deshmukh et al., 2019)
	Traitement des eaux	(Jain and Pradeep, 2005 ; Xiong et al., 2011)
	Peinture	(Bellotti et al., 2015)
	Traitement des eaux usées	(Sheng and Liu, 2011 ; Saravanan et al., 2015 ; Saleh et al., 2019)
	Textile	(Benn and Westerhoff, 2008 ; Lorenz et al., 2012 ; Mitrano et al., 2015)
	Ustensile de cuisine et électroménager	(Zhang et al., 2015)
Al	Optique	(Chan et al., 2008 ; Knight et al., 2012)
	Traitement des eaux	(Maximous et al., 2009 ; Sun et al., 2018)
	Antimicrobien	(Sikora et al., 2018)
	Céramique	(Chebbi et al., 2018)
	Traitement des sols	(Naderi Peikam and Jalali, 2018)
Au	Médecine	(Hamouda, 2012 ; Alkilany et al., 2012)
	Cosmétique	(de la Calle et al., 2017)
Cu	Antimicrobien	(Ren et al., 2009 ; Ingle et al., 2014)
	Encres conductrices	(Abhinav K et al., 2015)
	Microélectronique	(Rubilar et al., 2013)
	Additifs dans les huiles de lubrification	(Gulzar et al., 2016)
Fe	Traitement des sols	(Zhang, 2003)
	Traitement des eaux	(Xu et al., 2012)
	Appareils d'enregistrement	(Huber, 2005)
	Imagerie	(Huber, 2005 ; Stephen et al., 2011)
	Médecine	(Mahmoudi et al., 2011 ; Bañobre-López et al., 2013)

NPs	Applications	Références
Si	Médecine	(Lu et al., 2013; Li et al., 2016)
	Peinture	(Al-Kattan et al., 2015)
	Alimentation	(Dekkers et al., 2011 ; Athinarayanan et al., 2014)
	Télécommunication	(Korposh et al., 2010; Marques et al., 2016)
	Optique	(Yi et al., 2005; Aliberti et al., 2010)
Ti	Peinture	(Auvinen and Wirtanen, 2008 ; Mitrano et al., 2015 ; Truffier-Boutry et al., 2017)
	Cellule solaire	(Park, 2015)
	Alimentation	(Weir et al., 2012; de la Calle et al., 2018a-b; Candás-Zapico et al., 2018)
	Cosmétique	(Lu et al., 2015 ; De la Calle et al., 2017)
	Médicament	(Rowe et al., 2009)
	Traitement des eaux	(Reddy et al., 2015 ; Ge et al., 2016)
Zn	Optique	(Suwanboon et al., 2008 ; Dakhlaoui et al., 2009 ; Kundu et al., 2011)
	Cosmétique	(Smijs and Pavel, 2011; Sogne et al., 2017)
	Cellule solaire	(Baxter and Aydil, 2006)

Les différents types de NPs organiques peuvent avoir diverses applications, l'or par exemple, peut être utilisé en médecine en tant qu'agent thérapeutique ou transporteur de molécules actives mais aussi en cosmétique en tant qu'agent anti-âge (Alkilany et al., 2012 ; Krystek et al., 2015). Un autre exemple avec le fer qui est utilisé sous forme de nanomatériaux pour ses propriétés magnétiques, notamment dans les bandes magnétiques des caméras (Huber, 2005). Certains des éléments présentés dans le [Tableau 3](#) sont utilisés sous forme d'oxyde comme l'oxyde de cuivre, les oxydes de fer, le dioxyde de silice, le dioxyde de titane ou l'oxyde de zinc. A l'échelle nanométrique, les oxydes peuvent acquérir de nouvelles propriétés comme les oxydes de cuivre qui sont très conducteurs ou le dioxyde de titane qui a un effet photocatalytique.

Il existe de nombreuses applications spécifiques aux nanomatériaux, néanmoins, ces travaux de thèse se concentrent sur la caractérisation de NPs de TiO₂. Par conséquent, ce type de NPs sera davantage détaillé, notamment sur ses propriétés et ses utilisations dans les parties suivantes.

I.3 Nanoparticules de dioxyde de titane

I.3.1 Généralités

Le titane (Ti) est le neuvième élément le plus abondant dans la croûte terrestre. Il est majoritairement retrouvé sous la forme oxydée dans plusieurs minerais tels que la pérovskite (CaTiO_3), l'ilménite (FeTiO_3) ou encore la titanite (CaTiSiO_5).

I.3.1.1 Propriétés structurales du TiO_2

Le TiO_2 est retrouvé naturellement sous trois structures cristallines différentes, à savoir *rutile*, *anatase* et *brookite*. Ces trois structures sont constituées d'octaèdres TiO_6 légèrement déformés et reliés de différentes façons (Figure 11). La structure *rutile* est la plus commune car elle est thermodynamiquement stable, alors que l'*anatase* et la *brookite* sont des structures métastables qui tendent à se transformer en *rutile* de façon irréversible à température élevée (Allen et al., 2018). Néanmoins, à l'échelle nanométrique, c'est la phase *anatase* qui est thermodynamiquement la plus stable.

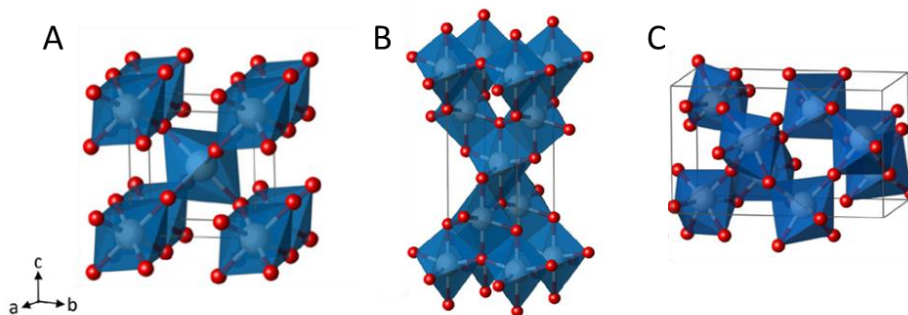


Figure 11 : Représentation 3D des structures cristallines (A) rutile, (B) anatase et (C) brookite (adapté de Landmann et al., 2012)

Avec la phase *rutile*, deux arêtes opposées d'un octaèdre sont partagées pour former des chaînes linéaires dans l'axe de l'arête. L'*anatase* présente un réseau quadratique où les octaèdres sont assemblés en zigzag et possèdent quatre arêtes partagées. Enfin, la structure *brookite* possède des octaèdres qui partagent un coin et ses arêtes associées (Allen et al., 2018). Il est également possible d'obtenir d'autres structures de TiO_2 à certaines conditions de température et de pression, comme la *columbite* qui est obtenue à une pression de 4 à 8 GPa ou la *baddeleyite* qui est obtenue à une pression entre 12 et 17 GPa (Pardis, 2012).

1.3.1.2 Propriétés optiques et électroniques

L'indice de réfraction du TiO_2 est élevé et varie selon la structure cristalline (Tableau 4).

Tableau 4 : Indice de réfraction et valeur énergétique de la bande interdite des phases du TiO_2 (d'après Pardis, 2012 ; Le Trequesser, 2014)

Phase	Rutile	Anatase	Brookite
Indice de réfraction	2,605 - 2,903	2,561 - 2,488	2,583 - 2,700
Bande interdite (Band gap)	3,02 eV	3,23 eV	3,14 eV

Par conséquent, une grande partie de la lumière est réfléchiée, ce qui en fait un pigment naturellement blanc largement utilisé dans les industries des peintures, des cosmétiques et de l'alimentation (Mitrano et al., 2015).

Le TiO_2 est aussi un semi-conducteur dont le comportement électronique est décrit par la théorie des bandes. Pour un atome isolé, l'énergie des électrons ne peut posséder que des valeurs précises. Dans le cas d'un solide, l'énergie des électrons se situe dans des intervalles de valeurs appelés « bandes ». Ces bandes sont proportionnelles au nombre d'atomes. Deux bandes sont discernées, à savoir la bande de valence où les électrons contribuent à la cohésion locale du solide et la bande de conduction où les électrons participent à la conduction électronique du solide. La bande qui les sépare s'appelle la bande interdite (band gap). Dans le cas de semi-conducteur comme le TiO_2 , la bande interdite est inférieure à 5,5 eV (Tableau 4), ce qui donne lieu à des transitions qui peuvent être activées par des photons se situant dans le domaine de l'ultraviolet (Figure 12).

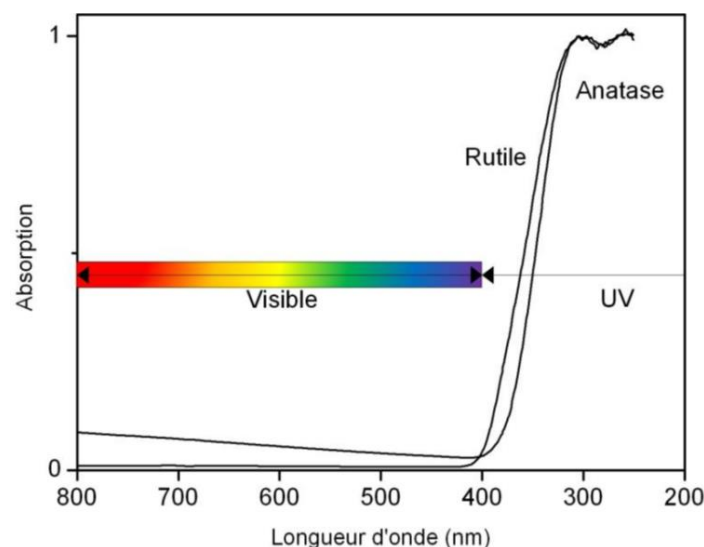


Figure 12 : Absorption du TiO_2 dans le domaine des UV (Pardis, 2012)

Cette propriété permet d'utiliser le TiO_2 comme filtre UV dans les crèmes solaires (Buchalska et al., 2010 ; De la Calle et al., 2017) ou comme agent photocatalytique dans les peintures (van Driel et al., 2016 ; Truffier-Boutry et al., 2017).

1.3.1.3 Effet photocatalytique

La catalyse est un procédé qui augmente la vitesse d'une réaction. Les réactions catalytiques nécessitent l'utilisation d'un catalyseur qui intervient dans au moins une des étapes de la réaction. Dans le cas de la photocatalyse, le catalyseur nécessite une activation lumineuse (Schaming et al., 2017). Dans le cas du TiO_2 , un photon se situant dans le domaine de l'ultraviolet est nécessaire pour activer la photocatalyse. L'absorption de ce photon permet d'émettre un électron (e^-) au niveau de la bande de conduction et ainsi former un trou dans la bande de valence (h^+) (Figure 13).

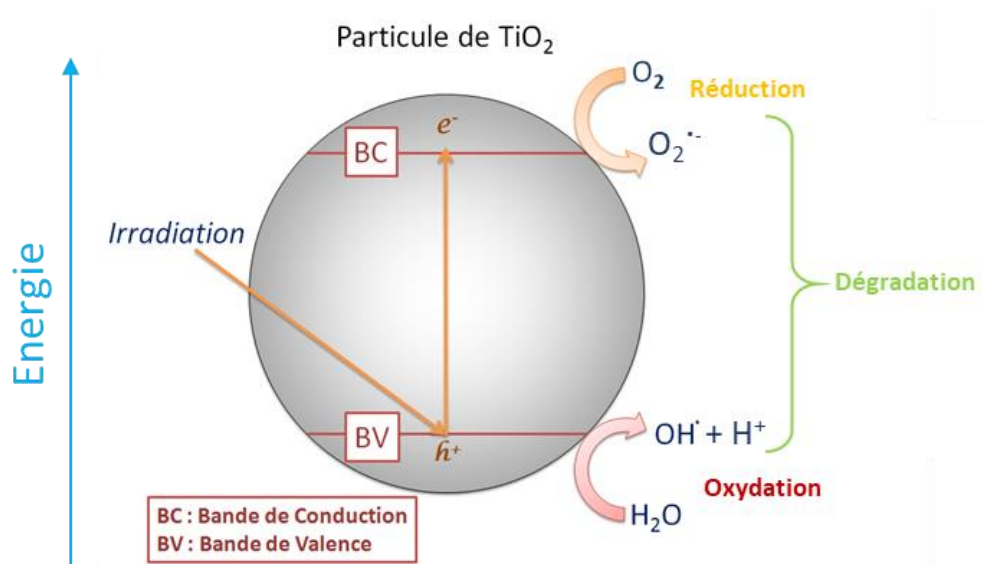


Figure 13 : Schéma de la photocatalyse à la surface d'une particule de TiO_2

Ces deux porteurs de charges vont conduire à différentes réactions qui sont détaillées dans les études de Turchi and Ollis, 1990 et Bhatkhande et al., 2002. Ces réactions peuvent conduire à la formation de radicaux pouvant alors oxyder et ainsi dégrader des polluants organiques tels que les composés organiques volatils (COV) en dioxyde de carbone (CO_2) et H_2O (Schaming et al., 2017).

1.3.1.4 Usage et application

Les principales applications du TiO_2 ont été présentées dans le [Tableau 3](#). La diminution du diamètre des NPs de TiO_2 permet de réduire l'interaction des particules avec la lumière visible, ce qui leur donne un aspect transparent après application cutanée. Ainsi, cela rend son utilisation possible en cosmétique ([Rossano, 2014](#)). Dans ce domaine, le TiO_2 peut aussi être répertorié sous le code « CI 77891 ».

Dans les peintures, le TiO_2 peut avoir la dénomination de « CI Pigment White 6 » et il est utilisé à la fois comme pigment mais aussi pour son effet photocatalytique. Il est estimé que 70% du TiO_2 produit est utilisé en tant que pigment pour les peintures, les plastiques, le papier, les médicaments et les aliments ([Weir et al., 2012](#)).

Bien que ce domaine soit minoritaire par rapport aux autres usages, les NPs de TiO_2 peuvent aussi se retrouver dans les revêtements des textiles pour le domaine du médical afin d'éviter les infections contractées à l'hôpital ([Kowal et al., 2014](#)). Le dioxyde de titane peut aussi être utilisé en tant que colorant dans les médicaments ([Rowe et al., 2009](#)).

Enfin, les particules de TiO_2 sont utilisées en tant que pigment blanc ou brillant dans les aliments, sous le nom de « E171 ». Cet additif est le composé d'intérêt pour ces travaux de thèse.

I.3.2 Utilisation du dioxyde de titane dans les aliments

I.3.2.1 Caractérisation

Le TiO_2 est officiellement nommé E171 dans les aliments par la Directive du Parlement Européen du 30 juin 1994 ([Parlement européen, 1994](#)). Le E171 se présente majoritairement sous forme de poudre blanche, constituée uniquement de particules de TiO_2 dont la taille n'était pas contrôlée. C'est en 2012 que la présence de NPs a été révélée pour la première fois par l'équipe de ([Weir et al., 2012](#)). Ils avaient caractérisé un échantillon de E171 produit par Fiorio Colori Spa (Milan, Italie) par Microscopie Electronique à Transmission (MET) et mesuré la concentration totale en Ti par ICP-MS de nombreux échantillons alimentaires. Les résultats obtenus par MET ([Figure 14](#)) ont montré que 36% des particules en nombre avaient un diamètre inférieur à 100 nm.

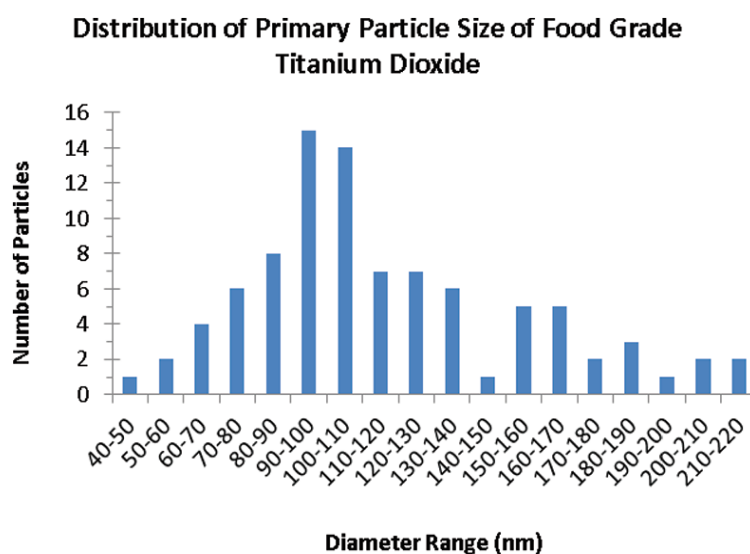


Figure 14 : Distribution en taille des particules d'un échantillon de E171 obtenue par MET par [Weir et al., 2012](#)

Cette publication, devenue référence, a favorisé les études sur la caractérisation de cet additif mais aussi sur sa potentielle toxicité. Elle a aussi été controversée par certains scientifiques ([Warheit et al., 2015](#)) qui remettaient en cause certains points de cette étude. Ils ont critiqué notamment la faible représentativité de cette distribution obtenue ([Figure 14](#)) sur seulement 100 particules. Ils mettent également en avant l'erreur d'appliquer la valeur de la fraction nanoparticulaire (en nombre) sur la concentration mesurée en masse, pour estimer la quantité de NPs ingérée par les consommateurs. Néanmoins, depuis la publication de ([Weir et al., 2012](#)), de nombreuses études ont caractérisé cet additif avec diverses méthodes comme la microscopie électronique, la diffusion dynamique de la lumière (DLS), le Fractionnement par couplage Flux-Force (FFF) ou encore, la spectrométrie de masse

à plasma à couplage inductif en mode « Single particle » (Sp-ICP-MS) (Cf. [Chapitre II](#)). Le [Tableau 5](#) répertorie les différentes études qui ont été menées sur la caractérisation du TiO₂ alimentaire. Selon ces données, l'additif E171 est majoritairement présent sous la forme anatase, mais certaines études retrouvent quelques traces de rutile ([Chen et al., 2013](#) ; [Yang et al., 2014](#) ; [Periasamy et al., 2015](#)). Le diamètre moyen des NPs de TiO₂ mesuré est aux alentours de 100-150 nm, avec une fraction nanoparticulaire en nombre dépassant rarement les 50%. La plupart des échantillons alimentaires analysés sont des chewing-gums, ainsi que des chocolats et confiseries. Cependant, certaines études ont retrouvé des NPs de TiO₂ dans des yaourts ou dans des crèmes de café ([Weir et al., 2012](#); [Lim et al., 2018](#)). Des écarts au niveau des résultats sont observés, ce qui semble être lié à la variabilité des lots de E171 utilisés ([Jovanović et al., 2016](#)). Parmi les méthodes de caractérisation employées, la microscopie électronique est la plus utilisée (dans 15 publications sur les 18 répertoriées). La méthode Sp-ICP-MS a été plus récemment utilisée dans trois publications en 2018. La caractérisation des NPs de TiO₂ est nécessaire puisque ces matériaux se retrouvent dans les différents compartiments environnementaux ([Keller and Lazareva, 2014](#); [Keller et al., 2014](#)). Or, la microscopie électronique est une méthode qui nécessite un temps d'analyse de l'échantillon plus élevé (≈ 1 h) que l'AF4-ICP-MS (≈ 30 min) ou la Sp-ICP-MS (< 5 min). C'est pourquoi il y a un fort intérêt pour ces nouvelles méthodes de caractérisation qui peuvent s'appliquer aussi bien à l'analyse d'aliments qu'à des analyses d'eau ou de sol.

Tableau 5 : Synthèse des études de caractérisation du E171

Echantillons	Structures cristallines	Diamètres moyens (nm)	Diamètre le plus fréquent (nm)	Distributions en taille (nm) <i>fraction nano</i>	Concentrations massiques Ti (mg/g)	Outils analytiques	Références
E171 (n=1) Aliments (n=21)	-	110 -	90-110 ^a -	30-400, 36% -	- $2 \cdot 10^{-4} - 3,6$	MET, DLS, ICP-MS	(Weir et al., 2012)
Chewing-gum (n=6)	Anatase x5 Anatase + trace rutile x 1	-	80-120 ^a	40-300 18-44%	1,5 – 3,9	MET, NTA, ICP-AES, DRX	(Chen et al., 2013)
E171 (n=1) Chewing gum (n=1)	Anatase	122 141	-	51-290, 23% 49-305, 23%	-	MET, DRX, XPS, DLS	(Faust et al., 2014)
E171 (n=7) Aliments (n=24)	-	-	-	60-300 5-15%	- 0,02 – 5,4	MEB, AF4-ICP-MS, Sp-ICP-MS	(Peters et al., 2014b)
E171 (n=5)	Anatase x4 Anatase/Rutile (22/78) x1	106-132 (MET) 127-504 (DLS)	90-120 ^a	30-300 ^a 17-35%	-	MET, XPS, DRX	(Yang et al., 2014)
E171 (=1)	-	152 (DLS)	-	30-250	-	MET, DLS	(Athinarayanan et al., 2015)
E171 (n=1) Chewing gum (n=4)	Anatase/Rutile -	42 -	35 ^a -	40-200 -	-	MET, DRX, DLS	(Periasamy et al., 2015)
E171 (n=1)	Anatase	99 (MET) 233 (DLS)	90-120 ^a	-	-	MET, DRX, DLS	(Song et al., 2015)
E171 (n=2) Chewing gum (n=1)	-	103 122	-	40-240, 54% 25-300, 35%	-	MET	(Faust et al., 2016)

^a Déterminé à partir de leurs données

n : nombre d'échantillon

Echantillons	Structures cristallines	Diamètres moyens (nm)	Diamètre le plus fréquent (nm)	Distributions en taille (nm) <i>fraction nano</i>	Concentrations massiques Ti (mg/g)	Outils analytiques	Références
E171 (n=1)	-	209 (DLS)	-	-	-	MEB, MET, DLS	(Freyre-Fonseca et al., 2016)
E71 (n=7)	Anatase	115-145	110-140 ^a	30-270 ^a 17-36%	-	MET, DRX, XPS, ICP-AES, Raman	(Dudefoi et al., 2017)
Chewing-gum (n=4)	Anatase	131-137	110-130 ^a	40-300 16-24%	0,5 - 12,1	MET, DRX, XPS, ICP-AES, Raman	(Dudefoi et al., 2018)
Chewing-gum (n=1)	-	-	50-75 ^a	31-200 40-42%	-	Sp-ICP-MS	(Candás-Zapico et al., 2018)
Bonbon chocolat (n=1)	-	122	52	25-400 ^a > 50%	1,1	Sp-ICP-MS, DLS, AF4-ICP-MS	(de la Calle et al., 2018a)
Chewing-gum (n=2)	-	126-140	54-100	- 50%	$1.10^{-3} - 0,7$	Sp-ICP-MS, DLS, AF4-ICP-MS	(de la Calle et al., 2018b)
Aliments (n=88)	-	-	-	50-300	$3.10^{-3} - 7.10^{-3}$	TEM-ICP-OES	(Kim et al., 2018)
Aliments (n=11)	Anatase	103-148	100-150 ^a	27-463 21-54%	0,2 - 4,6	TEM, Raman, DRX, ICP-MS	(Lim et al., 2018)
E171 (n=1)	-	95	95	10-400 ^a	-	MEB, MET, AFM, DLS	(Teulon et al., 2019)

^a Déterminé à partir de leurs données
n : nombre d'échantillon

1.3.2.2 Risques sanitaires

La présence significative des nanoparticules de TiO_2 dans les aliments et dans d'autres domaines a conduit à s'intéresser à sa toxicité. D'autant plus que des NPs de TiO_2 ont été retrouvées dans différents compartiments environnementaux (Larue et al., 2018 ; Peters et al., 2018 ; Venkatesan et al., 2018a). Dans une étude de Keller et al., 2014, les auteurs ont estimé que plus de 60% des NPs présentes dans les produits cosmétiques étaient rejetées dans l'eau, le sol et l'air lors de leur utilisation. Dans une autre étude, Keller and Lazareva (2014) estiment que les rejets de nanomatériaux au niveau mondial dans l'environnement, dont le TiO_2 , représentent plus de 25% (Figure 15).

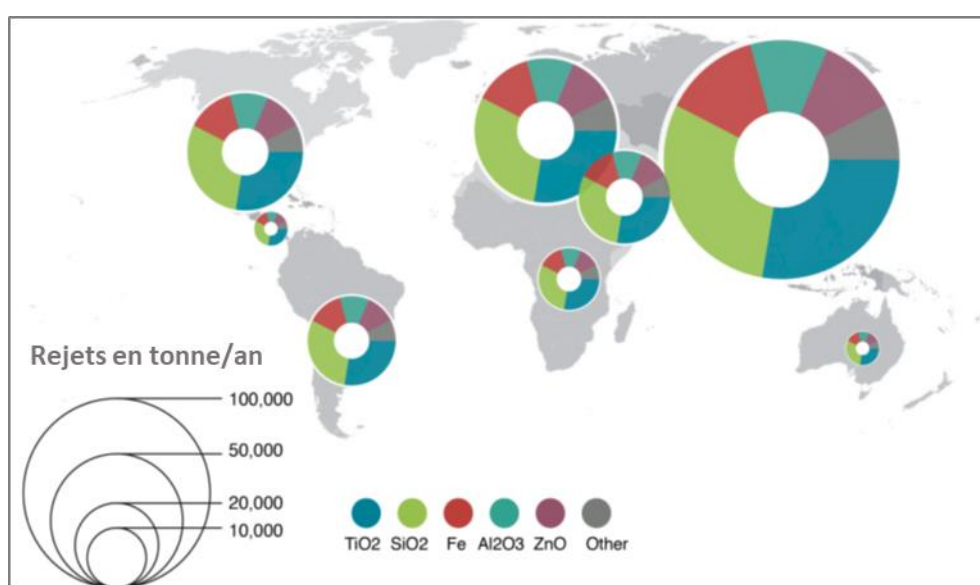


Figure 15 : Répartition des rejets de nanomatériaux estimés dans l'environnement (Keller and Lazareva, 2014)

Cela renforce le besoin de connaître les risques liés à l'utilisation de ces matériaux.

Le TiO_2 (toute taille confondue) a d'abord été classé comme « possiblement cancérigène pour l'homme » (groupe 2B) en cas d'inhalation, par le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC, 2006). En ce qui concerne l'inhalation, en raison du potentiel d'exposition professionnelle de certains travailleurs, de nombreuses études *in vivo* ont été effectuées sur des rongeurs. Ces NPs peuvent avoir un effet qui entraîne une vulnérabilité aux inflammations, ainsi qu'une hypersensibilité des voies respiratoires (Warheit and Donner, 2015 ; Shakeel et al., 2016). Certaines études ont même mis en avant l'augmentation du risque d'asthme lors du développement pulmonaire (Shakeel et al., 2016).

Du fait de la présence de NPs de TiO_2 dans de nombreux produits cosmétiques, plusieurs études ont été menées concernant l'exposition cutanée. La plupart n'observent pas de pénétration significative des NPs de TiO_2 à travers une peau intacte. Les NPs sont retrouvées principalement dans la couche cellulaire la plus superficielle de l'épiderme ou dans les follicules (Fage et al., 2016 ; Shakeel et al., 2016). Cependant, il y a encore des incertitudes quant à la pénétration de ces NPs jusqu'à des couches plus profondes de la peau lorsque sa surface est altérée (écorchure, eczéma et autres maladies de peau) (Warheit and Donner, 2015). Il est important de noter que l'usage de crèmes solaires contenant des NPs de TiO_2 peut aussi relarguer ces NPs dans le milieu marin (Botta et al., 2011), ce qui peut entraîner de nouvelles voies d'exposition, mais aussi des effets néfastes sur certaines espèces aquatiques (Minetto et al., 2017 ; Corinaldesi et al., 2018).

Concernant l'ingestion des NPs de TiO_2 , elle peut se faire lors de la consommation d'eau, d'aliments contenant du E171 ou encore de certains médicaments (Shakeel et al., 2016). Les NPs de TiO_2 peuvent pénétrer rapidement la muqueuse au niveau buccal et se retrouver dans les tissus inférieurs en quelques minutes (Fage et al., 2016). Ensuite, la distribution des NPs de TiO_2 va dépendre de leur surface (hydrophile/hydrophobe). En effet, les NPs hydrophiles ont tendance à se retrouver dans le cytoplasme tandis que les NPs hydrophobes sont piégées dans les vésicules. Le risque est plus élevé lorsque les NPs sont localisées dans le cytoplasme car elles sont libres d'interagir avec les autres constituants de la cellule (Fage et al., 2016).

Une étude a également déterminé que 0,6% d'une dose de NPs de TiO_2 administrée oralement se retrouve dans la circulation sanguine (Kreyling et al., 2017). Ces résultats confirment ceux observés sur l'homme avec une absorption rapide des NPs de TiO_2 au bout de 6h (Pele et al., 2015). Concernant la dose absorbée chez les rats, 0,05% se retrouve après sept jours dans plusieurs organes (foie, cerveau, rate, utérus...) tandis que le reste est éliminé. Une autre étude sur des spécimens post-mortem (Heringa et al., 2018) a prouvé la présence de NPs de TiO_2 dans le foie et la rate, avec une fraction nanoparticulaire de 24% (probablement sous-estimée à cause des limites de détection en taille des méthodes utilisées). Néanmoins, les voies d'absorption peuvent être multiples comme le montre la Figure 16, mais l'absorption intestinale reste la plus probable (Houdeau et al., 2018).

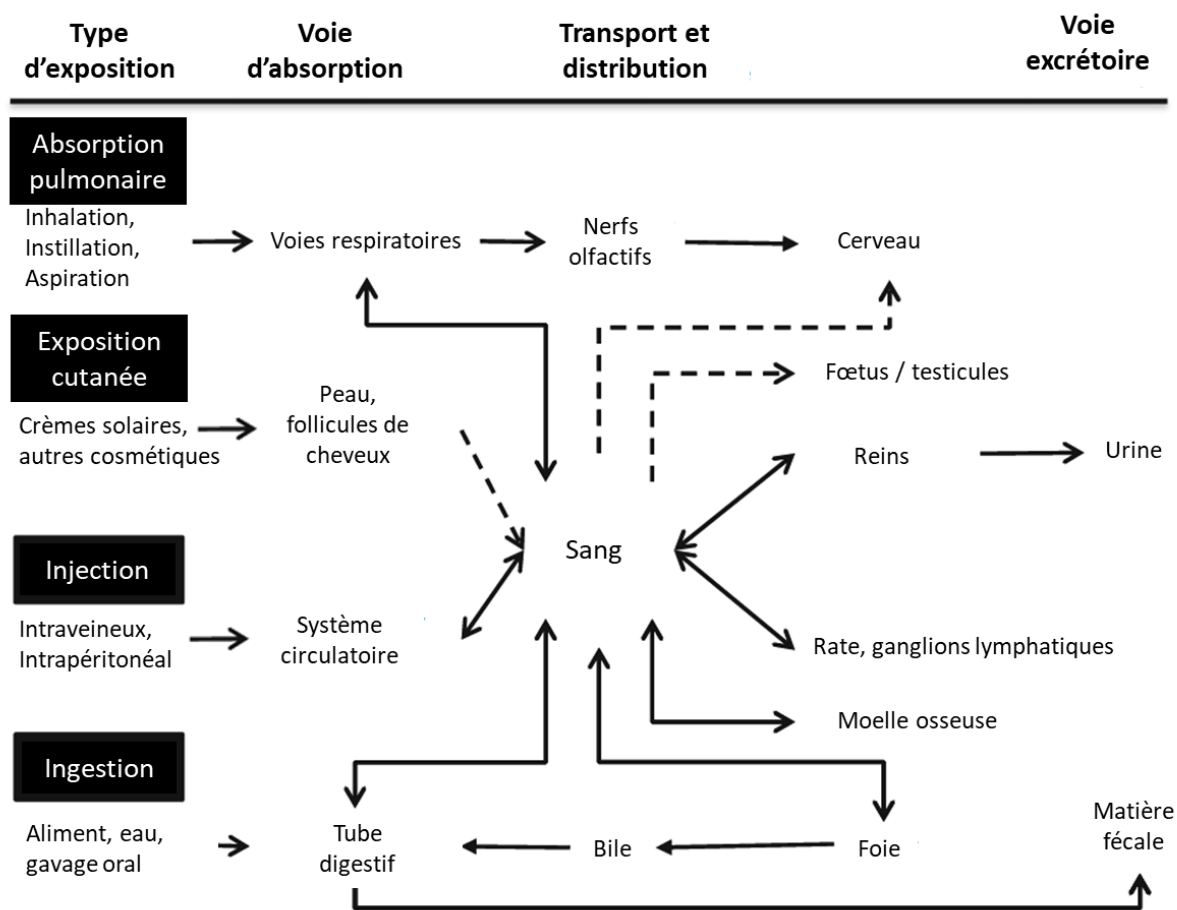


Figure 16 : Toxicocinétique et voies d'accumulation des NPs de TiO_2 . Les flèches en pointillé indiquent les incertitudes (adapté de [Shakeel et al., 2016](#))

Cette accumulation pouvant être chronique pose la question sur les risques sanitaires puisque les NPs de TiO_2 peuvent également avoir un impact sur la fertilité masculine de rats, ainsi que sur leur foie (nécrose irrégulière hépatocytaire, lésion dégénérative hydropique...) ([Wang et al., 2007](#) ; [Shakeel et al., 2016](#)). Ces NPs peuvent aussi perturber le microbiote intestinal ([Houdeau et al., 2018](#) ; [Li et al., 2018](#)). Enfin, en ce qui concerne le risque de carcinogénèse, basé principalement sur les effets génotoxiques, plusieurs études confortent l'hypothèse d'un impact sur la carcinogénèse colorectale ([Proquin et al., 2017](#); [Bettini et al., 2017](#); [Houdeau et al., 2018](#)). L'étude récente de [Peng et al., 2019](#) a mis en avant que les NPs de TiO_2 pouvaient probablement faciliter la migration de cellules cancéreuses du sein à travers l'endothélium vasculaire (couche la plus interne des vaisseaux sanguins). Les NPs pourraient donc accélérer l'intravasation et l'extravasation des cellules cancéreuses permettant leur dispersion dans l'organisme ([Figure 17](#)).

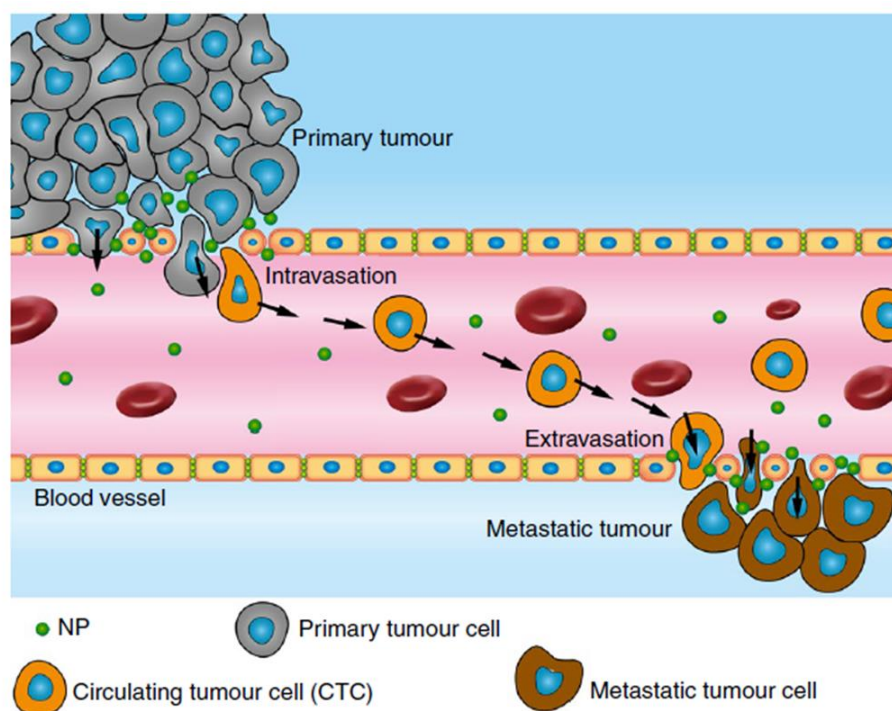


Figure 17 : Mécanisme d'action des NPs de TiO_2 mis en avant par Peng et al., 2019

Enfin, il est important de noter que les études de toxicité des NPs de TiO_2 utilisent différents types de NPs de TiO_2 (taille, couche de recouvrement, structure cristalline) à des concentrations qui ne sont pas systématiquement représentatives des concentrations présentes dans les produits de consommation (Warheit and Donner, 2015). C'est pourquoi, l'intérêt grandissant sur les risques liés aux NPs de TiO_2 va permettre d'accroître nos connaissances concernant l'exposition par voie orale, afin de mieux les évaluer et d'adopter des mesures de gestion efficaces. En attendant, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a conclu en 2016, puis en 2018, que les preuves expérimentales ne permettent pas de revoir la classification du TiO_2 en classe 1A (substances dont le potentiel cancérigène pour l'être humain est avéré) ou 1B (substances dont le potentiel cancérigène pour l'être humain est supposé) (EFSA, 2016, 2018).

1.3.2.3 Cadre législatif lié à l'additif alimentaire E171

Le E171 a officiellement été classifié comme additif en 1994 par le parlement Européen (Parlement européen, 1994). En 2009, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (anciennement afssa et aujourd'hui Anses) a fourni un rapport sur les NPs dans l'alimentation et recommandait la prudence à l'égard de l'utilisation de nanotechnologies en alimentation humaine ou animale (afssa, 2009). L'agence estimait également que le dispositif réglementaire devait « exiger une déclaration systématique de ces substances ou produits dans l'alimentation et conduire à des autorisations de

mise sur le marché » car il y avait peu d'études sur l'évaluation du risque sanitaire lié aux NPs dans l'alimentation.

En 2010, un règlement de la Commission européenne ([Commission européenne, 2010](#)) obligeait l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) à procéder à une réévaluation des colorants alimentaires (dont le E171) pour le 31 décembre 2015.

En 2011, un règlement du parlement européen concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires ([Parlement européen, 2011](#)) oblige, à partir de décembre 2014, que tous les ingrédients qui se présentent sous forme de nanomatériaux manufacturés soient indiqués clairement dans la liste des ingrédients avec la mention « nano » entre crochets. A quelques jours d'intervalle, une recommandation de la Commission européenne ([Commission européenne, 2011](#)) a fourni une définition des nanomatériaux ([Tableau 1](#)) qui prend en compte la granulométrie, alors que le règlement ne stipule aucune restriction liée à la granulométrie ([Tableau 1](#)). La sortie de ces deux textes a par conséquent créé la confusion auprès des industriels pour l'étiquetage des nanomatériaux dans les denrées alimentaires. Néanmoins, le Règlement 1169/2011 ([Parlement européen, 2011](#)) est prioritaire par rapport à la recommandation concernant l'étiquetage des aliments.

En 2013, la France devient le premier pays à instaurer une déclaration annuelle obligatoire des « substances à l'état nanoparticulaire » ([R-Nano, 2013](#)). Ces déclarations concernent les entreprises et laboratoires publics et privés qui produisent, distribuent ou importent une quantité minimale de 100 g de nanomatériaux. La définition utilisée est la même que la recommandation de la Commission européenne ([Tableau 1](#)). Les données collectées sont alors gérées par l'Anses et un bilan contenant des éléments issus de ces déclarations est mis à disposition du public chaque année sur son site internet.

Lors d'une réunion du Sous-Groupe des Autorités Compétentes sur les nanomatériaux (CASG Nano) en mars 2014, la Commission européenne affirme que la définition des nanomatériaux donnée par la recommandation de 2011 allait être revue afin d'homogénéiser les définitions et d'améliorer la législation autour de ces matériaux ([VeilleNano, 2010](#)). Néanmoins, la définition n'a pas encore été revue et serait programmée pour 2020 ([VeilleNano, 2010](#)).

En 2016, l'association « Agir pour l'Environnement » a publié des résultats révélant la présence de NPs dans quatre produits alimentaires (dont trois avec du E171) en France, à la suite des analyses effectuées par le Laboratoire National de métrologie et d'Essais (LNE) ([LNE, 2016](#)). La même année, l'EFSA a publié un avis relatif à la réévaluation du E171 et conclut que les expositions actuelles des consommateurs ne sont pas de nature à entraîner un risque sanitaire ([EFSA, 2016](#)).

En 2017, une étude met en avant que les NPs de TiO₂ peuvent avoir un impact sur la carcinogenèse colorectale ([Bettini et al., 2017](#)). Suite à cela, huit Organisations Non Gouvernementales (ONG) demandent au gouvernement français d'interdire les NPs de TiO₂ susceptibles d'être ingérées

([VeilleNano, 2010](#)). Dans le même temps, l'Anses conclut dans un rapport que ces travaux ne permettaient pas de remettre en cause la réévaluation du E171 menée par l'EFSA ([Anses, 2017](#)). L'agence recommande cependant de poursuivre les études sur le E171 au vu de cet effet inédit mis en avant par ([Bettini et al., 2017](#)).

Début 2018, la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) annonce avoir retrouvé des NPs dans 39% des produits analysés, via un communiqué de Presse du Ministère de l'Economie et des Finances ([Ministère de l'Economie et des Finances, 2018](#)). Le 27 mai 2018, un amendement est adopté à l'Assemblée Nationale visant à la suspension de « la mise sur le marché de l'additif E171 (dioxyde de titane - TiO_2), ainsi que les denrées alimentaires en contenant » ([Assemblée Nationale, 2018](#)). Cette suspension est ensuite confirmée par le vote du Sénat ([Sénat, 2018](#)) dans le cadre du projet de loi pour l'équilibre des relations commerciales dans le secteur agricole et alimentaire et une alimentation saine, durable et accessible à tous (EGALIM). Néanmoins, la signature de l'arrêté visant la suspension du E171 n'est toujours pas signé. Suite aux discussions entre le gouvernement et plusieurs ONG, le Ministère de l'Economie et des Finances demande à l'Anses « d'accélérer ses travaux sur les nanoparticules sur le volet TiO_2 pour le 15 avril, afin de mettre à jour sa précédente évaluation sur la base des nouvelles études disponibles ([Ministère de l'Economie et des Finances, 2019](#)).

La [Figure 18](#) permet de résumer les dates importantes autour de la législation du E171.

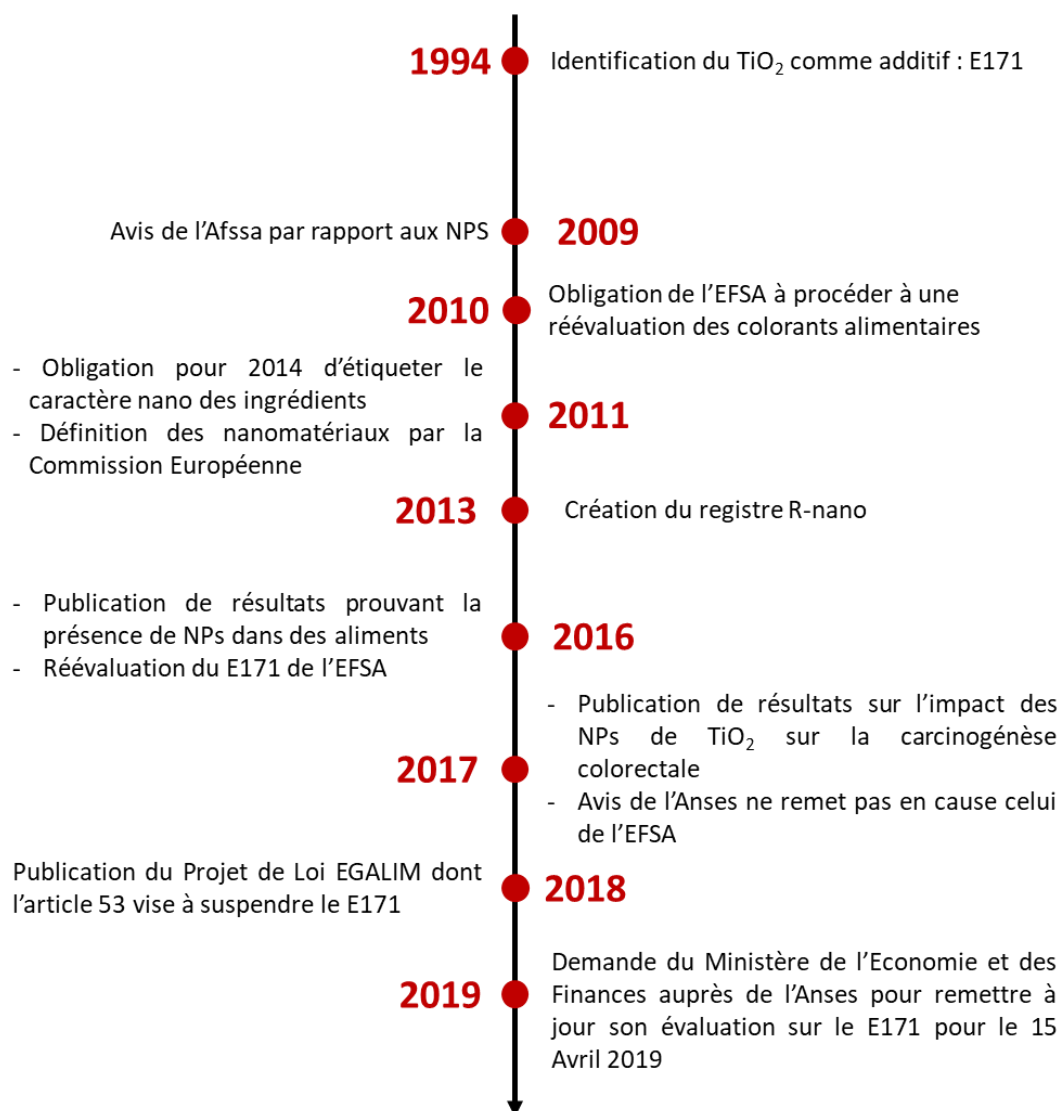


Figure 18 : Chronologie des évènements clés liés à la législation du E171

Enfin, en Avril 2019, l'Anses recommande une Valeur Toxicologique de Référence (VTR) chronique par inhalation de $0,12 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour le TiO_2 sous forme P25. Cette forme de TiO_2 est l'une des plus utilisées pour son effet photocatalytique. Il est utilisé comme photocatalyseur de référence avec plus de mille publications concernant des réactions photocatalytiques (Ohtani et al., 2010). C'est la première fois qu'une VTR est recommandée pour un nanomatériau en France (Anses, 2019) et suite à cela, des évaluations de risques sanitaires seront menées dans le cadre des actions de gestion des installations et sites industriels en France.

I.4 Bilan

Ce chapitre a dans un premier temps défini le terme « nanomatériau », à travers plusieurs définitions officielles fournies par différents organismes et textes de loi. Les différentes catégories de nanomatériaux ont ensuite été présentées dont les NPs, puis, leurs propriétés et applications ont été développées. La seconde partie, s'est concentrée sur les NPs de TiO_2 à travers ses propriétés structurales, optiques, électroniques et son effet photocatalytique. Les différentes problématiques autour des NPs de TiO_2 ont été abordées, comme les problématiques liées aux risques sanitaires à travers les voies d'exposition orale et pulmonaire et les rejets importants de ces matériaux dans l'environnement. Dans les aliments, ce matériau est présent en tant qu'additif E171 et il a été prouvé qu'une fraction des particules était présente à l'échelle nanométrique. C'est pourquoi, l'analyse et la caractérisation des NPs de TiO_2 est nécessaire pour répondre aux interrogations que suscitent les NPs de TiO_2 .

Le projet de thèse s'inscrit donc dans ce contexte où l'exposition de l'homme aux NPs de TiO_2 est potentiellement élevée, alors que les études liées à la toxicité sont encore insuffisantes pour réévaluer le E171 au niveau européen. L'alimentation étant une voie directe de pénétration dans l'organisme, ces travaux sont axés sur l'analyse des NPs de TiO_2 dans les aliments (E171) via deux méthodes de caractérisation à savoir AF4-ICP-MS et Sp-ICP-MS.

Chapitre II :

Principe des méthodes de caractérisation des NPs

II.1 Sommaire

Chapitre II : Principe des méthodes de caractérisation des NPs.....	Error! Bookmark not defined.
II.1 Sommaire	Error! Bookmark not defined.
II.2 Détermination de la masse volumique	Error! Bookmark not defined.
II.3 Détermination de la surface spécifique	Error! Bookmark not defined.
II.4 Détermination de la structure cristalline	Error! Bookmark not defined.
II.5 Détermination de la taille, forme et composition des NPs	Error! Bookmark not defined.
II.6 Détermination du diamètre hydrodynamique des NPs	Error! Bookmark not defined.
II.7 Détermination du potentiel zêta des NPs	Error! Bookmark not defined.
II.8 Fractionnement par couplage flux-force (FFF)	Error! Bookmark not defined.
II.9 Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode « Single particle » (Sp-ICP-MS).....	Error! Bookmark not defined.
II.10 Bilan	Error! Bookmark not defined.

Dans ce chapitre, les différentes méthodes de caractérisation des NPs de TiO₂ utilisées durant ces travaux de thèse sont présentées, à savoir : la pycnométrie, la méthode Brunauer, Emmett et Teller, la diffraction de rayons-X, la microscopie électronique ou la diffusion dynamique de la lumière. Ces différentes techniques permettent de mesurer différents paramètres physico-chimiques de matériaux comme la masse volumique, la surface spécifique ou encore la structure cristalline. Elles ont été utilisées pour caractériser au mieux les NPs de TiO₂ utilisées pour développer et d'optimiser les méthodes Fractionnement Flux-Force par Flux Asymétrique (AF4, [Chapitre III](#)) et la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode « single particle » (Sp-ICP-MS, [Chapitre IV et V](#)). Les principes de ces deux méthodes seront par conséquent beaucoup plus détaillés.

II.2 Détermination de la masse volumique

La pycnométrie est une méthode permettant de mesurer la masse volumique d'un matériau ou sa porosité. Cette technique utilise la méthode de déplacement d'un fluide. Le fluide peut être un liquide dans les cas des pycnomètres en verre, mais aussi un gaz dans le cas des pycnomètres hélium. La masse volumique des NPs est notamment utilisée dans les modèles de calcul en Sp-ICP-MS et permet même d'estimer une taille théorique si la surface spécifique des NPs est connue.

Dans cette étude, le pycnomètre hélium a été utilisé car il permet de déterminer de façon plus précise la masse volumique des matériaux. L'hélium est le gaz généralement recommandé par les constructeurs en raison de son faible diamètre atomique. Il est donc susceptible de pénétrer dans les pores inaccessibles à des gaz dont le diamètre atomique/moléculaire est plus élevé. La [Figure 19](#) présente les principaux éléments d'un pycnomètre hélium.

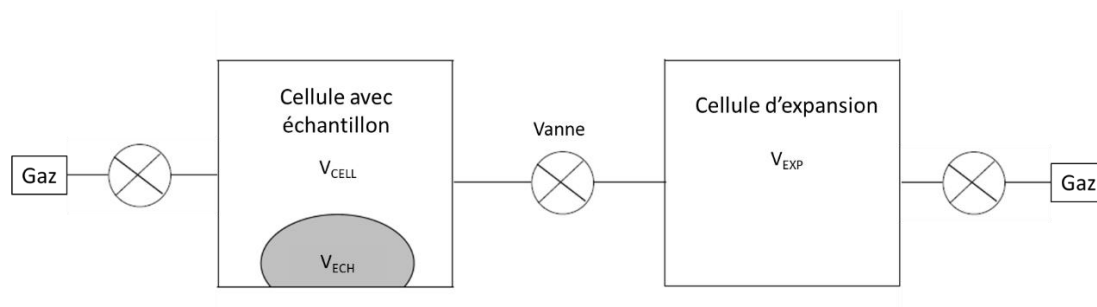


Figure 19 : Schéma d'un pycnomètre hélium

Ce système permet de mesurer le volume que représente l'échantillon à partir de plusieurs mesures de pression dont le détail se trouve en annexe ([Annexe A](#)).

Dans cette étude, un pycnomètre hélium Accupyc 1330 (Micromeritics Ltd, Hertfordshire, Royaume-Uni) mis à disposition par le C5 du CEA-Grenoble a été utilisé pour mesurer la masse volumique des NPs de TiO_2 dont les résultats sont présentés dans le [Chapitre 72III](#). L'échantillon de TiO_2 sous forme de poudre est pesé et déposé dans une cellule calibrée. Le volume de l'échantillon est mesuré après 24 h d'équilibre à un taux de 0,005 psi/min à température ambiante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) afin d'éliminer toutes les impuretés en surface.

II.3 Détermination de la surface spécifique

La surface spécifique est utilisée notamment pour estimer la taille des particules et permet de déterminer le potentiel de réaction des particules. La surface spécifique permet aussi de déterminer la surface spécifique volumique (VSSA) qui pourrait remplacer ou compléter les mesures de taille par microscopie électronique (Lecloux et al., 2017 ; Dazon et al., 2019). La technique la plus utilisée pour déterminer la surface spécifique est la méthode Brunauer, Emmett et Teller (BET) qui a été développée en 1938 (Brunauer et al., 1938). Cette technique consiste à modéliser l'adsorption physique (physisorption) de molécules d'un gaz sur une surface solide dans un système fermé. La physisorption est un phénomène qui se produit pour tout système gaz-solide ou gaz-liquide quand les conditions de température et de pression sont adéquates. C'est un phénomène réversible qui entraîne une diminution de la pression du système. La vitesse de désorption dépend de la structure du solide et parfois des propriétés du gaz (Babaa, 2004). Le modèle utilisé initialement pour obtenir les isothermes était celui de la théorie de Langmuir (1918), mais il est maintenant remplacé par celui de Brunauer et al. (1938) dont la théorie est plus détaillée dans l'Annexe A.

Dans cette étude, la surface spécifique des échantillons est calculée par la méthode BET en utilisant un Belsorp Max (MicrotracBEL, Osaka, Japon, Figure 20).



Figure 20 : Présentation du Belsorp Max (MicrotracBel, Japon)

Environ 700 mg de poudre de TiO₂ sont insérés dans une cellule de BET et subit un dégazage à 150 °C pendant 12h afin d'éliminer les traces d'eau ou les potentielles impuretés à sa surface. Ensuite, la cellule est plongée dans l'azote liquide à environ 77,3 K.

Les résultats de l'isotherme sont ensuite exportés et traités à l'aide d'une feuille de calcul interne. Comme il est expliqué dans l'[Annexe A](#), l'adsorption et la désorption sont évaluées par une isotherme dont les points retenus pour la détermination de la surface spécifique se situent dans la gamme de pression relative (P/P₀) de 0,05 à 0,3.

A partir de la surface spécifique (S_{BET}) et de la masse volumique du matériau (ρ_{échantillon}), il est possible de déterminer théoriquement un diamètre moyen en appliquant l'[Équation 1](#).

Équation 1

$$d_{théorique} = \frac{6000}{S_{BET} \times \rho_{échantillon}}$$

Avec :

S_{BET} : surface spécifique du matériau (m²/g)

ρ_{échantillon} : masse volumique du matériau (g/cm³)

Néanmoins ce calcul ne permet pas d'être précis si le matériau est polydisperse, c'est-à-dire qu'il contient des particules dont la taille varie significativement. Par conséquent, l'estimation de la taille par ce calcul peut servir de valeur de base pour des études de caractérisation ([Lecloux et al., 2017](#)).

II.4 Détermination de la structure cristalline

La structure cristalline d'un matériau solide donne des informations sur la répartition dans l'espace d'un motif atomique. La répartition ordonnée de ces atomes constitue des plans parallèles et équidistants nommés plans réticulaires. Les distances entre ces plans dépendent du diamètre et de la disposition des atomes dans le réseau cristallin. Ces distances sont constantes et peuvent être calculées généralement grâce à la méthode de diffraction des rayons-X (DRX) dont le principe est décrit brièvement dans l'[Annexe A](#). La [Figure 21](#) présente schématiquement le principe d'un diffractomètre.

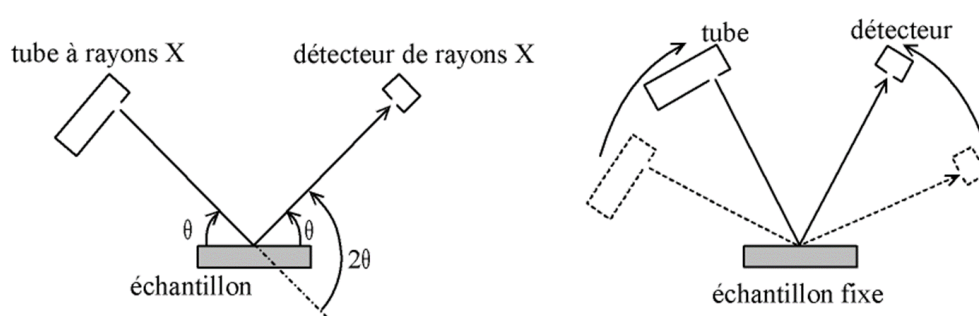


Figure 21 : Schéma du balayage angulaire effectué par le détecteur du diffractomètre

Le diffractomètre permet d'obtenir un spectre de diffraction qui est unique et spécifique selon la phase cristalline. Ainsi des bases de données sont créées et permettent de comparer les spectres connus avec les spectres d'échantillon inconnus afin de déterminer les phases cristallines de celui-ci.

Pour ces travaux de thèse, un diffractomètre Bruker Advance en géométrie θ - 2θ , avec une source Cu-K α et un détecteur linéaire LynxEye, ont été utilisés pour déterminer la structure cristalline des particules de TiO₂ par DRX, dont les résultats sont présentés dans le [Chapitre 72III](#). En fonction de la position des pics obtenus, il est possible d'identifier précisément les phases cristallographiques du TiO₂. Pour réaliser l'analyse, la poudre de TiO₂ a été réduite sous forme de pastille plate, puis déposée sur le portoir d'échantillon. Ces analyses ont été réalisées par Olivier Sicardy, ingénieur de recherche au CEA-Grenoble.

II.5 Détermination de la taille, forme et composition des NPs

Pour déterminer la taille des NPs, la microscopie électronique est généralement utilisée puisque c'est une méthode directe avec une très haute résolution. La microscopie électronique a été développée dans les années 1930 et a permis d'améliorer la résolution, qui était la principale limite des microscopes optiques (Williams and Carter, 2009). Cette nouvelle technologie est survenue suite à la théorie émise par De Broglie (1924) qui pensait que toute matière (dont les électrons) était dotée d'une onde associée. Les microscopes électroniques utilisent donc une source d'électrons dont la longueur d'onde est beaucoup plus faible que les longueurs d'onde du domaine visible, ce qui permet d'avoir une meilleure résolution. Deux catégories de microscope électronique se distinguent, à savoir le Microscope Electronique à Balayage (MEB) et le Microscope Electronique en Transmission (MET). Leur principe est brièvement détaillé dans l'Annexe A.

Ce qui différencie principalement ces deux techniques est que le MEB ne permet d'imager que la surface de l'échantillon étudié alors que le MET peut visualiser la structure interne (Figure 22). De plus la préparation d'échantillon est plus poussée pour le MET puisque le faisceau d'électron doit traverser l'échantillon. Celui-ci doit alors être suffisamment fin pour être analysé.

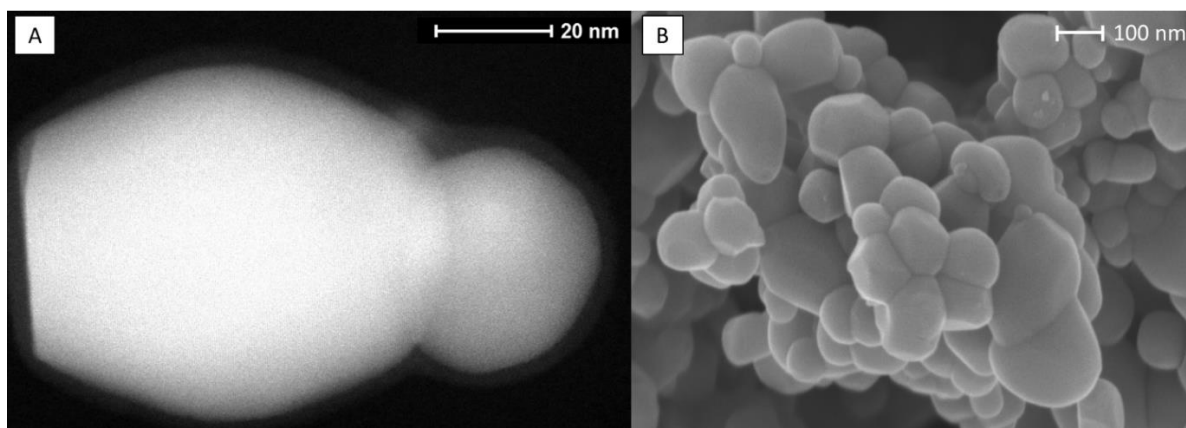


Figure 22 : Image de NPs de TiO_2 d'un E171 par (A) MET et (B) MEB

La microscopie électronique est la technique la plus couramment employée pour caractériser les NPs de TiO_2 dans les aliments (Tableau 5). Bien que cette méthode soit l'une des plus résolue à l'heure actuelle, son principal inconvénient porte sur la durée de l'analyse de l'échantillon (préparation + observation). De plus, l'image de la particule obtenue n'est qu'en deux dimensions alors que c'est un

objet à trois dimensions. Une population statistique importante est nécessaire pour obtenir une distribution en taille pertinente (Warheit et al., 2015).

Dans cette étude, pour réaliser les observations de NPs de TiO_2 , une dispersion dans l'eau ultrapure à 1 mg/L est préparée puis passée 15 min dans un bain à ultrasons à température ambiante. Une goutte de la dispersion est ensuite déposée sur une grille en cuivre avec un film de carbone ultrafin. Après séchage de la goutte, l'échantillon est analysé. Les observations microscopiques ont été réalisées avec un MET Tecnai Osiris (Thermo Fisher Scientific), doté d'un canon à électrons à émission de champ haute brillance (XFEG, Field Emission Gun) travaillant à 200 kV. Les analyses ont été effectuées en mode « microscopie électronique à balayage en transmission » (STEM). Ce mode permet de réaliser en parallèle une analyse par spectroscopie X à dispersion d'énergie (EDS) afin d'évaluer la composition chimique de surface des NPs. Ces travaux ont été réalisés par Nathalie Pelissier, ingénieur de recherche au CEA-Grenoble.

A partir des images du MET des particules de TiO_2 , une distribution en taille a été réalisée en utilisant un logiciel de traitement d'image (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, USA) et les diamètres maximum et minimum de Féret ont été mesurés. Le diamètre de Féret correspond à la plus grande ou plus petite distance entre deux droites parallèles et tangentes à la forme de la particule (voir Figure 23).

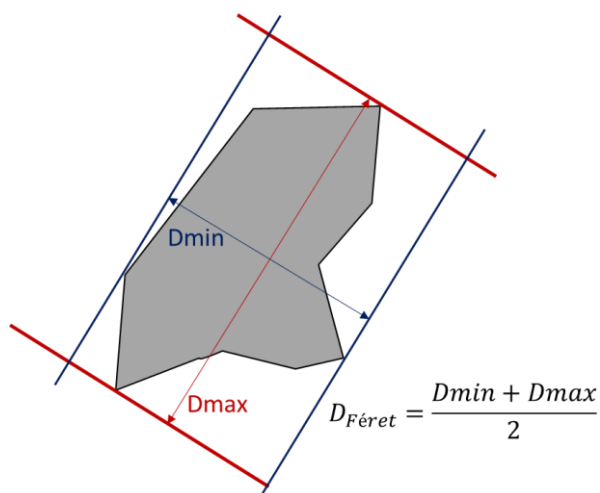


Figure 23 : Représentation du diamètre de Féret minimum et maximum d'une particule

Les données des diamètres ont été exportées sur Excel et un diamètre de Féret moyen a été calculé à partir des diamètres maximum et minimum (Figure 23), ce qui a permis d'établir une distribution en taille.

II.6 Détermination du diamètre hydrodynamique des NPs

La technique de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) est la méthode qui permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des particules en suspension. Le rayon hydrodynamique se définit comme le rayon de la sphère équivalente dont le coefficient de diffusion est mesuré par la DLS. Dans le cas de NPs qui présentent des charges électriques à leur surface, la couche de solvatation sera prise en compte, ce qui entraîne une surestimation de la taille des NPs ([Kaasalainen et al., 2017](#)).

La technique DLS consiste à envoyer un faisceau de lumière sur des particules en suspension et à mesurer la lumière diffuse qui en résulte. Étant donné que les NPs dispersées dans un solvant subissent un mouvement brownien, elles sont en mouvement en permanence et l'intensité de la lumière diffuse qui est mesurée va évoluer en fonction de leur déplacement ([Pecora, 2000](#) ; [Bhattacharjee, 2016](#)). Ainsi, la méthode DLS évalue la fluctuation du signal en fonction du temps ([Figure 24](#)).

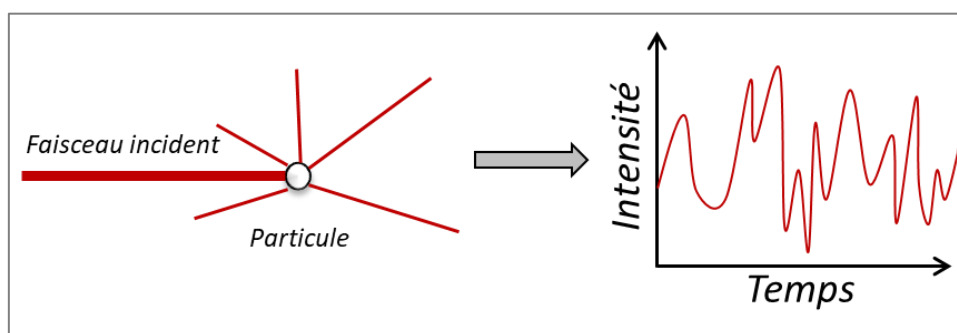


Figure 24 : Schéma du principe de la diffusion dynamique de la lumière suite à l'interaction avec une particule

Plus une particule est petite, plus son mouvement brownien augmente et donc plus la variation de l'intensité de la lumière diffuse mesurée sera élevée ([Podzimek, 2011](#)). La variation est évaluée grâce à un processus mathématique appelé fonction d'autocorrélation et permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des particules (voir les détails dans l'[Annexe A](#)). La DLS peut aussi fournir une distribution en taille des particules qui peut être représentée selon trois modèles, à savoir : l'intensité, le volume et le nombre ([Malvern Instrument, 2017](#)). Ces différentes représentations sont issues d'une même réalité physique mais les distributions en intensité et volume mettent l'accent sur les grosses particules, tandis que la distribution en nombre met en avant les petites particules, comme le montre la [Figure 25](#).

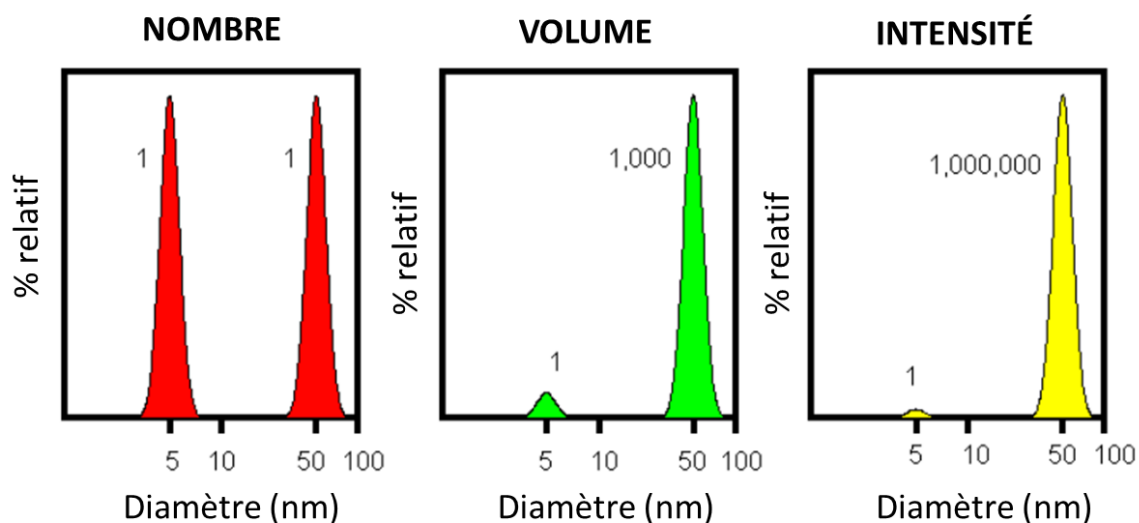


Figure 25 : Distributions en taille, en nombre, en volume et en intensité, d'une dispersion de particules de 5 nm et 50 nm de diamètre, présentes en quantité égale, obtenues par DLS (adapté de [Malvern Instrument, 2012](#))

Pour ces travaux de thèse, un dispositif ZetaSizer Nano ZS est utilisé pour mesurer le rayon hydrodynamique des particules de TiO_2 à l'aide de la méthode des cumulants dans le but d'évaluer l'impact du pH, de la force ionique et de la présence de tensioactifs sur la dispersion des particules. Cet appareil permet également de mesurer le potentiel zêta des particules (voir [paragraphe II.7](#)).

II.7 Détermination du potentiel zêta des NPs

La mesure du potentiel zêta permet d'évaluer la stabilité des particules afin de déterminer si les répulsions électrostatiques sont suffisantes pour maintenir les particules bien dispersées (Bhattacharjee, 2016). Le potentiel zêta se définit par la charge électrique qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entoure lorsqu'une particule est en mouvement (Kaszuba et al., 2010). En effet, lorsqu'une particule est en solution et que sa surface est chargée électriquement, des ions s'organisent autour de façon à former plusieurs couches (Figure 26).

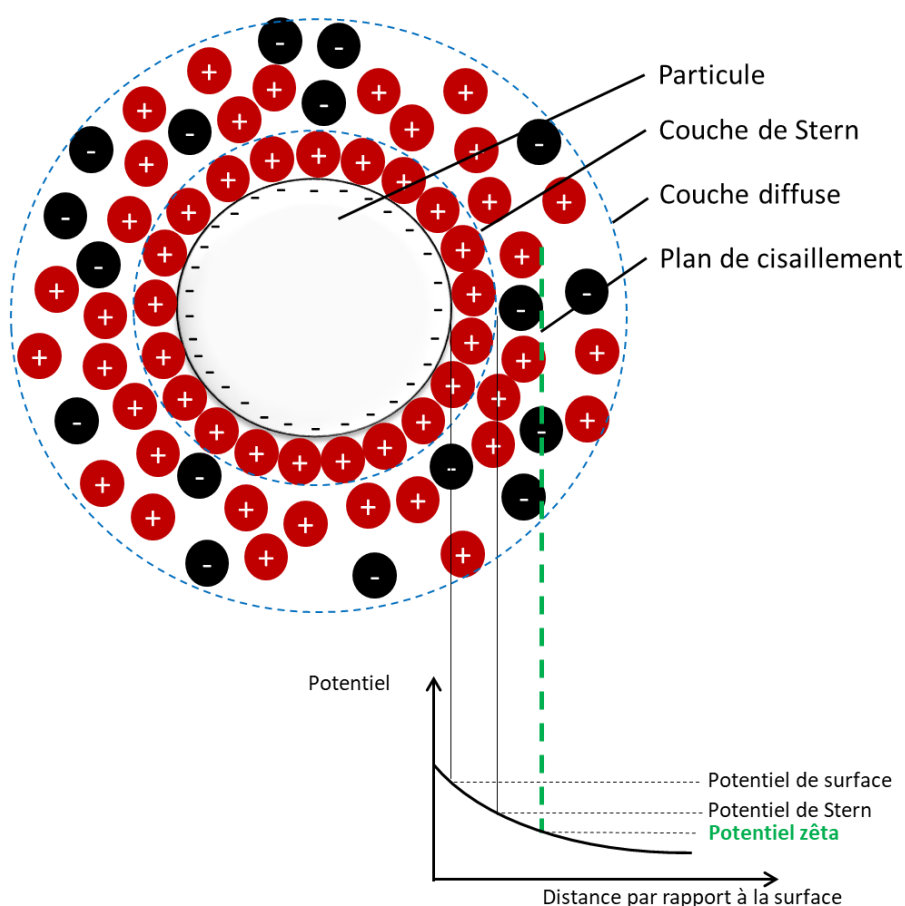


Figure 26 : Schéma du modèle de la double couche électrique

Une particule présentant des fonctions de surface négatives va attirer principalement les cations qui vont former une couche rapprochée autour de la particule : c'est la couche de Stern. Cette couche est immobile et liée avec la surface du matériau, tandis que la deuxième couche, qui est plus éloignée de la surface, peut être mobile : c'est la couche diffuse. Au niveau de cette couche, il existe un plan de cisaillement qui représente la frontière entre la fraction des ions qui restera fixée au solide et la

fraction qui se décrochera en cas de mise en mouvement de la particule. Le potentiel zêta représente la différence de potentiel de la couche diffuse et de la fraction de charge électrique qui reste liée à la particule (Kaszuba et al., 2010). Les appareils utilisant la DLS sont souvent capables de mesurer le potentiel zêta en parallèle, par électrophorèse laser doppler. Il n'est pas possible de le déterminer directement, mais par l'intermédiaire de la mobilité électrophorétique des particules. En effet, les cellules utilisées pour la DLS peuvent être équipées d'électrodes (Figure 27), ce qui permet d'appliquer un champ électrique à la dispersion contenant des NPs. Les particules chargées vont alors se déplacer vers une électrode possédant une charge inverse à la leur.

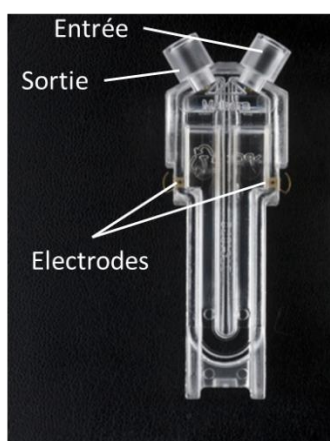


Figure 27 : Cellule utilisée en DLS

La longueur d'onde du faisceau diffusé sera décalée par rapport à la longueur d'onde du laser incident puisque les particules sont en mouvement (effet doppler). Ce décalage de longueur d'onde est alors mesuré pour déterminer la vitesse des particules, qui permet à son tour de déterminer le potentiel zêta des particules (voir les détails dans l'Annexe A).

Comme pour la méthode DLS, un dispositif ZetaSizer Nano ZS est utilisé pour mesurer le potentiel zêta des différentes NPs de TiO_2 étudiées.

II.8 Fractionnement par couplage flux-force (FFF)

La méthode Fractionnement par couplage Flux-Force par Flux Asymétrique (AF4) fait partie de la famille des techniques de « fractionnement par couplage flux-force » (FFF) développées dans les années 70 (Giddings, 1966, 1993). Ces méthodes permettent de séparer des particules ayant des tailles comprises entre quelques nanomètres et une dizaine de micromètres. La différence entre ce type de méthode et la chromatographie en phase liquide est que la séparation ne dépend pas de l'interaction entre les analytes et les phases mobile et stationnaire. Avec les méthodes FFF, la phase mobile entraîne seulement les analytes pendant qu'un champ de force perpendiculaire au canal permet la séparation (Figure 28). Ainsi, la séparation ne repose en théorie que sur des interactions physiques entre l'échantillon et les forces appliquées. De ce fait, il n'y a théoriquement pas de phénomène physico-chimique pouvant modifier et/ou détruire les analytes. Il existe plusieurs sortes de forces comme les forces thermiques, électriques, sédimentaires et fluidiques. La méthode AF4 utilise une force fluidique (FIFFF), ce qui permet de séparer rapidement les analytes et ainsi de diminuer les effets de dilution.

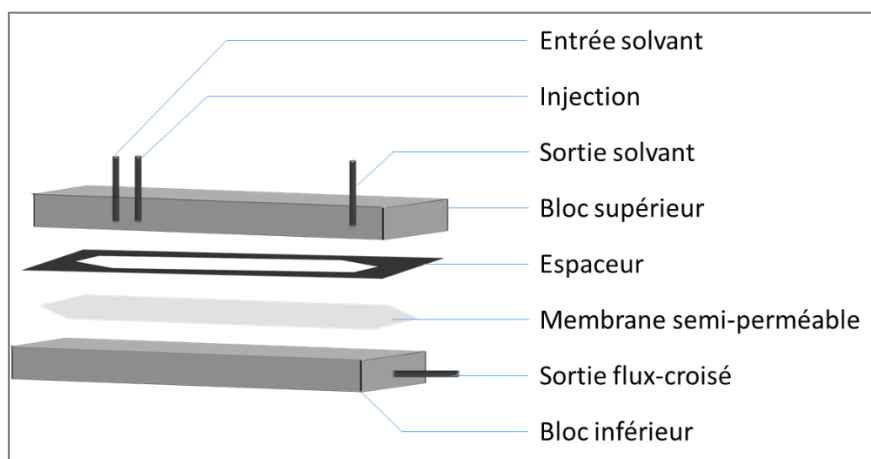


Figure 28 : Schéma d'un système AF4

La force perpendiculaire sur la direction du mouvement de la phase mobile, qui est appelée « flux croisé » ou « crossflow » en anglais, est créée à partir d'un deuxième flux de phase mobile. Une différence de pression à travers une paroi semi-perméable au niveau du bloc inférieur permet de générer ce flux croisé. La membrane semi-perméable retient les analytes qui ont une taille supérieure au seuil de coupure de la membrane, tout en laissant passer le solvant ainsi que la phase dissoute. Grâce à la force fluidique, l'AF4 permet d'avoir un impact sur tous les objets non liés à un support fixe

(Wahlund and Giddings, 1987). Cela signifie que cette méthode peut s'appliquer à l'analyse de nombreux analytes. La Figure 29 représente le montage complexe du système FFF mis en place pour générer le flux croisé et qui permet l'élution des analytes.

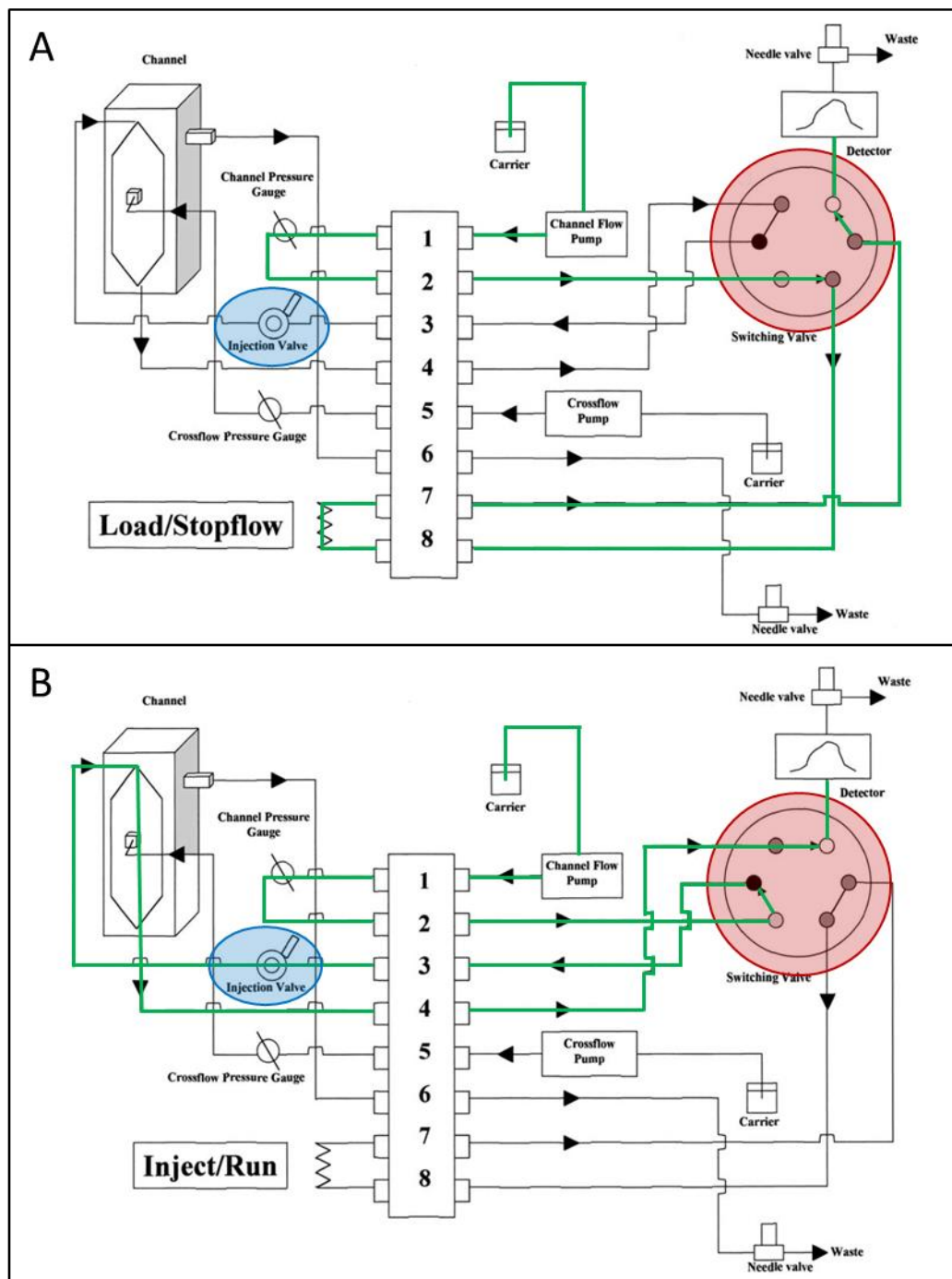


Figure 29 : Représentation d'un système classique AF4 en mode (A) chargement et (B) élution. En vert est représenté le chemin de la phase mobile jusqu'au détecteur, en rouge la vanne à six voies et en bleu là où est injecté l'échantillon (adapté de Gimbert et al., 2003)

Le système utilise une vanne à six voies (en rouge sur la [Figure 29](#)) afin de pouvoir charger l'échantillon ([Figure 29A](#)). Puis en inversant la vanne à six voies ([Figure 29B](#)), la phase mobile passe par la vanne d'injection et par le canal où les analytes sont séparés avant d'atteindre le détecteur. En plus d'avoir un montage de vanne complexe, il existe plusieurs modes d'élution en AF4 qui diffèrent selon la taille des particules : le mode normal, le mode stérique et le mode hyperlayer ([Giddings, 1993 ; Schimpf et al., 2000](#)) ([Figure 30](#)).

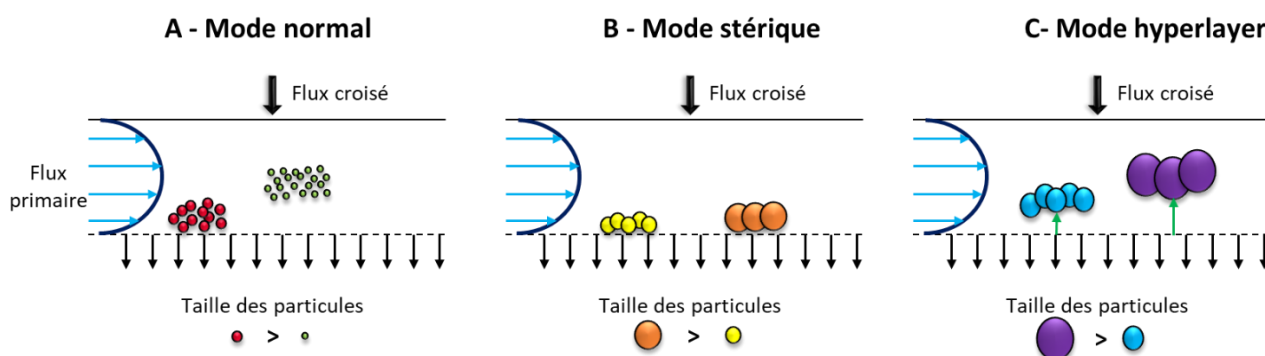


Figure 30 : Schéma des différents modes d'élution pour la méthode AF4

II.8.1 Utilisation de l'AF4 en mode normal

L'utilisation de ce mode permet de séparer les analytes en fonction de leur capacité à diffuser contre la force fluidique appliquée, faisant intervenir essentiellement leur coefficient de diffusion. Plus ce dernier est élevé, plus les analytes diffusent facilement à contre sens du flux croisé. Etant donné que le flux primaire possède un profil parabolique, la vitesse d'élution sera plus élevée pour les analytes ayant un fort coefficient de diffusion. Concernant les particules pour lesquelles les coefficients de diffusion sont plus élevés lorsque leur taille diminue, les analytes sont élués de la plus petite taille à la plus grosse ([Figure 30A](#)).

II.8.2 Utilisation de l'AF4 en mode stérique

Le mode stérique s'applique pour des particules plus grosses avec des diamètres compris entre 0,5 et 200 μm ([Giddings, 1993](#)). La diffusion des particules contre la force fluidique est quasi-supprimée, ce qui rend son influence non significative dans le mécanisme de séparation. Ainsi, les analytes avancent grâce au flux primaire et plus la particule est grosse, plus elle est éluee rapidement par le flux primaire. En effet, le flux primaire n'est pas identique sur toute la hauteur du canal, de ce fait, les grosses particules qui atteignent une hauteur plus élevée, sont soumises à un flux primaire supérieur. Par conséquent, les particules les plus grosses seront éluées en premières ([Figure 30B](#)).

II.8.3 Utilisation de l'AF4 en mode hyperlayer

Pour des vitesses d'élution importantes et lorsque les particules ont des tailles supérieures à 10 μm , il est possible qu'une force de répulsion hydrodynamique repousse la particule de la membrane. Lorsque les particules sont déplacées à une hauteur supérieure à la valeur de leur diamètre, alors le mode de séparation s'appelle *hyperlayer*. Dans ce mode, l'ordre d'élution reste décroissant, avec les grosses particules arrivant en premier au détecteur, puis les plus petites (Figure 30C).

Dans le cas de ces travaux de thèse, la taille des particules primaires étant inférieure à 100 nm, le mode normal sera donc appliqué.

II.8.4 Etapes de la séparation

En AF4, la séparation se déroule en trois étapes à savoir (i) l'étape d'injection-concentration, (ii) l'étape de concentration-relaxation et (iii) l'étape d'élution. Chacune nécessite d'être optimisée afin d'avoir une séparation optimale des NPs avec un temps d'analyse raisonnable.

II.8.4.1 Etape d'injection-concentration

Cette première étape est aussi appelée étape « Focus ». Elle consiste à introduire l'échantillon dans le canal à l'aide d'un injecteur délivrant usuellement entre 1 et 100 μL d'analyte. Le flux injecté s'ajoute au flux principal de la phase mobile. Afin d'éviter la dispersion des analytes dans le canal lors de cette étape, le système est placé en mode « focus ». Il met un autre flux en opposition au flux principal, venant en sens inverse et avec un débit plus fort. L'échantillon est alors préconcentré à l'interface de ces deux flux sur la ligne de concentration (Figure 31).

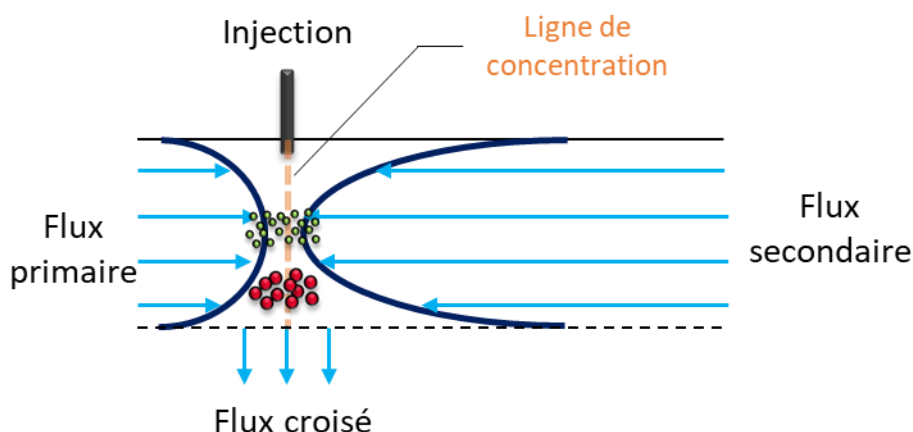


Figure 31 : Représentation des étapes d'injection-concentration et de concentration-relaxation au niveau du canal AF4

II.8.4.2 Etape de concentration-relaxation

Cette étape maintient localement l'échantillon pendant un temps bien défini (1-20 min). Durant ce laps de temps, les analytes se relaxent, c'est-à-dire qu'ils trouvent leur position d'équilibre dans la hauteur du canal par rapport au flux croisé appliqué et à leur capacité à diffuser à contre-flux. Il y a donc une première séparation des particules lors de cette étape. Ainsi, seul le flux croisé influence l'analyte dans cette étape (Figure 31).

II.8.4.3 Etape d'élution

Lors de cette étape, le flux opposé est stoppé, ce qui initie l'élution des analytes. Le flux croisé est conservé de façon à maintenir la distribution verticale des particules dans la hauteur du canal (Figure 32).

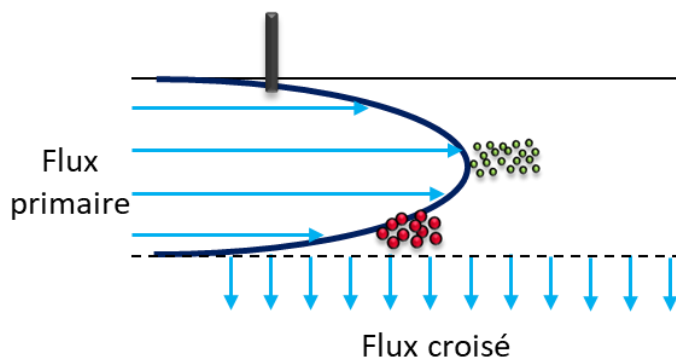


Figure 32 : Représentation de l'étape d'élution au niveau du canal AF4

II.8.5 Les principaux paramètres influençant la séparation par AF4

Il existe plusieurs paramètres qui ont un impact significatif sur la qualité de la séparation d'un des analytes en AF4 à savoir : (i) la membrane, (ii) la quantité injectée, (iii) le temps et les débits pour les différentes étapes ou encore (iv) la nature de la phase mobile. Les différents paramètres permettant l'analyse des NPs de TiO_2 par AF4 sont répertoriés dans le [Tableau 6](#). Les parties suivantes reprendront des éléments de ce tableau pour mettre en avant les influences de chaque paramètre sur la séparation des particules.

Tableau 6 : Résumé des paramètres utilisés pour la caractérisation de NPs de TiO₂ par AF4. Les paramètres retenus/recommandés par les auteurs de l'étude sont en vert.

Modèle AF4	Echantillon	Phase mobile	Membrane	Volume d'injection (μL)	Temps de concentration et flux croisé utilisé	Flux croisé (mL/min)	Flux primaire (mL/min)	Référence
F-1000 (Postnova)	P25 TiO ₂ rutile Crème solaire	FL-70 0,1% (v/v) + NaN ₃ 0,02% (w/v)	RC 10 kDa	20	2-3 min Flux croisé NI	0,5-2,5	0,5-2,5	(Contado and Pagnoni, 2008)
Eclipse 2 (Wyatt Technology)	NPs inorganiques	Sels : NaNO ₃ - CH ₃ COONa NH₄NO₃ - CH ₃ COONH ₄ pH : 8 - 10 Tensioactif : SDS 9.10⁻⁴ M - Tween 20	RC 10 kDa	NI	NI 0,15 mL/min	0,3 0,5 0,8	1	(Dubascoux et al., 2008)
AF2000 MT (Postnova)	NM-104 Crème solaire	Eau ultrapure	RC 10 kDa	20	4 min 1,5 mL/min	1 → 0	0,5	(Nischwitz and Goenaga-Infante, 2012)
Eclipse 3 (Wyatt Technology)	P25 TiO ₂	Eau ultrapure SDS 0,01% SDS 0,1mM + NH ₄ NO ₃ 1mM Triton X-100 0,01% Hexametaphosphate de sodium 1mM Diphosphate de sodium 1 mM MEAA 0,1%	RC 10 kDa RC 30 kDa PES 10 kDa PVDF 30 kDa	20	4 min 1,5 mL/min	1,5 → 0	1,5	(Bendixen et al., 2014)
Eclipse Dualtec (Wyatt Technology)	Aliment (n=24)	BSA (0,5 mg/L)	RC 10 kDa	10	7 min NI	0,1 → 0	0,5	(Peters et al., 2014b)
AF2000 (Postnova)	TiO ₂ rutile Aliments (n=2)	SDS 0,2%(m/v) + MeOH 6%(v/v) à pH 8,7	RC 10 kDa	200	4 min 1,3 mL/min	0,5 → 0	1	(López-Heras et al., 2014)

NI : Non Indiqué

Modèle AF4	Echantillon	Phase mobile	Membrane	Volume d'injection (μL)	Temps de concentration et flux croisé utilisé	Flux croisé (mL/min)	Flux primaire (mL/min)	Référence
Eclipse Dualtec et Eclipse 3+ (Wyatt Technology)	NM-103 NM-104 E171 (n=7)	FL-70 (200 mg/L) + NaN ₃ (3,08 mM)	RC 10 kDa PES 10 kDa	10 et 50	4 min 1,5 mL/min	0,1 → 0	0,5	(Helsper et al., 2016)
AF2000 MT (Postnova)	NM-104	Eau ultrapure FL-70 0,2% (m/m) BSA 0,05% (m/m) NaPP 0,1% (m/m)	RC 10 kDa	20	5 min NI	1,6 → 0,6	0,4	(Omar et al., 2016)
AF2000 (Postnova)	TiO ₂ (mélange rutile-anatase) Encre (n=4)	Eau ultrapure	RC 10 kDa	20	3 min 1 mL/min	1 → 0	1	(Bocca et al., 2017)
Eclipse® (Wyatt Technology)	Crème solaire (n=1) Chocolat (n=1)	Eau ultrapure SDS 0,1% (m/v)	RC 10 kDa	5-100	10 min 1,5 ml/min	0,5 → 0	0,5	(de la Calle et al., 2018a)
Eclipse Dualtec (Wyatt Technology)	NM-100 Crème solaire (n=5)	FL-70 0,05%	RC 10 kDa	25	4 min 1 mL/min	0,3 → 0	0,7	(Bocca et al., 2018)
Eclipse 3 (Wyatt Technology)	Dentifrice (n=1)	SDS 0,05% SDS 0,025% FL-70 0,025%	PES 10 kDa RC 10 kDa	10 50	15 min 0,5 mL/min	0,5 → 0	1	(Correia et al., 2018)

NI : Non Indiqué

II.8.5.1 La membrane

Les membranes sont généralement composées de cellulose régénérée (RC), de polyéthersulfone (PES) ou de polyvinylidène fluoride (PVDF) ([Tableau 6](#)). Elles sont caractérisées par leur nature et par leur seuil de coupure (Molecular Weight Cut Off – MWCO).

Concernant l'analyse des NPs de TiO₂, les membranes RC sont les plus utilisées ([Tableau 6](#)), bien que récemment [Correia et al. \(2018\)](#) obtiennent une meilleure reproductibilité avec une membrane en PES. Dans une étude de [Helsper et al. \(2016\)](#), les auteurs ont comparé des membranes en PES et RC et obtiennent des pics plus fins avec ces dernières. Les membranes PVDF sont plus utilisées pour d'autres types de NPs comme l'or et l'argent ([Hagendorfer et al., 2011, 2012 ; Helsper et al., 2016](#)). Il a été montré que les membranes peuvent avoir des interactions électrostatiques avec les particules, dues à leur charge de surface ou potentiel zêta, pouvant donc avoir un impact sur la séparation des particules en AF4 ([Ulrich et al., 2012 ; Bendixen et al., 2014 ; Helsper et al., 2016](#)). En effet, lorsque la particule et la membrane présentent des charges de surface de signes opposés, les attractions électrostatiques sont alors favorisées. [Bendixen et al. \(2014\)](#) ont pu observer une diminution du taux de récupération des particules avec des seuils de coupures plus faibles. Ils ont ainsi supposé que plus ces seuils sont faibles, moins la surface de la membrane est chargée négativement, ce qui entraîne une diminution des répulsions électrostatiques, comme observé par [Fievet et al. \(2000\)](#).

II.8.5.2 La quantité injectée

Dans un système asymétrique, il est recommandé d'injecter de petits volumes, d'une centaine de microlitres, pour conserver l'efficacité de l'étape de concentration et donc de la séparation ([Gigault, 2011](#)). Ainsi, il a pu être mis en avant que si la concentration des échantillons injectés augmente, cela peut alors diminuer la rétention des analytes et ainsi entraîner une détérioration de la séparation ([Martin and Feuillebois, 2003 ; Bendixen et al., 2014](#)). En ce qui concerne la caractérisation des NPs de TiO₂, le volume d'injection varie entre 5 et 200 µL ([Tableau 6](#)).

II.8.5.3 Le temps de l'étape de relaxation

Le temps de l'étape de relaxation varie généralement entre 2 et 15 min ([Tableau 6](#)). [Bendixen et al. \(2014\)](#) ont optimisé le temps de cette étape pour l'analyse de NPs de TiO₂. Il s'avère que plus le temps de relaxation est élevé, plus le pic obtenu est fin. Mais les auteurs ont aussi remarqué que le rendement diminue également car il y a plus d'interactions entre les NPs et la membrane. De ce fait, ils ont retenu un temps de relaxation optimal de 4 min.

II.8.5.4 Les débits des différents flux

Comme cela a été présenté ([Figure 31](#)), plusieurs flux entrent en jeu pour séparer les particules. Ces différents flux doivent donc être optimisés afin d'obtenir une séparation optimale. Pendant l'étape de concentration, le flux croisé doit être maîtrisé afin d'obtenir une ligne de concentration ([Figure 31](#)) correcte. Cela correspond à une bonne rétention des analytes sur une zone fine de la membrane pour éviter la diffusion ou l'élution d'une partie de l'échantillon injecté. Dans le cas de l'analyse de TiO₂, le flux croisé varie entre 0,15 et 1,5 mL/min ([Tableau 6](#)). Pendant l'élution, si le flux croisé est trop élevé, cela peut entraîner une perte des analytes via l'adsorption sur la membrane ou la perméation à travers la membrane des particules ([Manh Thang et al., 2001](#) ; [Heroult et al., 2014](#)). Comme en chromatographie, la vitesse du flux d'élution permet de faire sortir plus ou moins rapidement les analytes et donc d'améliorer ou non la séparation. Dans la plupart des cas, le flux croisé démarre à un débit maximal puis diminue progressivement jusqu'à 0 mL/min afin d'éluer les particules résiduelles du canal ([Tableau 6](#)). En ce qui concerne le flux primaire, il varie selon les études de 0,4 à 2,5 mL/min ([Tableau 6](#)).

II.8.5.5 La nature de l'éluant

Etant donné que les interactions électrostatiques qui ont lieu entre la membrane et les particules entraînent des problèmes de séparation, des études se sont intéressées à la composition de la phase mobile afin d'améliorer la séparation et augmenter le taux de récupération ([Delay et al., 2011](#) ; [Ulrich et al., 2012](#) ; [Bendixen et al., 2014](#)). Les paramètres de la phase mobile pouvant impacter la séparation sont nombreux, citons entre autres le pH ([Dubascoux et al., 2008](#)), la force ionique ([Delay et al., 2011](#)), le type de sel ([Dubascoux et al., 2008](#)) ainsi que la présence de différents tensioactifs ([Bendixen et al., 2014](#); [Omar et al., 2016](#); [Correia et al., 2018](#)). Dans le cas du TiO₂, la nature du sel semble avoir un impact sur le taux de récupération des particules dans le système ([Dubascoux et al., 2008](#)). En effet, l'augmentation de la force ionique diminue l'épaisseur de la double couche électrique ([Figure 26](#)), ce

qui favorise les interactions entre la membrane et les particules (Dubascoux et al., 2008). L'ajout d'un tensioactif tel que le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) peut permettre d'augmenter les répulsions électrostatiques en fournissant une charge de surface négative de la particule, ce qui permet d'avoir une dispersion plus stable (Dubascoux et al., 2008 ; López-heras et al., 2014 ; Correia et al., 2018). Néanmoins, dans l'étude de Bendixen et al. (2014), l'hexametaphosphate de sodium est préféré au SDS car il permet d'obtenir des potentiels zêta des NPs et de la membrane négatifs (< -30 mV), augmentant le taux de récupération des NPs. Par conséquent, dans cette étude, les paramètres liés à la nature de l'éluant seront étudiés pour l'analyse des NPs de TiO_2 par AF4-ICP-MS.

II.8.6 Couplage avec un détecteur de diffusion de la lumière multi angles

Le système AF4, peut être couplé avec un détecteur de diffusion de la lumière multi angles (MALS). Ce type de détecteur repose sur le même principe que la DLS mais permet d'être plus résolu puisqu'il possède plusieurs détecteurs disposés à différents angles de l'échantillon (Figure 33).

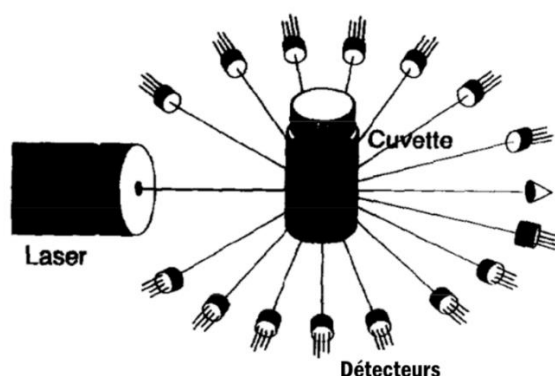


Figure 33 : Représentation d'un détecteur MALS (adapté de Zimm, 1948)

L'avantage d'avoir une mesure de la diffusion de la lumière sur plusieurs angles est que cela permet de s'affranchir de la dépendance angulaire que l'on peut retrouver en DLS (Annexe A, Figure A4). En utilisant des modèles qui corrélient l'intensité de la lumière diffusée et l'angle à laquelle elle est mesurée, le rayon de giration peut être mesuré (Zimm, 1948 ; Wyatt, 1993). Le rayon de giration peut être considéré comme le rayon de la particule moyen, dépendant de la distribution en masse interne de la particule. Il est différent du rayon hydrodynamique qui lui dépend de la géométrie externe de la particule (Wyatt, 1993). Dans ces travaux, un MALS Dawn Heleos II (Wyatt Technology, Goleta, USA) est couplé à l'AF4 et permet de mesurer la taille des particules.

II.8.7 Détermination du potentiel zêta des membranes

Etant donné que les interactions particule-membrane jouent un rôle dans la séparation des NPs par AF4, il est alors important de mesurer le potentiel zêta des membranes utilisées en AF4. Ce potentiel peut être déterminé par la mesure du potentiel d'écoulement ou du courant d'écoulement avec des analyseurs électrocinétiques ([Figure 34](#)) dont le principe est détaillé en [Annexe A](#).

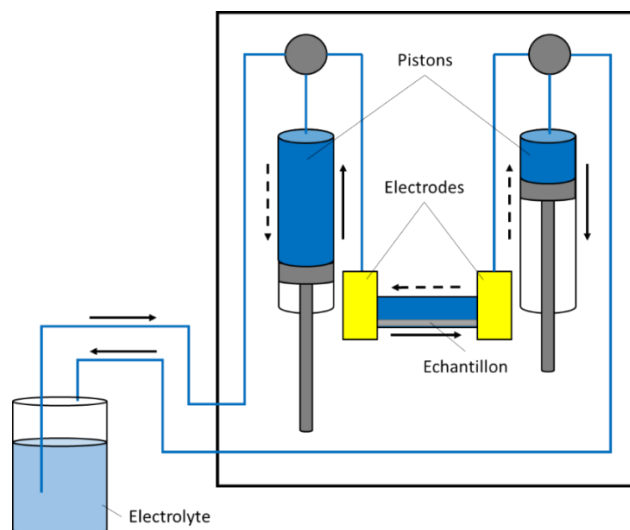


Figure 34 : Schéma d'un analyseur électrocinétique utilisé pour mesurer le potentiel zêta d'un échantillon solide

L'échantillon est placé dans une cellule adaptée selon la forme de l'échantillon (grain, membrane, plaque...). Un système de pistons permet de créer un flux tangential de l'électrolyte par rapport à l'échantillon. Il est possible de diriger le flux d'électrolyte dans les deux sens pour obtenir une valeur plus précise du potentiel zêta. En effet, une asymétrie au niveau de la surface peut entraîner une erreur systématique dans un sens d'écoulement. C'est pourquoi diriger le flux dans les deux sens permet de réduire les biais. Deux électrodes sont placées aux extrémités de la cellule pour mesurer le potentiel et le courant d'écoulement qui sont générés grâce au déplacement des charges à la surface de l'échantillon. Dans le cadre de ces travaux, un analyseur électrocinétique SurPASS (Anton Paar GmbH, Vienne, Autriche) a été utilisé pour mesurer le potentiel zêta des membranes AF4.

II.9 Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode « Single particle » (Sp-ICP-MS)

L'approche « single particle » a été proposée pour la première fois dans les années 2000 ([Degueldre and Favarger, 2003, 2004](#) ; [Degueldre et al., 2004, 2006](#)) et la théorie a été améliorée dans des publications plus récentes ([Laborda et al., 2011](#) ; [Pace et al., 2011](#)).

Le principe de la méthode utilise la grande sensibilité de l'ICP-MS avec une résolution temporelle très élevée. En effet, lorsqu'un échantillon est introduit dans l'ICP-MS, celui-ci est atomisé puis ionisé. Dans le cas d'une particule, lors de son passage dans le plasma, celle-ci va produire un nuage d'ions de l'élément qui la compose ([Figure 35](#)).

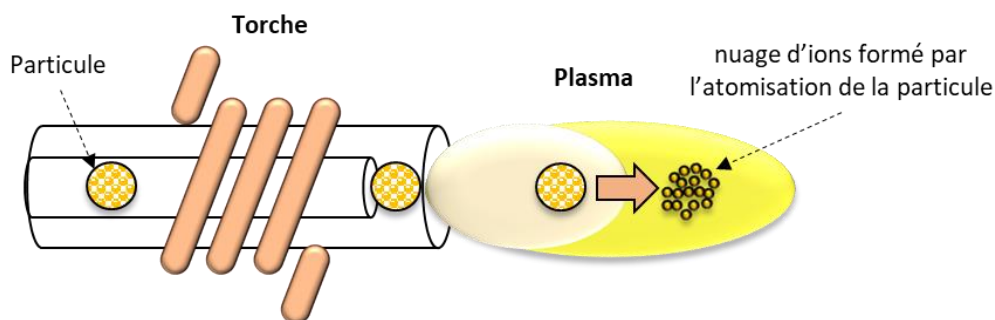


Figure 35 : Atomisation et ionisation d'une particule dans le plasma

Lorsque ce nuage d'ions arrive au détecteur, sa densité ionique élevée fait que le signal obtenu est plus intense qu'un signal provenant d'un analyte ionique. C'est pourquoi la méthode Sp-ICP-MS s'appuie sur une résolution temporelle élevée afin de pouvoir distinguer des signaux issus des éléments sous formes particulaire et ionique ([Figure 36](#)).

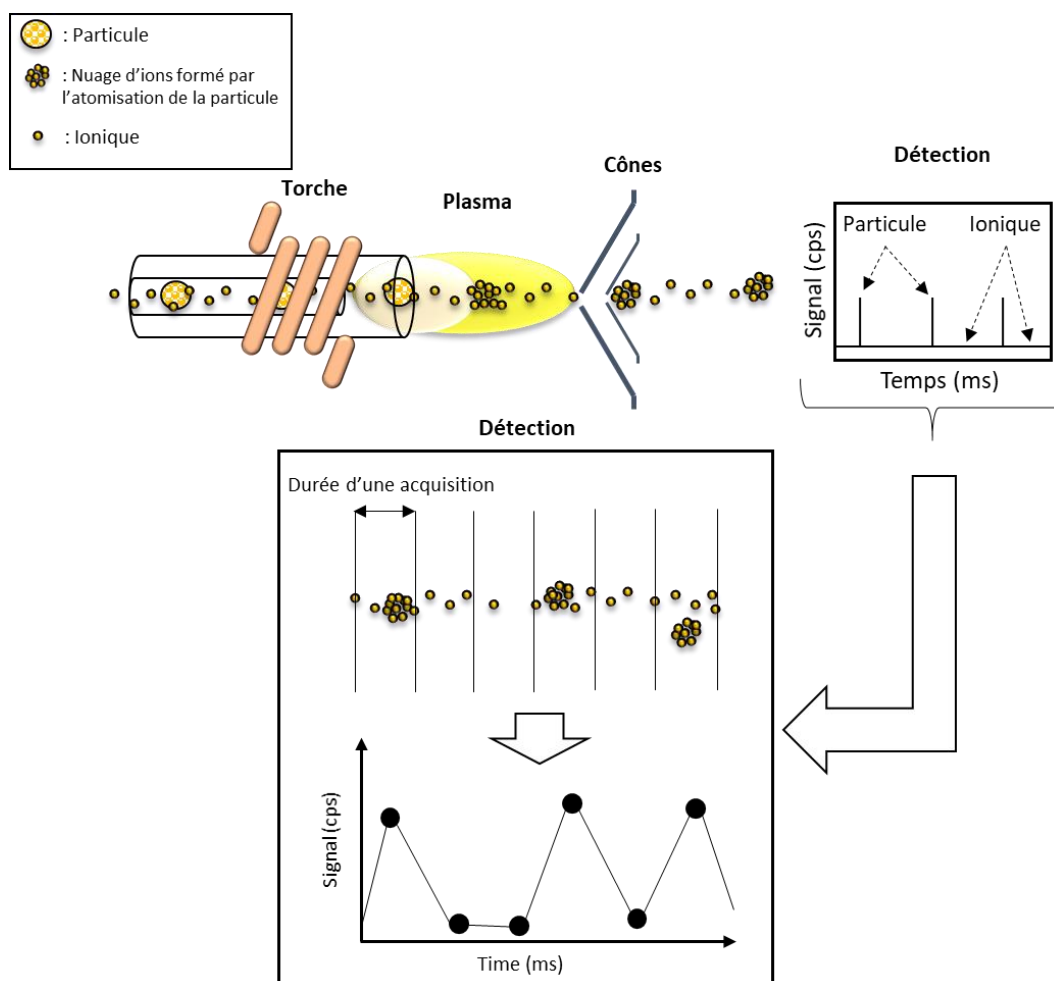


Figure 36 : Schéma du principe de la méthode Sp-ICP-MS

La succession d'acquisitions très rapides permet de distinguer les particules de façon unitaire avec des signaux très intenses, tout en s'affranchissant des signaux beaucoup plus faibles liés à la fraction ionique. Afin de pouvoir déterminer la taille des particules à partir des signaux obtenus, plusieurs étapes sont nécessaires en Sp-ICP-MS, à savoir :

- (i) Mesure de l'Efficacité de Transport (TE). C'est l'un des paramètres les plus critiques de cette méthode. Les équations de conversion signal-diamètre dépendent de ce paramètre et il est aussi utilisé pour calculer la concentration particulaire.
- (ii) Réalisation d'un étalonnage à partir de l'élément ciblé en utilisant une solution étalon dont l'analyte est sous forme ionique. Dans le cas des NPs de TiO_2 , l'étalonnage est effectué avec du Ti ionique.
- (iii) Dilution des échantillons à analyser. Cette étape est nécessaire afin d'éviter l'analyse simultanée de plusieurs particules qui induirait un biais sur la distribution en taille.

(iv) Traitement des données de l'échantillon. Cette étape peut se faire automatiquement selon le type d'appareil et des logiciels fournis mais il est aussi possible de traiter les échantillons en développant des feuilles de calculs adaptées.

II.9.1 Détermination de l'efficacité de transport (TE)

Le TE est l'un des paramètres les plus cruciaux pour l'analyse des NPs par la méthode Sp-ICP-MS. Il permet de déterminer la fraction de particules prélevées qui atteindront réellement le plasma. De plus, le TE est aussi utilisé pour convertir les signaux des particules en masse à partir de l'étalonnage. Dans l'étude de [Pace et al. \(2011\)](#), trois méthodes sont présentées pour le calculer, à savoir : la méthode gravimétrique, la méthode basée sur la masse des particules et la méthode basée sur la concentration des particules. Ces méthodes vont être détaillées dans les parties suivantes et sont résumées dans la Figure 37.

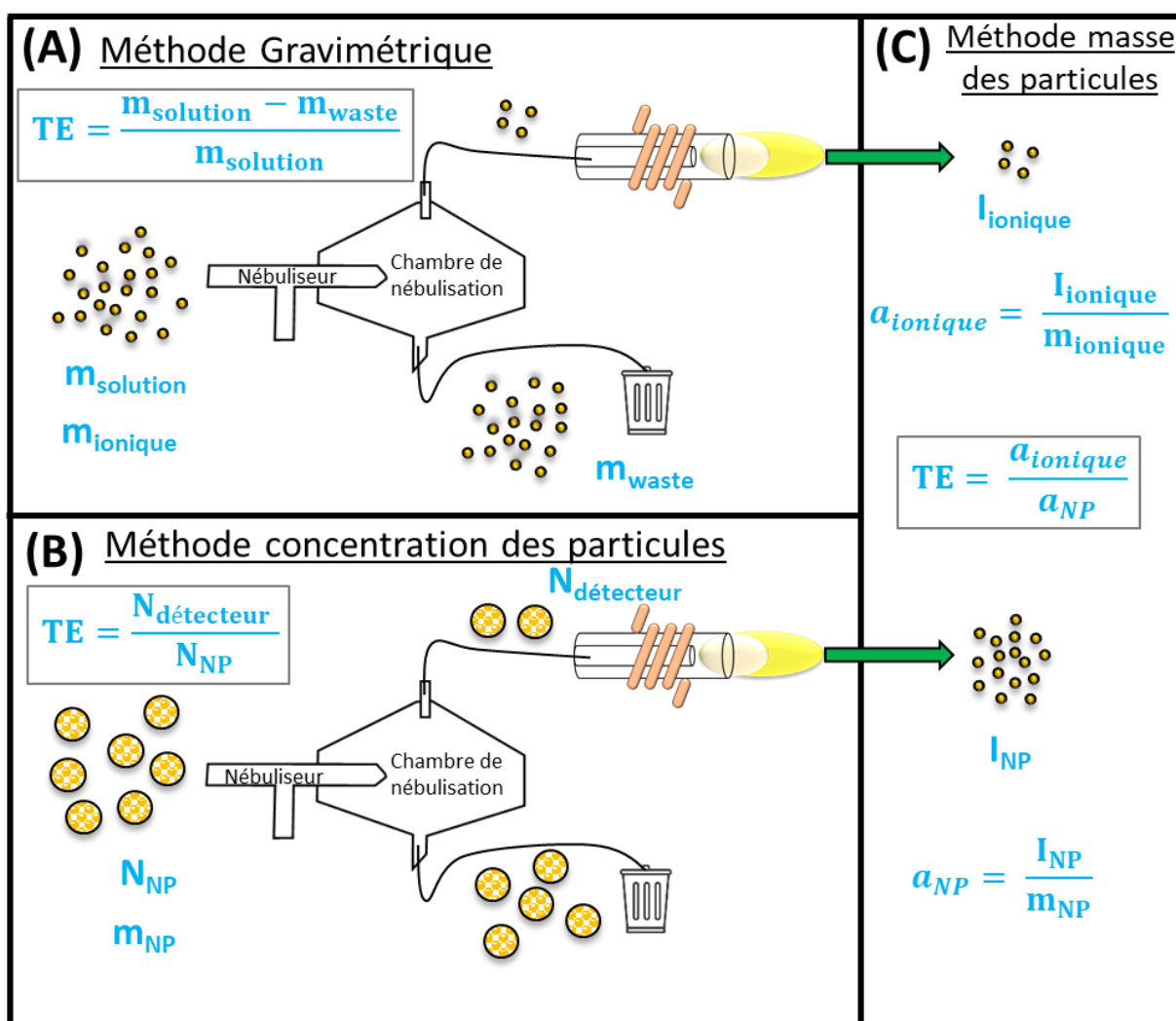


Figure 37 : Schéma des différentes méthodes pour déterminer l'efficacité de transport (TE)

II.9.1.1 Méthode gravimétrique

Cette méthode est la plus ancienne et a été mise en place par [Gustavsson \(1984\)](#). C'est une mesure indirecte qui consiste à peser un volume connu d'une solution qui sera envoyé dans le système d'introduction de l'ICP-MS. La fraction récupérée dans la poubelle, c'est à dire qui n'a pas été introduite dans le plasma au niveau de la chambre de nébulisation, est récoltée et pesée ([Figure 37A](#)). Ainsi, l'efficacité de transport peut être déterminée à partir de l'[Équation 2](#) :

Équation 2

$$TE = \frac{m_{std} - m_{waste}}{m_{std}}$$

avec :

m_{std} : masse initiale de la solution (g)

m_{waste} : masse récupérée en sortie de la chambre de nébulisation dans la poubelle (g)

Cette équation permet de mesurer le TE sans connaître le débit de prélèvement de l'échantillon. Selon [Pace et al. \(2011\)](#), elle est la moins précise des trois méthodes et surestime le TE, ce qui conduit à une sous-estimation de la concentration en particules. C'est pourquoi [Pace et al. \(2011\)](#) recommandent d'utiliser une des deux autres méthodes proposées.

II.9.1.2 Méthode basée sur la masse des particules

L'approche directe basée sur la masse des particules est comparable à celle employée dans les travaux de [Smith and Browner \(1982\)](#). [Pace et al. \(2011\)](#) proposent dans leur étude une nouvelle façon de calculer le TE, plus simple, ne nécessitant pas d'éteindre le plasma ni d'ajouter une collecte après la chambre de nébulisation. Cette méthode repose sur l'hypothèse que l'intensité mesurée pour un temps d'acquisition donné correspond à une seule particule. De plus, il est considéré que l'élément en question s'ionise de la même façon dans le plasma, qu'il soit d'origine ionique ou particulaire.

Pour la détermination du TE, il faut utiliser une suspension monodisperse de NPs. Le but étant d'obtenir un étalonnage basé sur l'intensité produite par une particule en fonction de sa masse. Il existe actuellement plusieurs Matériaux de Référence (MR), composés d'une population de NPs monodisperses en taille, permettant de déterminer le TE (voir [Tableau 7](#)). Si la masse de la particule n'est pas référencée, elle peut être déterminée en connaissant le diamètre et la masse volumique de la particule. En admettant que la particule soit de forme sphérique, la masse peut alors être estimée suivant l'[Équation 3](#).

Équation 3

$$m_{NP} = \frac{\pi d^3}{6} \rho$$

avec :

m_{NP} : masse de la particule (g)

d : diamètre de la particule (cm)

ρ : masse volumique de la particule (g/cm³)

Suite à l'analyse de cette suspension de NPs monodisperses, l'intensité moyenne est assimilée à la masse calculée de la particule. Plusieurs suspensions de différentes tailles peuvent être utilisées (de la Calle et al., 2017) pour construire une droite d'étalonnage avec plus de points, mais certaines études n'utilisent qu'un seul matériau de référence (Pace et al., 2011 ; Addo Ntim et al., 2018 ; Mackevica et al., 2018). Dans ce dernier cas, il est nécessaire d'analyser un blanc, qui est considéré comme ayant une masse nulle, pour pouvoir faire la droite d'étalonnage. La pente de la droite obtenue (sensibilité) est alors notée a_{NP} . Dans un même temps, un étalonnage doit être effectué à partir du même élément mais sous forme ionique. Puisqu'il faut obtenir une corrélation entre la masse et l'intensité mesurée (comme pour les particules), la concentration des solutions doit être convertie en masse. Pour cela, le débit d'introduction et le temps d'acquisition sont nécessaires au calcul (Équation 4). La Figure 37 et la Figure 38 permettent de comprendre comment est calculé le TE avec cette méthode.

Équation 4

$$m_{ionique} = \frac{[ionique] \times Q}{Dt}$$

avec :

$m_{ionique}$: masse d'analyte détectée (µg)

[ionique] : concentration massique des ions dans la solution analysée (µg/L)

Q : débit d'introduction de l'échantillon (L/s)

Dt : temps d'acquisition (s)

La nouvelle droite d'étalonnage peut être obtenue et sa pente est notée $a_{ionique}$. Le TE est alors calculé en faisant le rapport des deux pentes d'étalonnage (Équation 5).

$$TE = \frac{a_{ionique}}{a_{NP}}$$

avec :

$a_{ionique}$: pente de la droite d'étalonnage liée à l'élément ionique (cps/($\mu\text{g/L}$))

a_{NP} : pente de la droite d'étalonnage liée à l'élément particulaire (cps/($\mu\text{g/L}$))

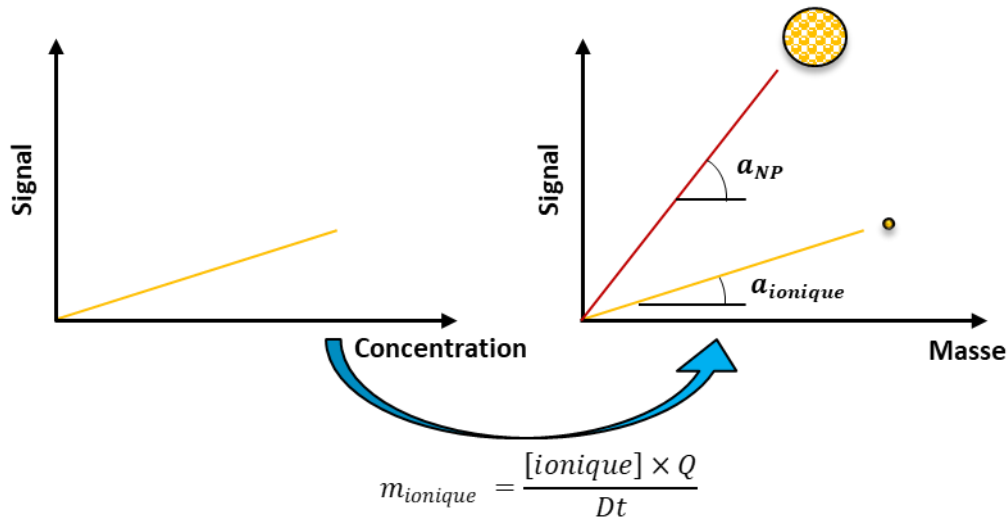


Figure 38 : Représentation complémentaire de la méthode de calcul du TE basée sur la masse des particules

En effet, lorsqu'une particule atteint le plasma, le nuage d'ions qu'elle génère après avoir été atomisée représente la totalité de sa masse. Concernant les espèces ioniques entrant dans le système d'introduction, une partie n'atteindra pas le plasma lors de la nébulisation. Le TE peut alors être déterminé en comparant l'étalonnage ionique avec l'étalonnage particulaire. Cette méthode n'est valable que si l'efficacité d'ionisation est de 100%, ce qui est généralement admis notamment pour le titane.

II.9.1.3 Méthode basée sur la concentration des particules

Cette méthode présente l'avantage de nécessiter moins d'étapes d'étalonnage par rapport à la précédente. Comme pour la méthode basée sur la masse des particules, c'est une méthode directe. Dans ce cas, il est nécessaire de connaître la concentration en particules du matériau de référence. Il suffit alors de mesurer le nombre de particules détectées et de le comparer avec le nombre théorique de particules qu'il aurait fallu détecter (Équation 6).

$$TE = \frac{N_{\text{détecteur}}}{Q \times [\text{Part.}]}$$

avec :

$N_{\text{détecteur}}$: nombre de particules détectées/s

Q : débit d'introduction (mL/s).

$[\text{Part.}]$: nombre de particules/mL dans la suspension

Dans l'équation du TE de la [Figure 37B](#), le dénominateur représente le nombre théorique de particules détectées (N_{NP}) qui est égal au débit multiplié par la concentration en particule du MR.

Cette méthode semble donner des résultats de TE équivalents ([Pace et al. 2011](#)). Le [Tableau 7](#) présente les principaux matériaux de référence qui ont été utilisés pour déterminer le TE.

Tableau 7 : Synthèse des matériaux de référence utilisés pour calculer le TE

Elément	MR	Diamètre (nm)	Référence
Au	BBI Solutions	60/100	Lee et al., 2014 Montaño et al., 2014 Yang et al., 2016
	NanoComposix	50/80/100	Dan et al., 2015 Keller et al., 2018 Cervantes-Avilés et al., 2019
	NIST - RM 8012	30	Kutscher et al., 2016 Vidmar et al., 2017 Candás-Zapico et al., 2018
	NIST-RM 8013	60	Pace et al., 2011 Hineman and Stephan, 2014 Peters et al., 2015 Huynh et al., 2016 Nunez et al., 2016 Deng et al., 2017 Venkatesan et al., 2018b Witzler et al., 2018
	Perkin Elmer	30/50/60/100	de la Calle et al., 2017 Mackevica et al., 2018
Ag	NanoComposix	100	Mitrano et al., 2012

Dans la majorité des cas, le matériau utilisé est une suspension de NPs d'or. Mais il est possible d'utiliser des NPs d'argent comme dans l'étude de [Mitrano et al. \(2012\)](#). Dans le cas des NPs de TiO_2 , il n'existe pas de matériau monodisperse permettant de mesurer correctement le TE.

II.9.2 Etalonnage à partir d'étalons sous forme ionique

L'étape d'étalonnage est nécessaire pour pouvoir convertir les signaux des particules en diamètre. En raison de l'absence ou de la faible présence de MR sous forme particulaire avec une population monodisperse, les étalonnages de la méthode Sp-ICP-MS nécessitent d'utiliser des étalons sous forme ionique. L'utilisation de ces étalons oblige à tenir compte de paramètres supplémentaires comme le TE, le débit... Ainsi, une gamme d'étalonnage doit être réalisée afin de déterminer la corrélation entre la masse et l'intensité. La masse des étalons est déterminée à l'aide de l'Équation 4. Grâce à cette corrélation, le diamètre des particules peut être déterminé à partir des intensités en utilisant aussi leur masse volumique. Les conversions signaux-diamètres sont détaillées dans le [paragraphe II.9.4.2](#).

II.9.3 Dilution des échantillons

Cette étape est nécessaire afin d'éviter les coïncidences, c'est-à-dire la détection simultanée de deux particules dans une même acquisition. En effet, lors du traitement des résultats, le signal résultant de plusieurs particules sera considéré comme une particule de taille plus élevée que les particules réellement présentes dans l'échantillon. Pour cela, la concentration particulaire de l'échantillon analysé doit être optimisée car si les particules sont trop nombreuses, cela augmentera la probabilité de mesurer des coïncidences. A l'inverse, si la concentration en particules est trop faible, ces dernières ne seront pas détectées en assez grand nombre et les statistiques pour établir une distribution représentative seront insuffisantes. L'impact de la concentration en particules sur les signaux détectés est schématisé dans la [Figure 39](#).

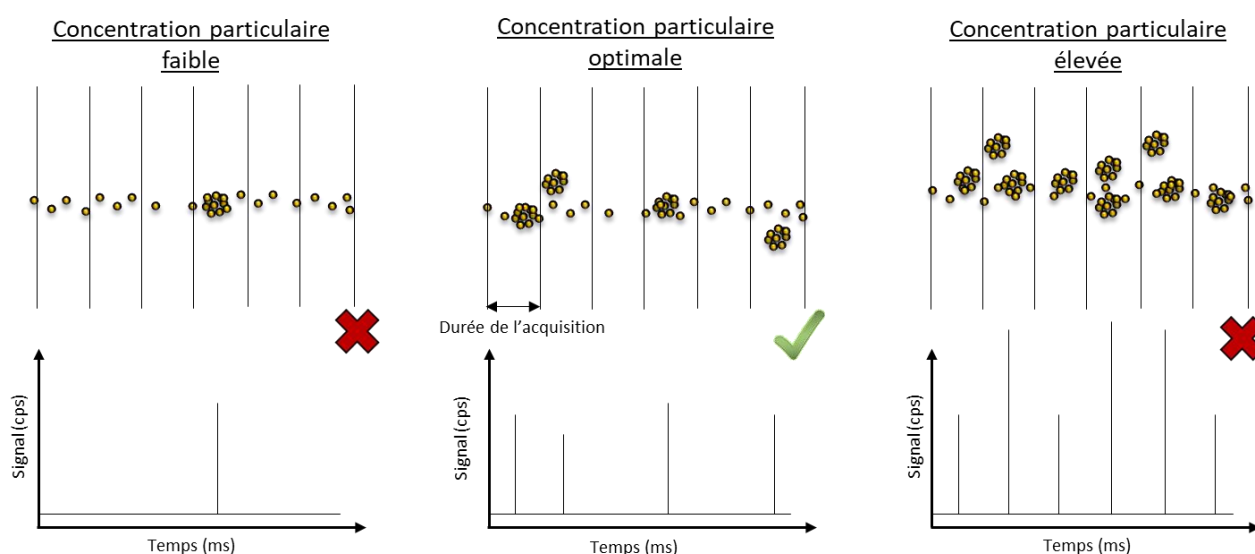


Figure 39 : Schéma de l'impact de la concentration en particules sur le signal obtenu

Dans le cas des analyses avec un temps d'acquisition en Sp-ICP-MS de 10 ms, il est recommandé d'avoir entre 5 et 10% de signaux provenant de particules par rapport au total de signaux acquis pendant l'analyse, afin que la probabilité d'avoir des coïncidences soit négligeable ([Montaño et al., 2014](#) ; [Huynh et al., 2016](#)).

II.9.4 Traitement des données

Le traitement de données d'acquisition est actuellement l'un des plus gros défis de la méthode Sp-ICP-MS. Bien que la publication de [Pace et al. \(2011\)](#) ait permis d'accroître l'intérêt pour cette méthode, il est nécessaire d'approfondir et d'améliorer certains points comme le calcul du seuil bruit de fond-particule ou encore la détermination du TE. L'évolution du traitement de données en Sp-ICP-MS est détaillée au [paragraphe Error! Reference source not found.](#).

II.9.4.1 Détermination du seuil bruit de fond – particule

Lors d'une analyse en mode Sp-ICP-MS, le premier paramètre à déterminer est le seuil bruit de fond-particule. Ce paramètre correspond à la valeur d'intensité limite pour laquelle le signal est considéré comme issu d'une particule. Le seuil bruit de fond-particule permet donc de discriminer le bruit de fond des signaux provenant de particules. Il est déterminé en utilisant une méthode itérative. Tous les signaux supérieurs à 3 fois l'Ecart Type (3xET) de la moyenne de l'ensemble des données brutes sont considérés comme provenant de particules et exclus des données. Les données restantes sont à nouveau moyennées et l'opération est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de valeur exclue au-delà de 3xET de la moyenne finale. La valeur de 3xET est nominale et est communément utilisée pour le calcul de la Limite de Détection en taille (LDt). C'est la valeur qu'utilise l'équipe de [Pace et al. \(2011\)](#). Dans une étude de [Tuoriniemi et al. \(2012\)](#), le calcul du seuil bruit de fond-particule se fait avec 3, 5 ou 8 fois l'écart-type (3xET, 5xET et 8xET). Il est observé que l'application de 8xET est plus pertinente et permet d'éliminer des signaux de bruit de fond qui pouvaient être considérés comme provenant de particules. Le calcul du seuil bruit de fond-particule n'est pas souvent détaillé dans les différentes publications mais la plupart des articles font référence à [Pace et al. \(2011\)](#) et semblent par conséquent utiliser 3xET.

Récemment, une autre approche a été proposée par plusieurs études qui ont modélisé le bruit de fond obtenu à l'aide de modèles statistiques. Ce bruit de fond modélisé est ensuite soustrait aux données brutes de l'analyse Sp-ICP-MS, permettant ainsi de récupérer uniquement les signaux provenant des particules ([Bolea-Fernandez et al., 2017](#) ; [Gundlach-Graham et al., 2018](#)). Cette méthode n'utilise donc

pas de valeur de seuil bruit de fond-particule mais nécessite d'être améliorée quant à son automatisation pour des analyses de routine.

II.9.4.2 Détermination du diamètre des NPs à partir des données brutes

L'analyse d'un échantillon contenant des NPs fournit un fractogramme contenant de nombreux pics liés aux particules, comme représenté sur la [Figure 40A](#).

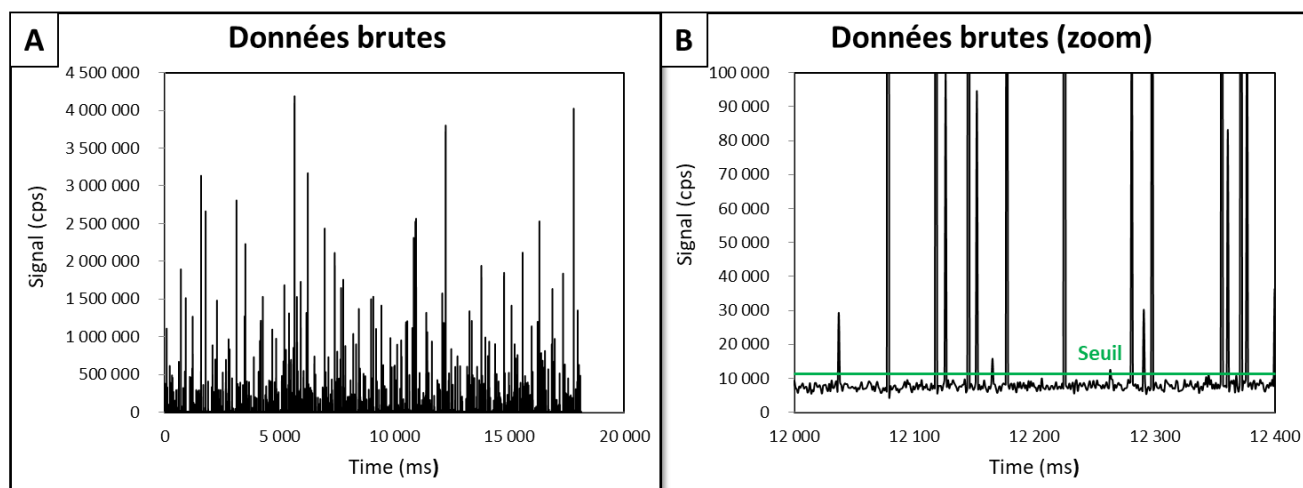


Figure 40 : Exemple de signal classique obtenu par Sp-ICP-MS (A) ainsi que son échelle agrandie avec la représentation graphique du seuil bruit de fond-particule (B)

La [Figure 40B](#), qui est un agrandissement de la [Figure 40A](#), permet de bien visualiser les signaux liés aux particules qui se traduisent par de fortes intensités. Elle permet aussi de représenter graphiquement la valeur du seuil bruit de fond-particule qui va aider à éliminer tous les signaux de faibles intensités considérés comme du bruit de fond. Les signaux restants attribués aux particules sont ensuite classés en fonction de leur fréquence, comme le montre la [Figure 41](#).

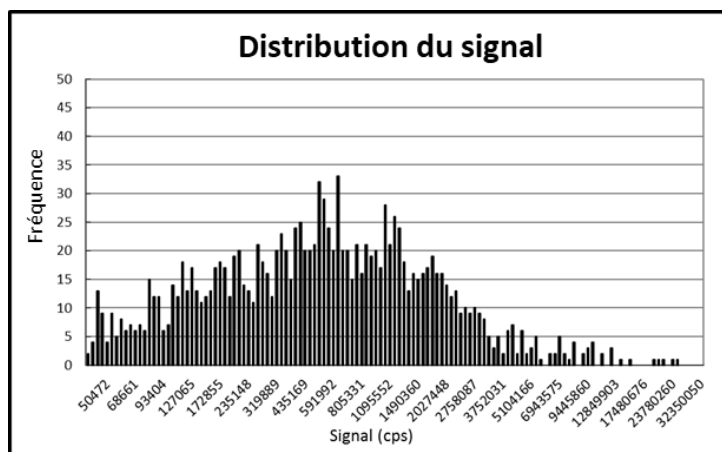


Figure 41 : Exemple de distribution des signaux ICP-MS en fonction de leur fréquence

L'étape de l'étalonnage décrite précédemment ([paragraphe II.9.2](#)), utilise l'élément d'intérêt sous forme ionique ce qui permet de déterminer la sensibilité du détecteur lié à cet élément. Par exemple, pour les particules de TiO_2 , c'est le titane sous forme ionique qui servira d'étalon. Cette sensibilité permet ainsi de calculer la masse d'une particule à partir de l'intensité de son signal en utilisant l'[Équation 7](#).

Équation 7

$$m_{NP} = \left[\frac{(I_{part.} - I_{bdf}) \times IE \times TE}{\left(\frac{a \times 60}{Dt \times Q \times 1000} \right)} \right] f_{part.}$$

avec :

m_{NP} : masse de la particule (fg)

$I_{part.}$: intensité de l'impulsion (cps)

I_{bdf} : intensité moyenne du bruit de fond (cps)

IE : efficacité d'ionisation

TE : efficacité de transport

a : sensibilité (cps/($\mu\text{g/L}$))

Dt : temps acquisition (Dwell time) (ms)

Q : débit (mL/min)

$f_{part.}$: fraction massique de l'élément dans la particule

Le numérateur de l'[Équation 7](#) représente le signal de la particule (en cps) corrigé par le bruit de fond et les efficacités d'ionisation et de transport. Par ailleurs, l'efficacité d'ionisation est toujours

considérée égale à 100% dans les études, bien qu'elle ne soit pas vérifiée. Le dénominateur correspond à la pente de la droite d'étalonnage convertie en cps/fg.

A partir de la masse de la particule obtenue selon l'Équation 7, son diamètre peut être déterminé en admettant que la particule est de forme sphérique, en utilisant l'Équation 8.

Équation 8

$$d = \sqrt[3]{\frac{6 \times m_{NP}}{\rho \times \pi}}$$

Cette équation est l'équivalent de l'Équation 3 remaniée et utilise la masse volumique (ρ) de la particule qui nécessite d'être connue.

Une fois le diamètre calculé pour tous les signaux des particules, une distribution des diamètres en fonction de leur fréquence peut être établie, comme le montre la Figure 42.

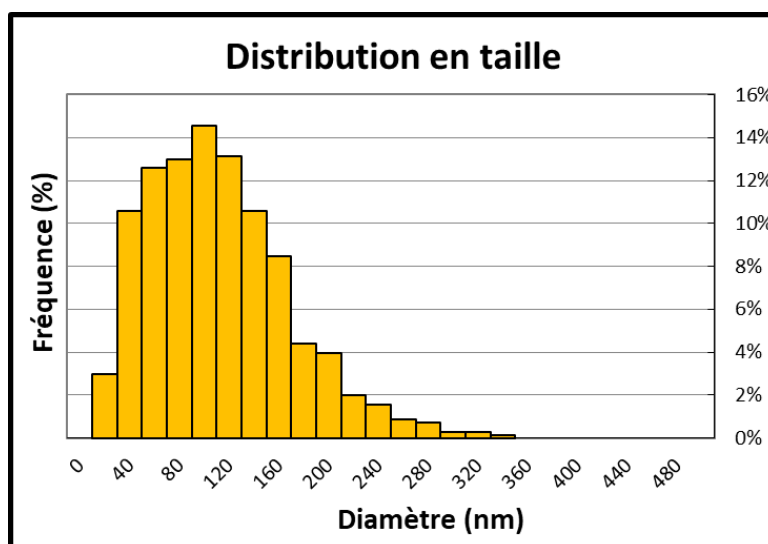


Figure 42 : Exemple d'une distribution en taille obtenue par Sp-ICP-MS

Ce type de résultat est appelé plus communément « distribution en taille » et permet ainsi d'évaluer les différents diamètres observés (abscisse) en fonction de leur récurrence (ordonnée). C'est un paramètre important susceptible d'être utilisé au niveau législatif et pour les études d'évaluation des risques.

II.9.4.3 Limite de détection en taille

La Limite de Détection en taille (LDt) représente le plus petit diamètre de particule pouvant être détecté par la méthode Sp-ICP-MS. Son calcul dépend du seuil bruit de fond-particule déterminé au préalable (c.f. [paragraphe II.9.4.1](#)). Le seuil bruit de fond-particule étant la limite d'intensité pour qu'une particule soit détectée, il représente alors la limite de détection. Il faut le convertir en masse puis en taille en utilisant respectivement l'[Équation 7](#) et l'[Équation 8](#). Cette LDt varie suivant le type d'échantillon puisque le bruit de fond dépend de la matrice. En effet, si l'échantillon contient l'analyte d'intérêt sous forme particulaire et ionique, le bruit de fond peut être fortement augmenté par la présence de la forme ionique. L'utilisation des temps d'acquisition (Dt) plus faibles ($< 3\text{ms}$) permet toutefois de minimiser le bruit de fond ([Figure 43](#)). En effet lorsque le Dt est diminué, la fraction ionique détectée dans ce laps est aussi diminuée, ce qui abaisse le bruit de fond et permet de détecter plus de particules.

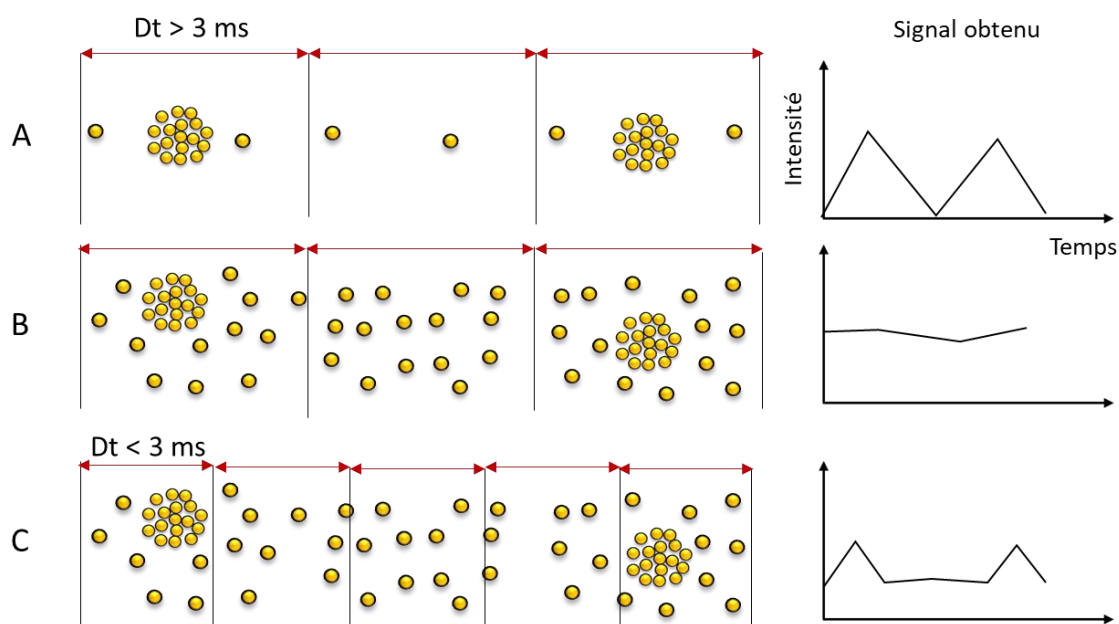


Figure 43 : Analyses Sp-ICP-MS (A) d'un échantillon contenant peu d'analyte sous forme ionique avec un Dt élevé, (B) d'un échantillon contenant une concentration élevée d'analyte ionique avec un Dt élevé et (C) d'un échantillon contenant une concentration élevée d'analyte ionique avec un Dt faible

II.10 Bilan

Ce chapitre a présenté les différentes méthodes de caractérisation des NPs de TiO_2 utilisées dans ces travaux. Ces différentes techniques sont complémentaires et permettent d'obtenir différentes informations telles que la masse volumique, la surface spécifique, la taille ou encore le potentiel zêta des NPs. La [Figure 44](#) résume les différentes techniques qui ont été présentées ainsi que les paramètres de caractérisation qu'elles peuvent fournir.

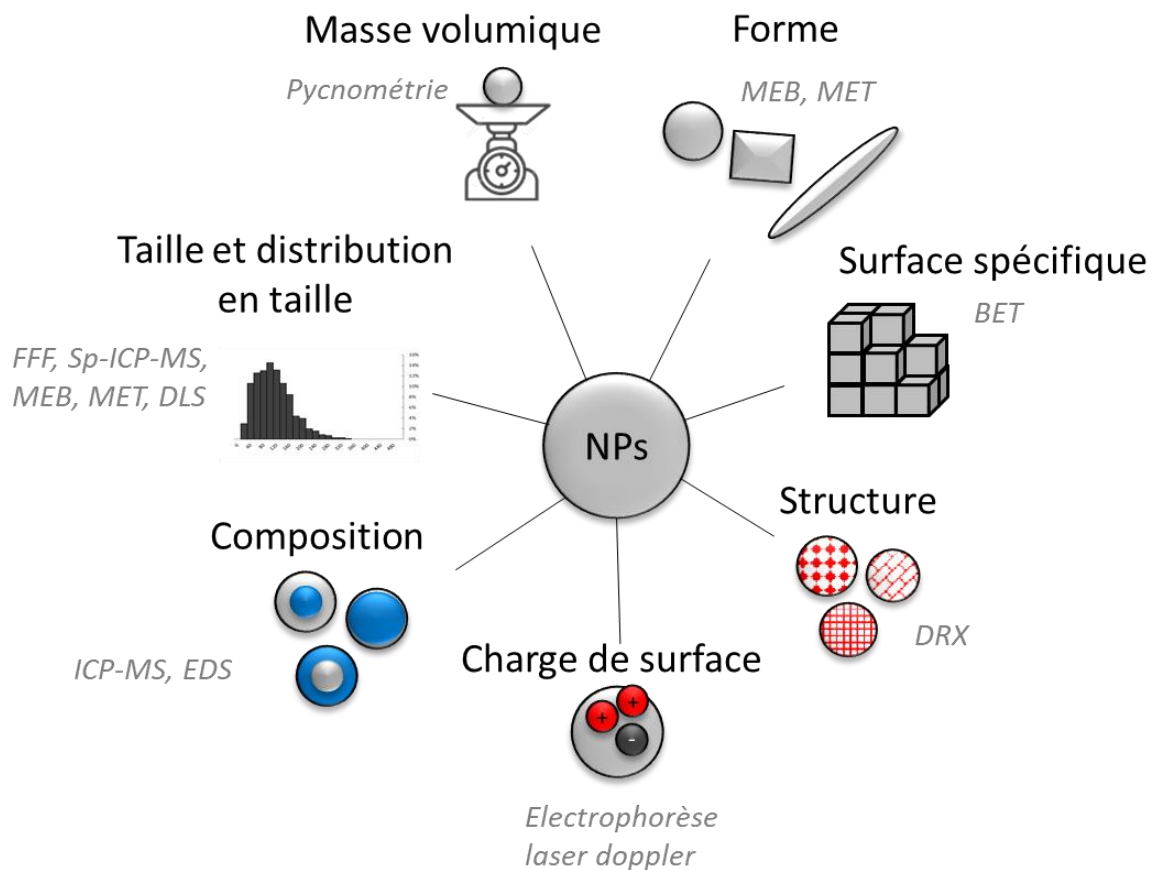


Figure 44 : Synthèse des méthodes de caractérisation des NPs utilisées et des paramètres évalués

En ce qui concerne la caractérisation de NPs de TiO_2 dans les aliments, la microscopie électronique est la méthode la plus utilisée ([paragraphe I.3.2.1](#)). L'objectif étant de développer les méthodes AF4-ICP-MS et Sp-ICP-MS comme alternative ou complément à la microscopie électronique ; ces méthodes seront donc étudiées dans les chapitres suivants.

Chapitre III :

Développement de la méthode AF4-ICP-MS pour la caractérisation des NPs de TiO₂

III.1 Sommaire

Chapitre III : Développement de la méthode AF4-ICP-MS pour la caractérisation des NPs de TiO₂

Error! Bookmark not defined.

III.1 Sommaire**Error! Bookmark not defined.**

III.2 Caractérisation de NM-102**Error! Bookmark not defined.**

III.3 Evaluation du potentiel zêta des NPs de TiO₂ du NM-102 et des membranes AF4.....**Error!**

Bookmark not defined.

III.3.1 Réactifs**Error! Bookmark not defined.**

III.3.2 Détermination expérimentale des Concentrations Micellaires Critiques (CMC) des tensioactifs**Error! Bookmark not defined.**

III.3.3 Détermination du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique des NPs de TiO₂ du NM-102.....**Error! Bookmark not defined.**

III.3.4 Détermination du potentiel zêta des membranes AF4**Error! Bookmark not defined.**

III.3.5 Choix des conditions d'éluant pour l'analyse AF4-ICP-MS**Error! Bookmark not defined.**

III.4 Analyses des NPs de TiO₂ du NM-102 par AF4-ICP-MS**Error! Bookmark not defined.**

III.4.1 Méthode.....**Error! Bookmark not defined.**

III.4.2 Résultats**Error! Bookmark not defined.**

III.5 Bilan**Error! Bookmark not defined.**

Dans ce chapitre, la méthode AF4-ICP-MS sera étudiée afin de caractériser des NPs de TiO₂. Une première partie présente les travaux menés afin de caractériser des NPs de TiO₂ en utilisant différentes techniques (décrites dans le chapitre précédent). Ces méthodes ont permis de déterminer la taille, la surface spécifique ou encore la structure cristalline des NPs de TiO₂ dans le but d'utiliser ces NPs pour optimiser la méthode AF4-ICP-MS. Afin de mieux comprendre cette technique, la seconde partie porte sur l'étude des interactions électrostatiques présentes entre les particules et la membrane AF4 à travers la mesure de leur potentiel zêta. Cela a pour but d'obtenir des informations supplémentaires pour appréhender l'agglomération des particules ou leur potentielle perte dans le système AF4. Dans la dernière partie, plusieurs conditions d'éluant ont été évaluées directement par des analyses AF4-ICP-MS. Le principal objectif est de déterminer les conditions favorisant la dispersion des NPs de TiO₂

dans leur milieu ainsi que la répulsion électrostatique entre la membrane AF4 et les particules pour minimiser les pertes des NPs dans le système.

III.2 Caractérisation de NM-102

Le dioxyde de titane (TiO_2) utilisé pour cette étude est un nanomatériau de référence (code NM-102, [Rasmussen et al. 2014](#)) caractérisé par le Centre commun de recherche de la Commission européenne (Joint Research Centre, JRC). Le NM-102 présente une structure cristalline *anatase* comme la plupart des additifs alimentaires TiO_2 ([Tableau 5](#)). Il est composé de NPs monodisperses avec un diamètre de 21 ± 10 nm. Le terme « monodisperse » signifie que la taille des particules est similaire, ce qui se traduit par une distribution en taille quasi centrée sur une valeur de diamètre. Cela s'avère très intéressant pour l'optimisation de la méthode AF4-ICP-MS, puisque c'est la fraction nanoparticulaire du TiO_2 présent dans les aliments qui nous intéresse. De plus, le fait que les NPs soient monodisperses permet de mieux évaluer l'agglomération des NPs pendant l'analyse par AF4-ICP-MS. Avant de l'utiliser pour optimiser la méthode AF4-ICP-MS, il a été décidé d'effectuer, à l'aide de différentes techniques dont les protocoles ont été décrits au chapitre précédent ([paragraphe II.2, II.3, II.4, et II.5](#)), nos propres caractérisations du NM-102 et de comparer les résultats à ceux fournis par le JRC.

Résultats de la caractérisation du NM-102

Le spectre DRX obtenu pour déterminer la structure cristalline du NM-102 est présenté dans la [Figure 45](#).

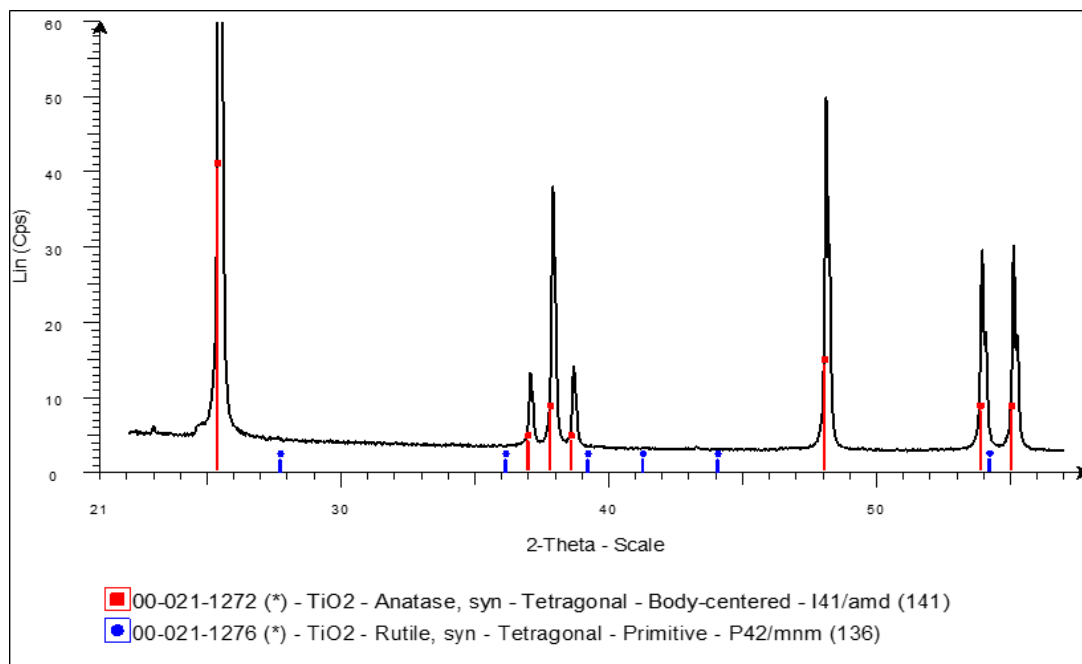


Figure 45 : Diffractogramme de rayon X de la poudre de NM-102 avec les signaux théoriques de la forme cristallographique anatase en rouge et de celle du rutile en bleu.

La courbe noire correspond au diffractogramme de rayon X du NM-102 tandis que les repères rouges et bleus indiquent la position théorique des raies spécifiques des phases cristallines *anatase* et *rutile*, respectivement. Le résultat montre que la structure cristalline du NM-102 est bien exclusivement sous la forme *anatase*, comme décrit par le JRC (Rasmussen et al., 2014).

Concernant la surface spécifique du NM-102, l'isotherme d'adsorption obtenue avec la méthode BET est présentée dans la Figure 46.

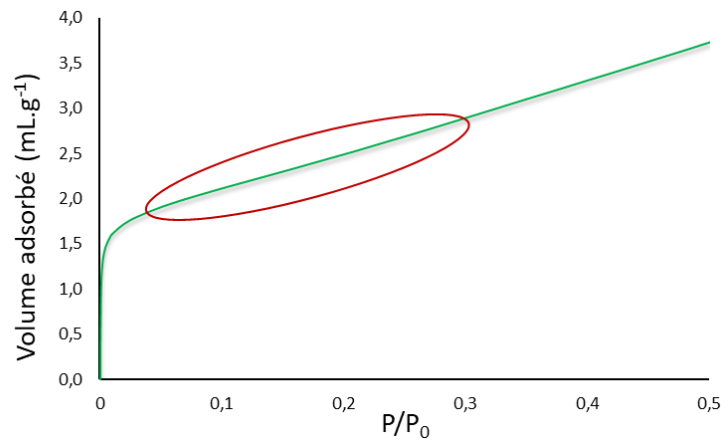


Figure 46 : Isotherme d'adsorption de l'azote sur le NM-102, en rouge la gamme de pression relative (P/P_0) pour calculer la surface spécifique.

Le volume d'azote nécessaire pour couvrir sous forme d'une monocouche la surface du NM-102 peut être déterminé dans la gamme de pression relative (P/P_0) entre 0,05 et 0,3 (Équation A5, paragraphe II.3). La méthode BET a permis d'estimer la surface spécifique du NM-102 égale à $79,1 \pm 0,8 \text{ m}^2/\text{g}$, une valeur équivalente à celle obtenue par Krystek et al. (2014).

La masse volumique du NM-102 a été mesurée à $3,94 \pm 0,23 \text{ g}/\text{cm}^3$ avec la pycnométrie hélium. Cette valeur correspond à la masse volumique de la structure cristalline anatase (McAleer and Peter, 1982) et confirme le résultat déterminé précédemment par diffraction RX.

Grâce à la surface spécifique et à la masse volumique, le diamètre des particules du NM-102 peut être déterminé théoriquement à l'aide de l'Équation 1 de la section II.3. Le diamètre des NPs ainsi calculé est de $19,2 \pm 1,4 \text{ nm}$; ce qui est en accord avec les résultats d'autres études (Jensen et al., 2013 ; Rasmussen et al., 2014).

La Figure 47 présente les clichés des NPs du NM-102 obtenus par Microscopie Electronique en Transmission (MET) ainsi que les images d'analyses chimiques (O, Ti et Si) obtenues par EDX.

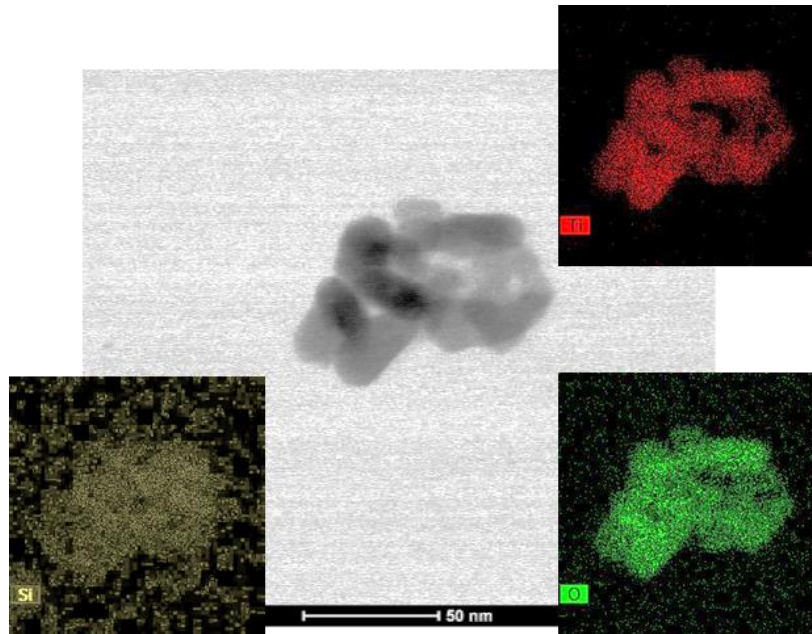


Figure 47 : Image obtenue à l'aide d'un MET en mode STEM et cartographies EDS des NPs de NM-102

Les diamètres des NPs observées sont de 21 ± 6 nm ce qui est cohérent avec le diamètre théorique calculé précédemment et aux valeurs obtenues par microscopie électronique retrouvées dans la littérature en tenant compte des écart-types (Jensen et al., 2013 ; Rasmussen et al., 2014). Ces données ont été obtenues par la mesure du diamètre de Féret d'une quarantaine de particules (Figure 48), ce qui est nettement insuffisant pour utiliser cette valeur comme référence mais permet cependant de confirmer la valeur obtenue lors d'autres études.

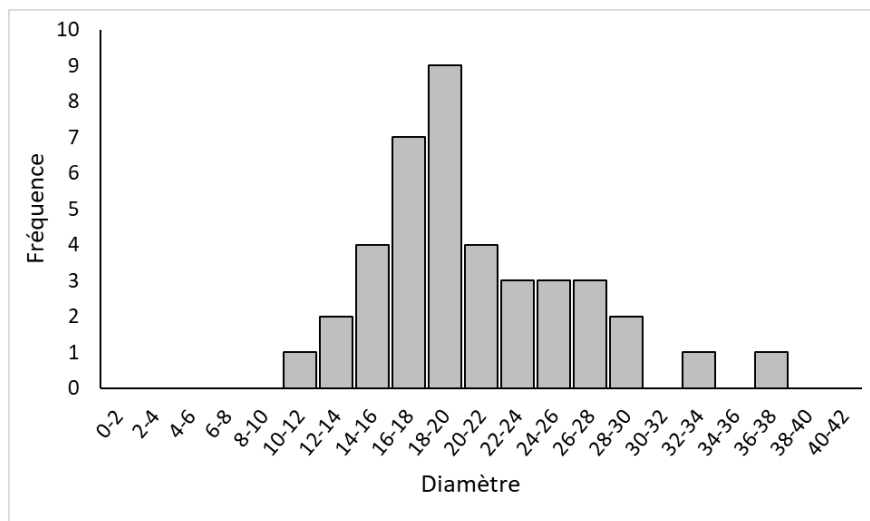


Figure 48 : Distribution en taille du NM-102 obtenue à partir de 45 particules

L'analyse EDS a permis d'évaluer la composition chimique des particules et les résultats sont présentés dans la [Figure 49](#).

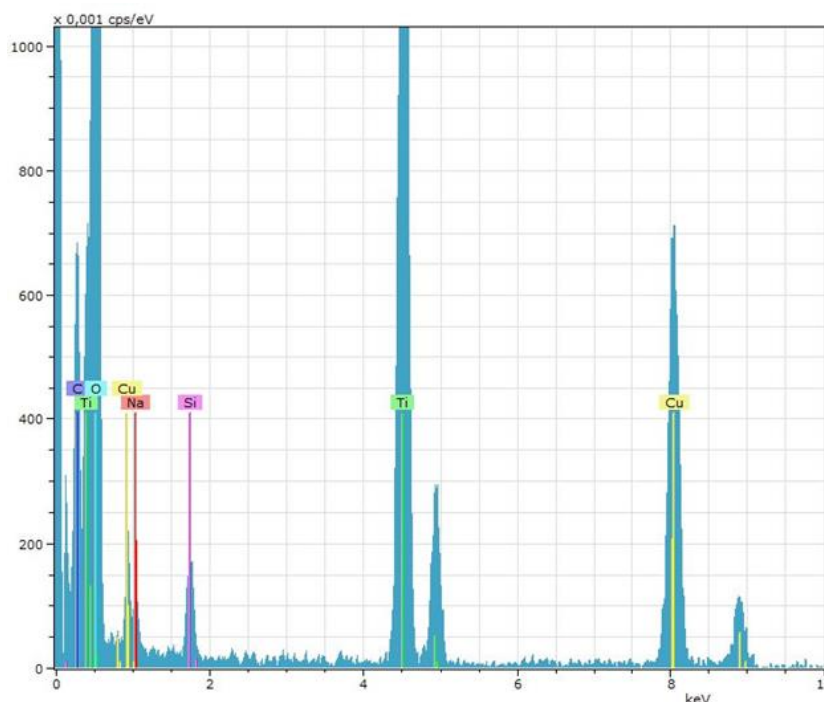


Figure 49 : Analyse EDS des NPs de NM-102

L'analyse EDS confirme la nature chimique du NM-102 (TiO_x) mais révèle également la présence de silicium à la surface des NPs de TiO_2 comme il est possible de voir sur la cartographie de la [Figure 47](#). Le silicium peut provenir des flacons en verre utilisés pour la préparation et le stockage des suspensions, ou bien du processus de production du TiO_2 qui utilise de l'ilménite (FeTiO_3) et qui peut contenir des traces de silice ([Gázquez et al., 2014](#)). L'analyse EDS ([Figure 49](#)) révèle également la présence de cuivre qui provient de la grille du support du MET.

En somme, les caractéristiques des NPs de TiO_2 du NM-102 se résument à une structure cristalline *anatase*, avec une masse volumique de $3,94 \pm 0,23 \text{ g/cm}^3$ et une surface spécifique de $79,1 \pm 0,8 \text{ m}^2/\text{g}$ et avec un diamètre moyen de 20 à 30 nm. Ces valeurs sont similaires à celles obtenues par le JRC ([Rasmussen et al., 2014](#)).

Nous allons ensuite nous intéresser à la charge de surface de ces NPs ainsi qu'à celle des membranes AF4 dans différents types de milieux. Le but étant d'améliorer la compréhension du comportement des NPs lors de leur séparation en AF4-ICP-MS.

III.3 Evaluation du potentiel zêta des NPs de TiO₂ du NM-102 et des membranes AF4

Comme discuté dans le [paragraphe II.8.5.5](#), la nature de l'éluant peut influencer la séparation des NPs en raison de la variation de différents paramètres comme le pH, la force ionique ou la présence de tensioactifs ([Dubascoux et al., 2008](#) ; [Ulrich et al., 2012](#) ; [Bendixen et al., 2014](#) ; [Correia et al., 2018](#)). Ces différents paramètres peuvent modifier le potentiel zêta des particules ou des membranes, ce qui peut avoir pour conséquence de modifier le taux de récupération ou l'agglomération des NPs via des interactions électrostatiques ([Bendixen et al., 2014](#)). C'est pourquoi, dans cette partie, le potentiel zêta sera évalué en fonction des différents paramètres. Pour cela, les méthodes utilisées sont la diffusion dynamique de la lumière et l'électrophorèse laser doppler, dont les principes sont présentés au préalable, dans les [paragraphes II.6](#) et [II.7](#) respectivement.

III.3.1 Réactifs

Toutes les solutions ont été préparées en utilisant de l'eau ultrapure obtenue par un système Millipore (Direct-Q). L'acide nitrique (HNO₃, suprapur, 65% m/m), l'hydroxyde de sodium (NaOH, suprapur, 30% m/m) et le nitrate de sodium (NaNO₃, > 99,5%) proviennent de la société Merck (Darmstadt, Allemagne). Le dodécylsulfate de sodium (SDS, ≥ 99%), le cetyltriméthylammonium chloride (CTAC, ≥ 98%) et le Triton X-100 ont été achetés à la société Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Le FL-70 a été commandé à la société Fischer Scientific (Hampton, USA). Sa composition étant complexe, elle est détaillée dans le [Tableau 8](#).

Tableau 8 : Liste des composés du FL-70

Fraction (%)	Composé
88,8%	Water
3,8%	Triethanolamine oleate
2,7%	Carbonate de sodium
1,8%	Alcools, C12-14-secondaire, ethoxylé
1,4%	Tetrasodium ethylenediaminetetraacetate
0,9%	Polyéthylène glycol
0,5%	Oléate de sodium
0,1%	Bicarbonate de sodium

Une suspension mère de NM-102 à 1 g/L a été préparée dans de l'eau ultrapure et stockée à température ambiante à l'abri de la lumière. Avant chaque utilisation de la suspension mère de NM-102, celle-ci est passée dans un bain à ultrasons pendant 15 min à température ambiante afin de disperser les NPs. Toutes les suspensions de NM-102 ont été analysées dans les 30 min suivant leurs préparations et sont à nouveau passées dans un bain à ultrasons pendant 30 s, avant l'analyse. Toutes les solutions contenant des tensioactifs sont préparées de façon à obtenir une concentration finale correspondant à 50% de la Concentration Micellaire Critique (CMC) de chaque tensioactif. Les CMC sont données par le fournisseur ou déterminées par mesure de la conductivité ([paragraphe III.3.2](#)).

III.3.2 Détermination expérimentale des Concentrations Micellaires Critiques (CMC) des tensioactifs

La CMC correspond à la quantité minimum à partir de laquelle les tensioactifs vont former naturellement des micelles, qui sont des agrégats microscopiques ([Figure 50](#)).

Afin d'avoir une comparaison pertinente entre les différents tensioactifs employés, il a été jugé plus approprié de les comparer en utilisant des concentrations égales par rapport à leur CMC et non par rapport à leur concentration molaire. C'est pourquoi il est nécessaire de déterminer la CMC de ces tensioactifs.

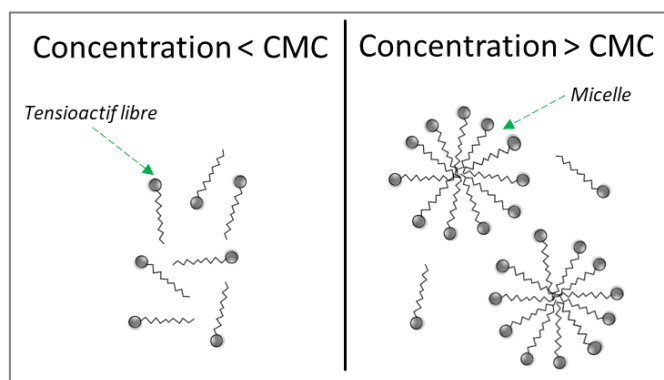


Figure 50 : Exemple de comportement d'une substance tensioactive par rapport à sa CMC

Les quatre tensioactifs étudiés lors de ces travaux sont : le SDS qui est un tensioactif anionique, le CTAC qui est un tensioactif cationique, le Triton X-100 qui est un tensioactif non ionique et le FL-70 qui est un mélange de plusieurs composés ([Tableau 8](#)). Seule la CMC du Triton X-100 était indiquée par le fournisseur, nous l'avons évalué pour les trois autres.

III.3.2.1 Méthode

La mesure de la conductivité d'une solution avec une concentration croissante de tensioactif permet de déterminer sa CMC. En effet, lorsque les tensioactifs forment des micelles, les charges électriques se déplacent moins facilement et cela impacte la courbe de conductivité. Celle-ci est mesurée dans un bécher contenant 35 mL d'eau ultrapure, dans lequel est ajouté progressivement le tensioactif. La concentration des solutions mères de tensioactifs est de 77,8 mM pour le SDS, 75 mM pour le CTAC et 10% (m/m) pour le FL-70 (La concentration du FL-70 ne peut être exprimée en concentration molaire puisque c'est un mélange de plusieurs composés). La conductivité est enregistrée après chaque ajout de 50 μ L de solution de tensioactif. L'expérience est réalisée à température ambiante à l'aide de l'électrode de l'Analyseur électrocinétique SurPASS (Anton Paar GmbH, Vienne, Autriche).

III.3.2.2 Résultats

L'observation des droites de la conductivité obtenues (Figure 51) permet de déterminer la CMC, qui correspond au point d'intersection de la première droite de conductivité (tensioactif libre) avec la deuxième droite de conductivité (formation des micelles et diminution de la conductivité).

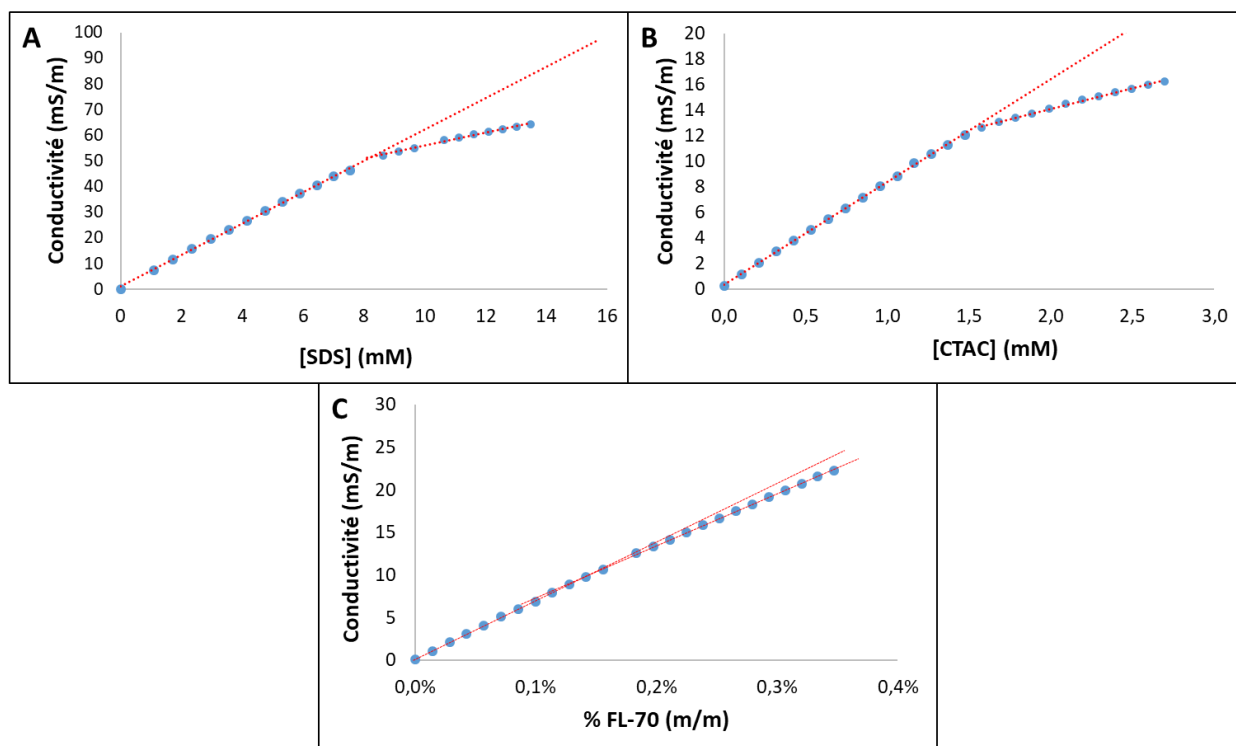


Figure 51 : Variation de la conductivité en fonction de la concentration du SDS (A), du CTAC (B) et du FL-70 (C)

Pour le SDS et le CTAC, le point d'inflexion de la courbe qui indique la formation de micelles se distingue sans difficulté ([Figure 51A et B](#)). A partir de ce point, deux droites de tendance sont déterminées et le calcul de la CMC s'effectue à partir de l'équation de chaque droite ([Équation 9](#)).

Équation 9

$$CMC = \frac{(b_2 - b_1)}{(a_1 - a_2)}$$

avec :

a_1 : pente de la droite correspondante aux tensioactifs libres

a_2 : pente de la droite correspondante aux micelles

b_1 : ordonnée à l'origine de la droite correspondante aux tensioactifs libres

b_2 : ordonnée à l'origine de la droite correspondante aux micelles

Pour le FL-70, le point de rupture de la pente est plus difficile à déterminer ([Figure 51C](#)). Cela est probablement dû à la présence de nombreux composés dans ce mélange, ([Tableau 8](#)) dont le bicarbonate de sodium (NaHCO_3) et le carbonate de sodium (Na_2CO_3) qui augmentent fortement la conductivité et peuvent alors minimiser l'impact de la formation des micelles sur la conductivité de la solution.

Les CMC calculées sont répertoriées dans le [Tableau 9](#). Les valeurs de CMC du SDS et du CTAC correspondent à celles retrouvées dans la littérature ([Mukerjee and Mysels, 1972](#)) tandis que pour le FL-70, la CMC n'est pas documentée.

Tableau 9 : CMC des différents tensioactifs étudiés

Tensioactif	CMC (mM)	CMC (% m/m)	50% CMC (mM)	50% CMC (% m/m)
SDS	8,3	0,24	4,13	0,12
CTAC	1,5	0,05	1,26	0,025
Triton X-100	0,24 ^a	0,01	0,12	0,005
FL-70	-	0,175	-	0,088

^a Indiquée par le fournisseur

Après avoir obtenu les CMC des différents tensioactifs, le potentiel zêta des particules sera étudié en fonction de plusieurs paramètres dont la présence de tensioactif. La concentration utilisée pour ces derniers est fixée à 50% de la CMC afin de ne pas avoir de micelles qui pourraient interférer avec les mesures de taille, tout en ayant une présence significative de tensioactifs.

III.3.3 Détermination du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique des NPs de TiO₂ du NM-102

III.3.3.1 Méthode

Une suspension de NM-102 à 10 mg/L a été utilisée pour réaliser les analyses. Avant chaque mesure, le pH est ajusté à 9 par ajout de NaOH et l'échantillon est passé aux ultrasons pendant 30 s. Un volume de la suspension de 12 mL est prélevé pour effectuer les mesures du potentiel zêta. Une titration automatique avec de l'acide nitrique (0,14 mol/L) permet de diminuer le pH progressivement de 9 à 3. Le potentiel zêta et le diamètre hydrodynamique sont mesurés en triplicata à chaque valeur de pH et leurs moyennes sont utilisées pour le traitement de données. Le modèle Smoluchowski est utilisé pour le calcul du diamètre hydrodynamique. Ce modèle utilise l'équation de Stokes-Einstein ([Annexe A, Équation A10](#)). Enfin, le modèle du nombre sera utilisé pour calculer les diamètres hydrodynamiques car il favorise les petits diamètres, contrairement au modèle du volume ([paragraphe II.6](#)).

Pour l'évaluation de l'influence de la force ionique sur la séparation des NPs, quatre suspensions de NM-102 (10 mg/L) ont été préparées à cinq concentrations différentes en NaNO₃ : 0 ; 1 ; 5 ; 10 et 30 mM. Pour évaluer l'influence des tensioactifs, quatre types de tensioactif différents ont été utilisés : SDS (anionique), CTAC (cationique), Triton X-100 (non ionique) et FL-70 (anionique + autres composés). La concentration des tensioactifs est égale à 50% de leur CMC ([Tableau 9](#)).

III.3.3.2 Résultats

III.3.3.2.1 Évaluation de l'influence de la force ionique et du pH

Les valeurs des potentiels zêta en fonction du pH et pour différentes forces ioniques sont présentées dans la [Figure 52A](#). La première constatation est que le NM-102 ne possède pas de Point IsoElectrique (IEP), point pour lequel la somme des charges de surface est nulle ([Figure 52A](#)), quel que soit le pH et la concentration de NaNO₃ étudiés ici. Il semble que si la gamme de pH avait été élargie, alors l'IEP pourrait s'estimer aux alentours de 1,5-2. Le potentiel zêta reste négatif sur toute la gamme de pH évaluée, ce qui est similaire aux résultats obtenus par [Freyre-fonseca et al. \(2016\)](#) avec un IEP à pH ≈ 2 pour une suspension de TiO₂ provenant du fournisseur de Sigma-Aldrich et un lot de E171 dans de l'eau. A l'inverse, ([Dudefoi et al., 2017](#)) obtiennent un IEP à pH ≈ 2 pour un échantillon de TiO₂. Cette différence peut s'expliquer par la présence de silice à la surface des NPs qui a été observée ([Figure 47](#)) qui possède un IEP entre 2 et 4 ([Lin et al., 2002](#) ; [Teleki et al., 2008](#) ; [Chen et al., 2010](#)). Il semble que le potentiel zêta augmente légèrement avec la force ionique. Cela est cohérent puisqu'avec l'ajout

d'ions en solution, la densité des charges augmente et cela compresse la double couche électrique autour des particules. Cette compression se traduit par une diminution des charges autour de la particule et des valeurs de potentiel zêta qui tendent vers 0 mV (Dubascoux *et al.*, 2008).

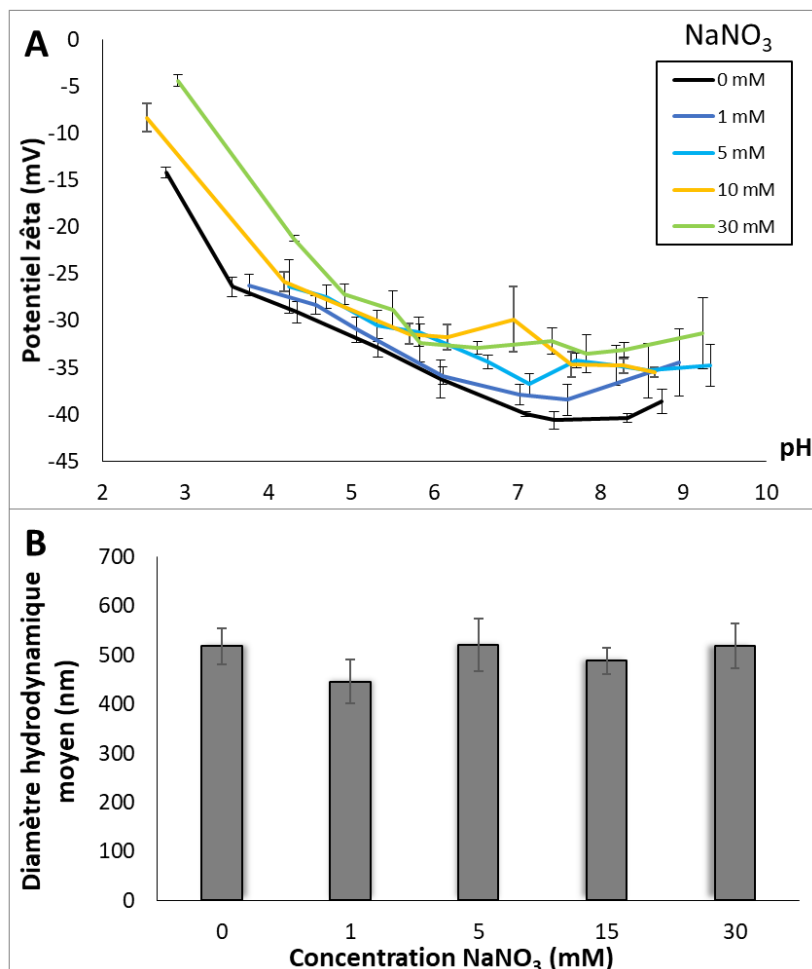


Figure 52 : Variation du potentiel zêta (A) et du diamètre hydrodynamique (B) du NM-102 en fonction du pH et de la force ionique (modifiée par ajout de NaNO₃)

La Figure 52B présente le diamètre hydrodynamique moyen du NM-102 pour chaque condition de force ionique car il s'avère qu'une seule population en taille est observée et que celle-ci n'est pas modifiée avec la variation de pH (Annexe B, Figure B1). D'après les résultats de la Figure 52B, les diamètres obtenus varient entre 450 et 520 nm pour toutes les conditions de force ionique et ne présentent pas de différences significatives en tenant compte des incertitudes de répétabilité. Ces tailles sont nettement supérieures aux diamètres mesurés par MET (Figure 48) et à ceux mesurés par le JRC (Rasmussen *et al.*, 2014). Cela signifie que les particules ont formé des agglomérats. En effet, pour toutes les conditions de force ionique, le logiciel calcul un Indice de PolyDispersité (PDI) qui est systématique supérieur à 0,57. Le maximum de cette valeur étant 1, cela confirme une forte variation

en taille des NPs dû aux agglomérats présents au sein de la suspension de NM-102. La présence d'agglomérats peut biaiser les tailles mesurées puisque les plus grosses particules diffusent plus de lumière que les plus petites particules (paragraphe II.6). Par conséquent, il est important d'utiliser des méthodes complémentaires plus précises pour mesurer la taille des NPs dans le NM-102, comme l'AF4-ICP-MS qui permet de séparer les particules en fonction de leur taille.

III.3.3.2.2 Évaluation de l'influence de la présence de tensioactifs et du pH

Concernant l'évaluation de l'influence des tensioactifs sur le potentiel, puisqu'il a été vu que le potentiel zêta est dépendant de la force ionique, les suspensions de NM-102 avec tensioactifs ont été analysées à deux conditions de forces ioniques, à savoir, sans NaNO_3 ou à une concentration de 10 mM de NaNO_3 . En comparant les résultats présentés dans la Figure 53A-B, les différences sont très faibles entre les deux conditions de force ionique. A l'inverse, l'ajout de tensioactifs modifie significativement les valeurs de potentiel zêta.

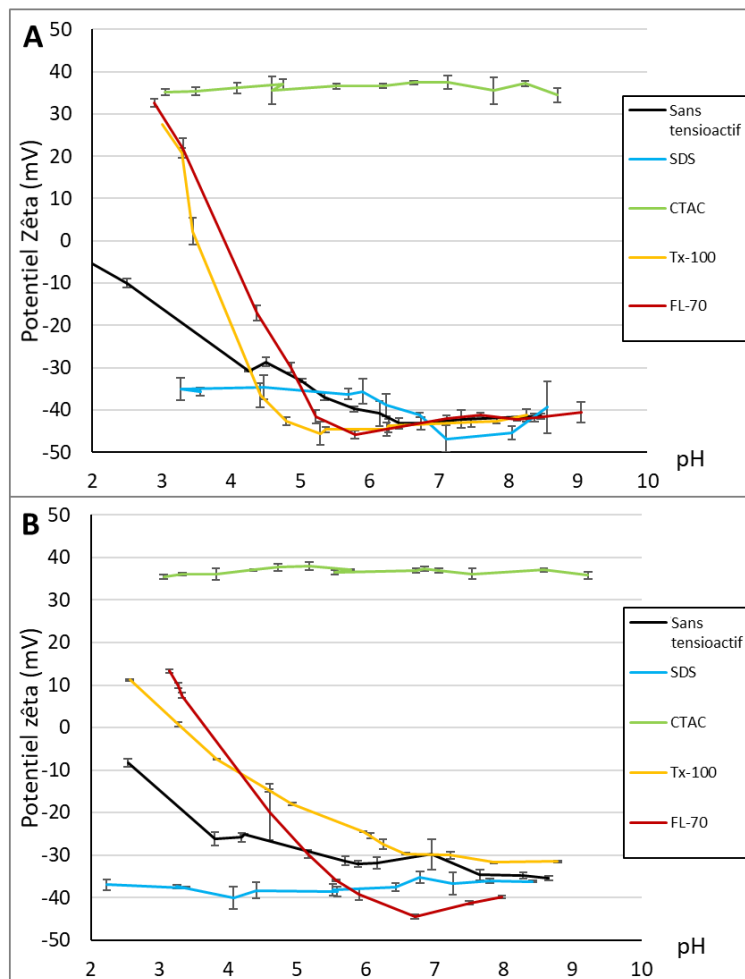


Figure 53 : Variation des potentiels zêta des NPs de TiO_2 en fonction du pH et de l'addition de différents tensioactifs avec une concentration en NaNO_3 de 0 mM (A) et 10 mM (B)

Le SDS, qui est un tensioactif anionique, permet de conserver un potentiel zêta négatif sur toute la gamme de pH, alors qu'avec un tensioactif cationique, CTAC, le potentiel zêta reste positif. Pour les tensioactifs Triton X-100 et FL-70, un IEP est atteint pour une valeur de pH $\approx 3,5$. Ces résultats mettent clairement en avant le rôle que peuvent avoir les tensioactifs sur les charges de surface des NPs. En tenant compte de ces résultats, le SDS et le CTAC sont les tensioactifs les plus efficaces car ils permettent de conserver un potentiel zêta négatif ou positif élevé aux NPs, ce qui favoriserait les répulsions entre particules.

Concernant le diamètre hydrodynamique ([Annexe B, Figure B2](#)), il n'y a pas de variations observées malgré la présence des différents tensioactifs, avec des diamètres compris entre 400 à 600 nm. La présence de tensioactifs ne semble donc pas améliorer significativement la dispersion des NPs. Le PDI moyen pour chaque condition d'éluant varie entre 0,51 et 0,59 ce qui est similaire aux résultats obtenus sans tensioactif. Cela témoigne également de la présence d'agglomérats qui peuvent biaiser les tailles obtenues par DLS. Il est alors nécessaire d'évaluer l'influence des tensioactifs sur la dispersion des particules avec la méthode AF4-ICP-MS afin de séparer les particules en fonction de leur taille.

III.3.4 Détermination du potentiel zêta des membranes AF4

III.3.4.1 Méthode

La membrane étudiée ici est constituée de Cellulose Régénérée (RC) avec un seuil de coupure de 10 kDa. C'est la membrane la plus utilisée pour l'analyse de NPs de TiO_2 en AF4 ([Tableau 6](#)). Le côté de la membrane exposé aux NPs lors de l'analyse par AF4-ICP-MS est le côté qui sera étudié avec l'analyseur électrocinétique, dont le principe est présenté dans le [paragraphe II.8.7](#). Un volume de 500 mL d'éluant est préparé et avant chaque mesure, son pH est ajusté à 9 par ajout de NaOH. Le potentiel zêta est mesuré en fonction de plusieurs paramètres : pH, force ionique et présence d'un tensioactif. Pour le pH, un système d'autotitration intégré à l'appareil permet de diminuer progressivement le pH à 3 (HNO_3 0,3 M). Pour évaluer l'impact de la force ionique, plusieurs éluants contenant différentes concentrations en NaNO_3 sont utilisés : 0 ; 1 ; 5 ; 10 et 30 mM. Enfin, l'influence des tensioactifs SDS, CTAC, Triton X-100 et FL-70 est aussi évaluée.

III.3.4.2 Résultats

III.3.4.2.1 Évaluation de l'influence de la force ionique et du pH

L'influence du pH et de la force ionique sur le potentiel zêta des membranes RC 10 kDa est présentée dans la [Figure 54](#).

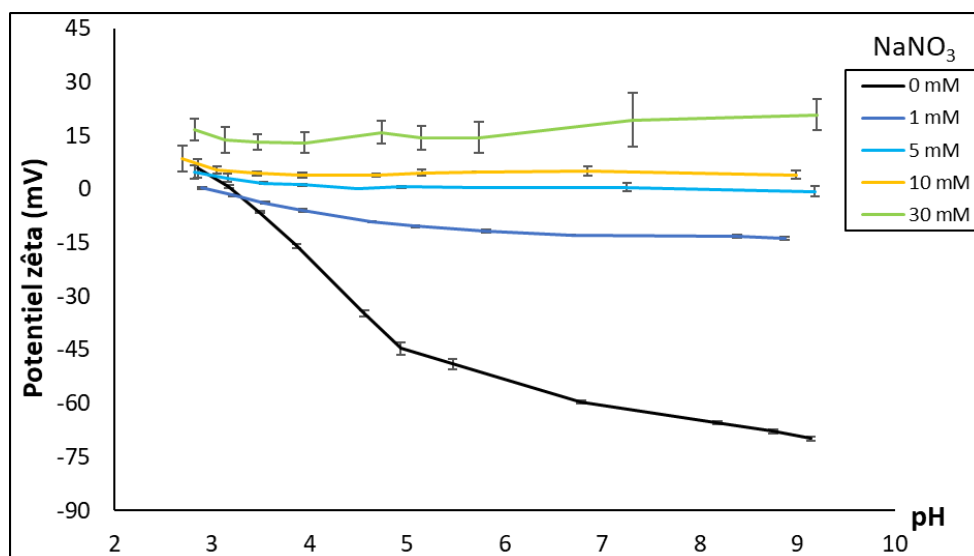


Figure 54 : Potentiel zêta des membranes RC 10 kDa en fonction du pH et de la force ionique

Ces résultats montrent que la force ionique joue un rôle important sur les charges de surface et peut même changer le signe du potentiel zêta de la membrane. Plus la concentration en NaNO_3 augmente, plus le potentiel zêta augmente. Pour des concentrations en NaNO_3 de 0 et 1 mM, le potentiel zêta reste négatif sur la quasi-totalité de la gamme de pH évaluée, avec un IEP aux alentours de $\text{pH} = 3$. Pour des concentrations en $\text{NaNO}_3 > 5$ mM, la membrane devient positive dès $\text{pH} 9$. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans d'autres études ([Bendixen et al., 2014](#) ; [Meisterjahn et al., 2016](#)). On remarque qu'en l'absence de NaNO_3 , le pH influe significativement sur le potentiel zêta. Cela est probablement dû à la protonation des groupements hydroxyles présents à la surface de la membrane RC. Cet effet est atténué mais reste encore observable avec 1 mM de NaNO_3 alors que pour des concentrations plus fortes en NaNO_3 , le pH ne semble plus avoir d'impact sur le potentiel zêta. Pour les conditions avec des concentrations en $\text{NaNO}_3 \geq 5$ mM, ces résultats sont probablement dus à l'augmentation de la concentration en ions Na^+ provenant du NaNO_3 qui viennent remplir la couche électrique proche de la membrane et augmente ainsi son potentiel zêta. En effet, ces ions peuvent interagir avec les fonctions éther et hydroxyle de la membrane RC. Ainsi, lors de la diminution du pH (ajout d'acide), les ions Na^+ provenant de NaNO_3 et H_3O^+ issu de HNO_3 , entrent en compétition pour ces sites de surface. Or, les ions Na^+ sont significativement plus concentrés que les ions H_3O^+ pour la gamme de pH étudiée, ce qui conforte l'observation du faible impact du pH sur le potentiel zêta.

III.3.4.2.2 Évaluation de l'influence de la présence de tensioactifs et du pH

La force ionique a une influence importante sur le potentiel zêta de la membrane, contrairement à la suspension de NPs de TiO_2 ([Figure 52A](#)). De même que pour les NPs, les deux concentrations en NaNO_3 choisies sont 0 et 10 mM pour évaluer l'impact des tensioactifs sur le potentiel zêta des membranes. Ces deux conditions permettent d'avoir, dans le premier cas, une membrane chargée initialement négativement et dans l'autre cas, une membrane chargée initialement positivement. Les variations du potentiel zêta en fonction du pH et du type de tensioactif sont présentées dans la [Figure 55](#).

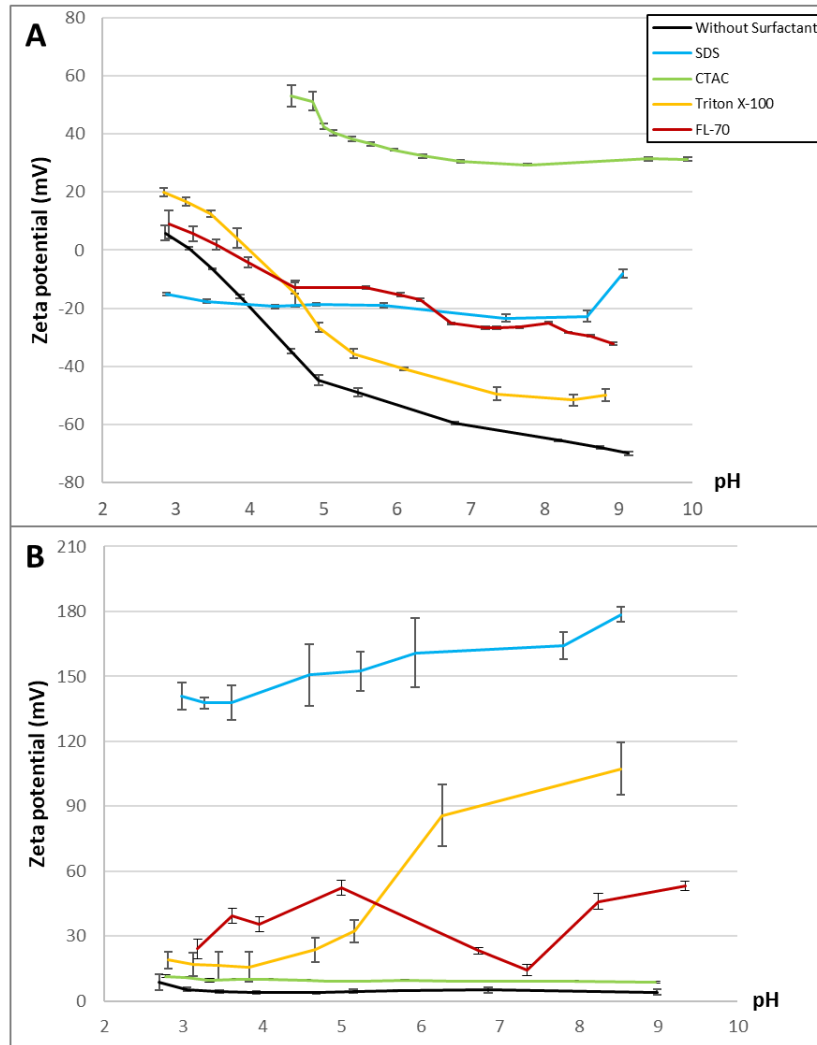


Figure 55 : Potentiel zêta des membranes AF4 (RC 10 kDa) en fonction du pH et de la présence de différents tensioactifs à 50% de leur CMC avec du NaNO₃ à 0 mM (A) et 10 mM (B)

Dans le cas où il n'y a pas de NaNO₃ (Figure 55A), le potentiel zêta de la membrane qui était négatif initialement est tout de même positif avec le tensioactif cationique CTAC, ce qui indique que celui-ci influe bien sur la charge de surface de la membrane de façon à avoir un potentiel positif sur toute la gamme de pH étudiée. A l'inverse, le tensioactif anionique SDS fournit un potentiel zêta négatif à la membrane sur toute la gamme de pH testée. Il est intéressant de noter que la valeur du potentiel zêta de la membrane est moins négative en présence de SDS, comparée à la valeur du potentiel zêta obtenue sans tensioactif, sur la gamme de pH 4 à 9. Cela s'explique par la présence d'ions Na⁺ apportés par le SDS. Or, il a été observé que la présence de ces ions augmente la valeur du potentiel zêta de la membrane (Figure 54). La même tendance est observée avec le FL-70, constitué de plusieurs composants dont certains pouvant apporter des ions Na⁺ (Tableau 8). L'IEP est déterminé aux alentours de 3,5-4 pour les conditions sans tensioactif, avec Triton X-100 et avec FL-70.

Dans le cas de la présence de NaNO_3 à 10 mM ([Figure 55B](#)), toutes les conditions d'éluant testées permettent d'obtenir un potentiel zêta de membrane positif sur toute la gamme de pH. Les valeurs obtenues avec le SDS sont étonnamment très élevées (130-180 mV) même si la forte concentration d'ions Na^+ participe à l'augmentation de la valeur du potentiel zêta. Avec le Triton X-100, la membrane présente un potentiel zêta élevé pour un pH compris entre 5 et 9. Ce tensioactif étant non ionique permet peut-être de rapprocher les ions Na^+ de la membrane par effet stérique, ce qui stabiliserait la couche électronique. La membrane avec le FL-70 possède un potentiel zêta plus élevé que celui obtenu sans tensioactif, ce qui est probablement dû à la présence de composés ioniques dans le FL-70 ([Tableau 8](#)).

III.3.5 Choix des conditions d'éluant pour l'analyse AF4-ICP-MS

Tous les résultats portant sur les potentiels zêta des NPs et membranes sont résumés dans le [Tableau 10](#).

Tableau 10 : Synthèse des signes des potentiels zêta des particules et de la membrane RC 10 kDa, obtenus en fonction de la présence de tensioactif, de la force ionique et du pH de l'éluant. Les conditions retenues pour les analyses AF4-ICP-MS sont encadrées en pointillé.

Tensioactif	Sans tensioactif		SDS		CTAC		Triton X-100		FL-70	
Concentration NaNO_3	< 5 mM	> 5 mM	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM
Potentiel zêta des particules							  IEP = 3,5	  IEP = 3,3	 IEP = 3,9	 IEP = 3,3
Potentiel zêta des membranes	 IEP = 3,2						  IEP = 4		 IEP = 3,5	

Il est nécessaire de sélectionner des conditions qui permettent d'évaluer l'impact du potentiel zêta sur l'analyse AF4-ICP-MS. Ces conditions ont pu être choisies grâce au [Tableau 10](#), qui résume les signes des potentiels zêta des particules et membranes. Ainsi, les conditions qui favorisent les répulsions ou attractions électrostatiques entre particules et membranes ont pu être identifiées. Par exemple, le SDS sans NaNO_3 permet d'avoir une membrane et des particules chargées négativement, ce qui favoriserait les répulsions électrostatiques. A l'inverse, en présence de NaNO_3 , la membrane se charge positivement, ce qui faciliterait les attractions électrostatiques et potentiellement des pertes de particules sur la membrane. Les conditions finalement retenues sont répertoriées dans le [Tableau 11](#).

Tableau 11 : Potentiels zêta des NPs de TiO₂ (NM-102) et des membranes AF4 (RC 10 kDa) obtenus pour différentes conditions de phase mobile

Condition de la phase mobile	Potentiel zêta des particules (mV)	Potentiel zêta de la membrane RC 10 kDa (mV)	Type d'interaction électrostatique particules-membrane attendue
Sans tensioactif NaNO₃ = 0 mM pH = 5,5-6	- 39,7	- 49,0	Répulsion
SDS NaNO₃ = 0 mM pH = 5,5-6	- 36,0	- 19,1	Répulsion
CTAC NaNO₃ = 0 mM pH = 5,5-6	+ 36,5	+ 36,0	Répulsion
Triton X-100 NaNO₃ = 0 mM pH = 7,5	- 42,0	- 49,5	Répulsion
FL-70 NaNO₃ = 0 mM pH = 9	- 40,5	- 32,2	Répulsion
Sans tensioactif + NaNO₃ (10 mM) pH = 5,5-6	- 31,4	+ 4,8	Attraction
SDS NaNO₃ (10 mM) pH = 5,5-6	- 38,5	+ 18,6	Attraction

Parmi ces conditions, cinq ont été choisies car elles favorisent les répulsions électrostatiques et se différencient en utilisant chacune un tensioactif différent (SDS, CTAC, Triton X-100, FL-70 et sans tensioactif). Cela permettra d'évaluer l'impact de la composition de l'éluant, en plus des interactions électrostatiques. Deux conditions favorisant les attractions électrostatiques ont aussi été sélectionnées à savoir, un éluant sans présence de tensioactif mais avec NaNO₃ à 10 mM et un éluant avec du SDS et 10 mM de NaNO₃. Ces deux conditions pourront être comparées directement avec les mêmes éluants sans NaNO₃, qui eux, favorisent les répulsions électrostatiques. Le choix de ces différentes conditions va permettre d'évaluer l'influence des interactions électrostatiques mais aussi l'influence des différents tensioactifs sur la séparation des particules. Le pH indiqué dans le [Tableau 11](#) correspond au pH sans ajustement, excepté pour le Triton X-100 dont le pH a été augmenté par ajout de NaOH pour éviter d'être proche de l'IEP. Le FL-70 tamponne naturellement le pH aux alentours de 9.

III.4 Analyses des NPs de TiO₂ du NM-102 par AF4-ICP-MS

III.4.1 Méthode

III.4.1.1 Instrument

Le principe de la séparation AF4 est détaillé dans le [paragraphe II.8](#). Le système AF4 utilisé pour ces travaux est composé d'un système HPLC (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) modifié avec un contrôleur de flux (Eclipse, Wyatt Technology, Goleta, USA) et un canal de séparation de 275 mm de longueur et 50 mm de largeur, avec un espaceur de 350 µm. Pour mesurer la taille des particules, le système est couplé à un détecteur de diffusion de la lumière multi angles (MALS) de Wyatt Technology (Goleta, USA), il est composé de 18 photodétecteurs et les diamètres de giration ([paragraphe II.8.6](#)) sont mesurés à un angle de 90°. Enfin, un ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) est couplé au système pour quantifier les NPs de TiO₂. L'isotope analysé est le ⁴⁷Ti et les paramètres d'analyses restants sont présentés en annexe ([Annexe B, Tableau B1](#)).

III.4.1.2 Changement de membrane

Chaque analyse AF4-ICP-MS a été effectuée en utilisant une membrane neuve (RC 10 kDa) qui est conditionnée en amont dans de l'eau ultrapure durant 24 h. Lors de chaque changement d'éluant, une nouvelle membrane est utilisée afin d'avoir des conditions identiques. Après la mise en place de chaque nouvelle membrane dans le canal, l'étape de concentration-relaxation est vérifiée en utilisant une solution de bleu dextran (Wyatt Technology) à 10 g/L. L'usage de ce colorant permet d'observer la ligne de concentration ([Figure 31](#)). L'avancement de cette ligne sur le canal peut alors être réglé en modifiant le flux croisé durant l'étape de concentration-relaxation. Par conséquent, à chaque changement de membrane, cette ligne de concentration est ajustée au même niveau pour toutes les analyses ([Figure 56](#)).

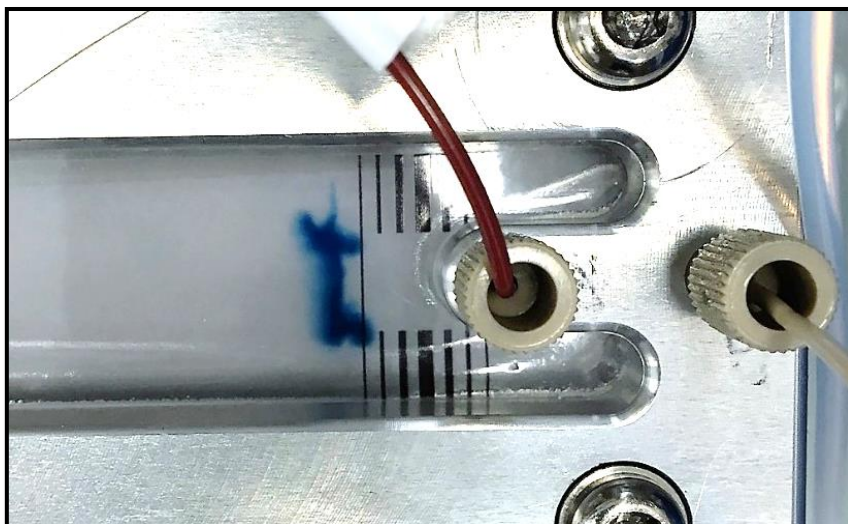


Figure 56 : Ligne de concentration visible avec du bleu dextran durant l'étape de concentration-relaxation

Les paramètres du programme d'élution pour contrôler la ligne de concentration sont présentés dans le [Tableau 12](#).

Tableau 12 : Paramètres du programme d'élution pour contrôler la ligne de concentration avec le bleu dextran

Flux primaire (mL/min)	1
Débit d'injection (mL/min)	0,2
Flux croisé (mL/min)	2
Temps de l'étape de concentration-relaxation (min)	8
Temps d'injection (min)	1
Elution	Flux croisé constant à 2 mL/min pendant 2 min Ensuite, flux croisé à 0,11 mL/min pendant 5 min

III.4.1.3 Conditionnement du système

Après la mise en place de la nouvelle membrane, l'eau ultrapure, qui sert de phase mobile lors du nettoyage du système, est remplacée par la phase mobile d'intérêt. Le système est ensuite mis à l'équilibre durant 48 h avec un flux primaire constant de 1 mL/min et un flux croisé à 0,6 mL/min. Pendant cette période, plusieurs injections (minimum 3) de suspension de NM-102 à 10 mg/L sont effectuées dans le but de passiver la membrane ([Benincasa and Giddings, 1992](#) ; [Ulrich et al., 2012](#)).

III.4.1.4 Calcul du taux de récupération des NPs

Le taux de récupération des NPs est calculé en comparant l'aire du signal des NPs lors d'une analyse sans rétention (absence de l'étape de concentration-relaxation et flux croisé nul) avec l'aire du signal avec rétention (avec flux croisé et étape de concentration-relaxation). Il est généralement admis mais non vérifié, que l'analyse sans rétention permet de récupérer 100% des particules (Ulrich et al., 2012 ; Bendixen et al., 2014). Un ratio est ensuite calculé entre les aires des signaux des deux analyses pour déterminer le taux de récupération.

Dans le cadre de ce travail, la quantité réelle de NPs récupérée avec l'analyse sans rétention n'est pas considérée égale à 100% et est calculée pour avoir une meilleure justesse sur le taux de récupération. La concentration en TiO₂ est quantifiée par étalonnage externe avec une gamme de six étalons de NM-102 : 0 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 µg/L en Ti. Les étalons sont préparés dans le même éluant que celui évalué en AF4-ICP-MS. Les analyses de ces étalons se font en mode « Time Resolved Analysis » (TRA) pendant 3 min, avec seulement l'ICP-MS et donc sans le système AF4. Cette étape nous permet d'obtenir une équation classique d'étalonnage (Équation 10).

Équation 10

$$\text{Signal} = a \times [\text{Ti}] + b$$

avec :

Signal : signal obtenu par l'ICP-MS (cps)

a : pente de la droite d'étalonnage (cps/(µg/L))

[Ti] : concentration en titane en µg/L

b : ordonnée à l'origine (cps)

Ensuite, le système AF4-MALS est couplé à l'ICP-MS et une suspension de NM-102 (10 mg/L) est analysée en triplicata sans rétention, c'est-à-dire sans passer par l'étape de concentration-relaxation et sans l'utilisation du flux croisé. Le programme d'élution est présenté dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Paramètres du programme d'élution pour mesurer la concentration du NM-102 sans rétention

Flux primaire (mL/min)	1
Débit d'injection (mL/min)	0,2
Flux croisé (mL/min)	0
Temps de l'étape de concentration-relaxation (min)	0
Temps d'injection (min)	3
Elution	Flux croisé constant à 0 mL/min pendant 30 min

Les données brutes de ces analyses sont ensuite récupérées et converties en concentration à l'aide de l'Équation 10. Une nouvelle courbe peut alors être obtenue et les pics correspondant au TiO₂ sont alors intégrés à l'aide d'une feuille de calcul interne. La masse expérimentale de NM-102 détectée peut alors être déterminée à l'aide de l'Équation 11.

Équation 11

$$m_{\text{expérimentale}} = A_{\text{SR}} \times Q$$

avec :

$m_{\text{expérimentale}}$: masse de Ti détectée par l'ICP-MS (µg)

A_{SR} : aire du pic de Ti pour les conditions sans rétention (µg.s/L)

Q : flux primaire (L/s)

Cette masse expérimentale calculée est ensuite comparée avec la masse théorique injectée pour obtenir le taux de récupération (Équation 12).

Équation 12

$$\text{Taux de récupération}_A = \frac{m_{\text{expérimentale}}}{m_{\text{théorique}}} \times 100$$

avec :

Taux de récupération_A : taux de récupération des particules dans le système AF4-ICP-MS sans rétention (%)

$m_{\text{théorique}}$: masse de Ti réellement injectée (µg)

Ensuite, le triplicata de NM-102 est à nouveau analysé en AF4-ICP-MS mais cette fois avec l'étape de concentration-relaxation ainsi que le flux croisé, afin d'avoir un mécanisme de rétention. Les

paramètres du programme d'élution sont présentés dans le [Tableau 14](#). Ce programme d'élution est un programme de base utilisé au laboratoire, recommandé par le fournisseur de l'AF4. Il est identique pour chaque condition d'éluant et n'est donc pas optimisé individuellement. Toutefois, les valeurs des différents flux croisés sont cohérentes par rapport à celles répertoriées dans la littérature ([Tableau 6](#)), notamment avec les études de [López-heras et al. \(2014\)](#) et [Correia et al. \(2018\)](#).

Tableau 14 : Paramètres du programme d'élution pour mesurer la concentration du NM-102 avec rétention

Flux primaire (mL/min)	1
Débit d'injection (mL/min)	0,2
Flux croisé (mL/min)	0,6
Temps de l'étape de concentration-relaxation (min)	3
Temps d'injection (min)	3
Elution	Flux croisé constant à 0,6 mL/min pendant 3 min Diminution du flux croisé à 0,11 mL/min pendant 5 min Flux croisé constant à 0,11 mL/min pendant 10 min Flux croisé à 0 mL/min pendant 30 min

En utilisant la même méthodologie que pour l'analyse sans rétention, l'aire du signal de Ti obtenue par ICP-MS permet de calculer le taux de récupération des particules en comparant la somme des aires des deux analyses ([Équation 13](#)).

Équation 13

$$\text{Taux de récupération}_B = \text{Taux de récupération}_A \times \frac{A_{AR}}{A_{SR}}$$

avec :

Taux de récupération_B : taux de récupération des particules dans le système AF4-ICP-MS avec rétention (%)

A_{AR} : Aire du pic de Ti pour les conditions avec flux croisés et l'étape de concentration-relaxation (µg.s/L)

Les valeurs de taux de récupération ont été obtenues à partir d'un triplicata d'analyse d'une suspension de NM-102.

III.4.2 Résultats

III.4.2.1 Mesure des tailles des particules

Les NPs de TiO_2 ont été analysées par AF4-MALS-ICP-MS, en se basant sur les conditions présentées dans le [Tableau 11](#). Pour chaque condition, les fractogrammes obtenus avec le MALS sont représentés dans la [Figure 57](#), tandis que la [Figure 58](#), répertorie ceux obtenus par ICP-MS. Les deux conditions favorisant les attractions, à savoir l'éluant avec 10 mM de NaNO_3 ainsi que l'éluant avec SDS à 50% de sa CMC et NaNO_3 à 10 mM, ne sont pas présentées car leur taux de récupération est très faible (voir [paragraphe III.4.2.2](#)) et par conséquent, les informations en taille fournies par le MALS ne sont pas pertinentes.

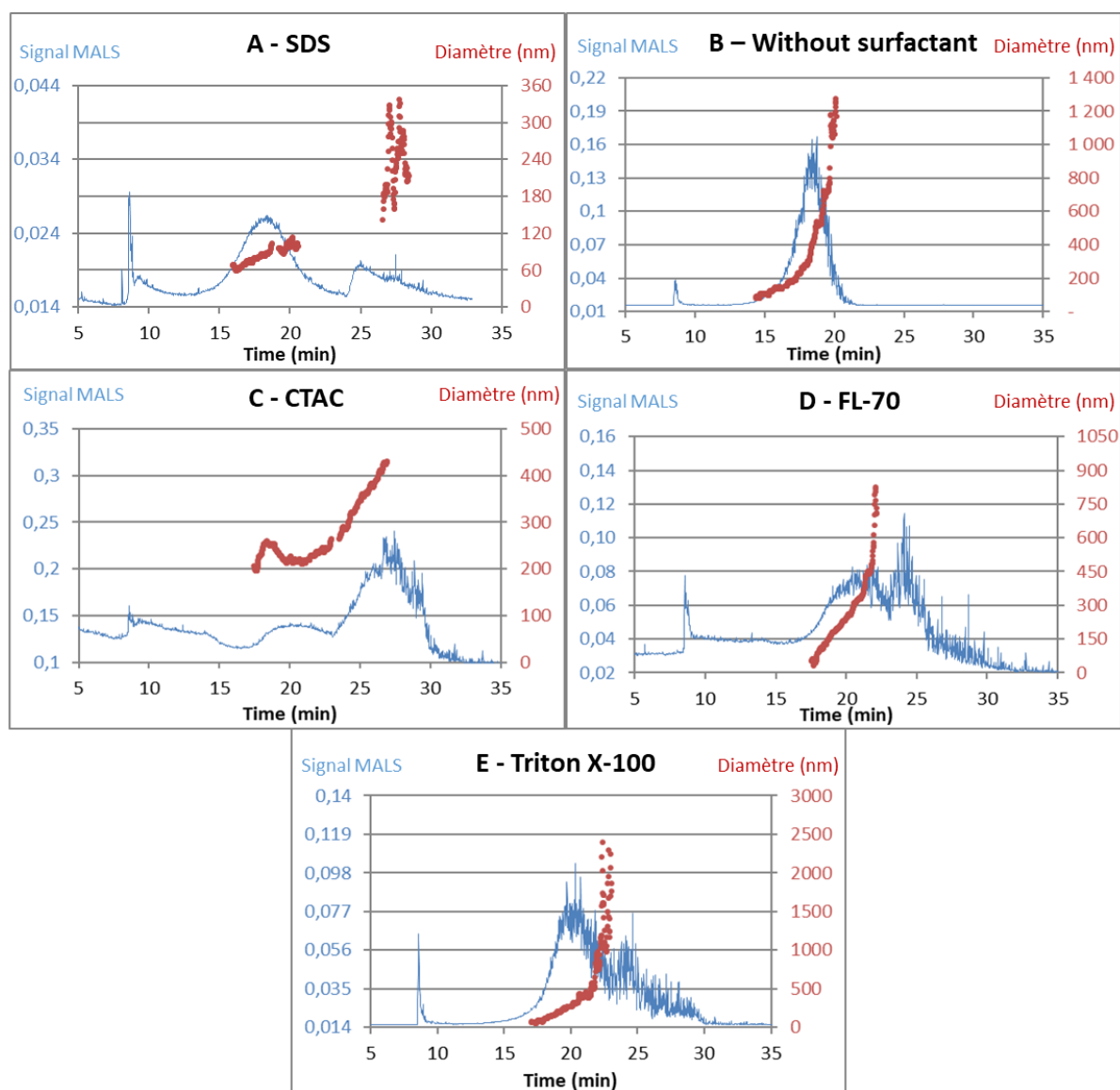


Figure 57 : Signal MALS obtenu et diamètre de giration mesuré lors de l'analyse de NM-102 avec différentes phases mobiles : SDS (A), sans tensioactif (B), CTAC (C), FL-70 (D) et Triton X-100 (E)

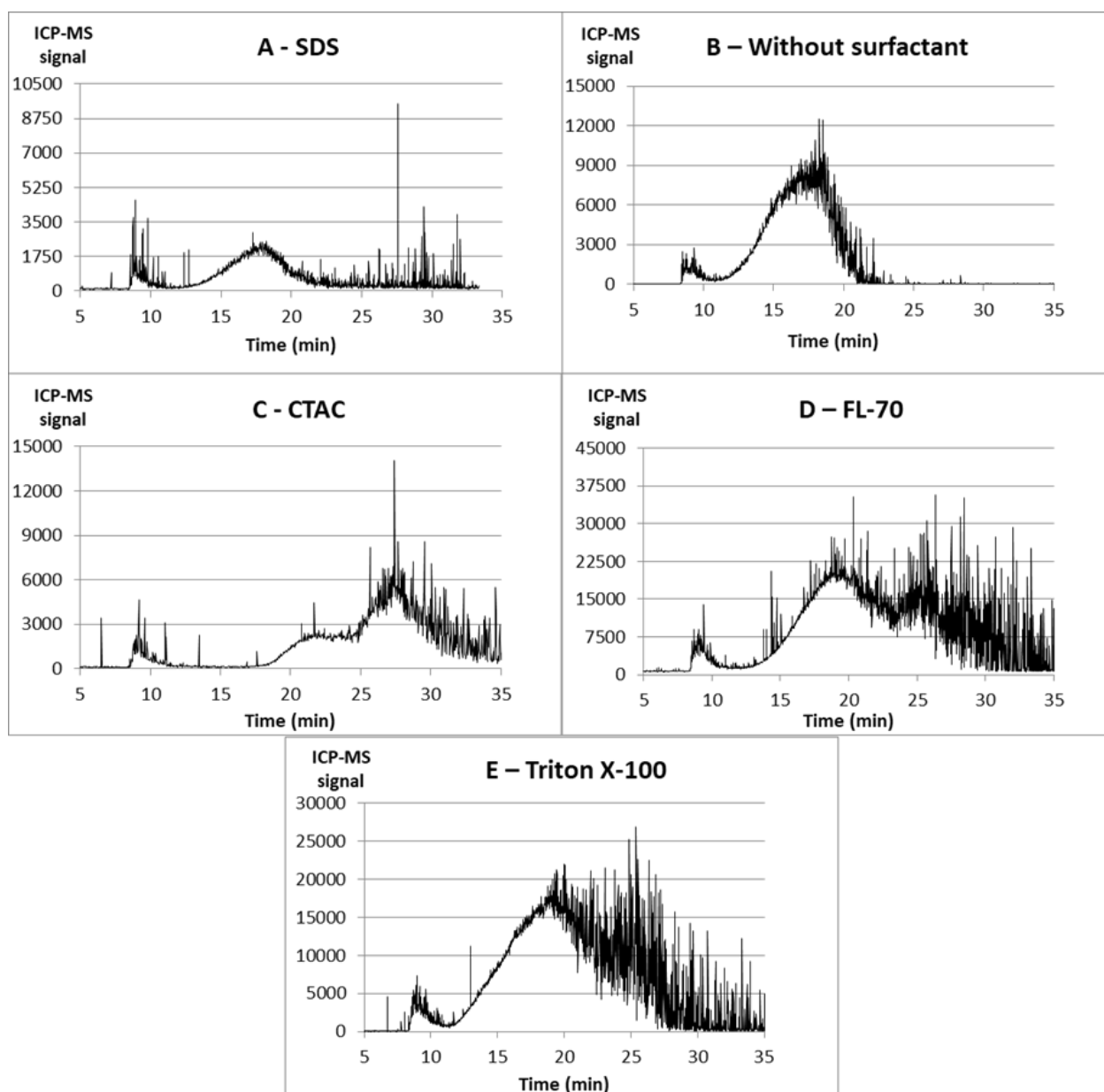


Figure 58 : Signal ICP-MS obtenu lors de l'analyse de NM-102 avec différentes phases mobiles : SDS (A), sans tensioactif (B), CTAC (C), FL-70 (D) et Triton X-100 (E)

En général, les fractogrammes MALS et ICP-MS sont similaires, excepté pour la condition avec le SDS où deux pics sont observés avec le MALS (Figure 57A) et un pic avec l'ICP-MS (Figure 58A). Cette différence peut être expliquée par le fait que le MALS est plus sensible aux agglomérats et aux particules plus grosses, tandis que l'ICP-MS ne détecte seulement que le titane qui compose la particule. Pour les autres conditions testées sur l'ICP-MS (Figure 58B-E), deux phases se distinguent sur les fractogrammes. La première partie de la courbe (< 24 min) est peu bruitée tandis que sur la deuxième partie (24-35 min), le signal est beaucoup plus bruité avec des tailles de particules détectées plus variées que dans la première partie. Cette dernière partie correspond à la fin de l'étape d'élution où le flux croisé est nul, ce qui signifie que les populations observées proviendraient des agglomérats

et des plus grosses particules qui étaient adsorbés sur la membrane et qui se seraient désorbés. La séparation n'a donc pas été optimale et il aurait fallu allonger le temps de l'étape avec un flux croisé non nul ou diminuer le flux primaire.

En ce qui concerne les tailles des particules mesurées par le MALS, les conditions ont été comparées à partir de deux valeurs du diamètre : le diamètre de giration le plus fréquent ainsi que le diamètre de giration mesuré à 10% de la hauteur du pic. Le [Tableau 15](#) répertorie ces différents résultats.

Tableau 15 : Différents types de diamètre de giration du NM-102 mesurés pour chaque condition : diamètre le plus fréquent et diamètre à 10% de la hauteur du pic.

Condition	Sans tensioactif	SDS	CTAC ^a	Triton X-100	FL-70
Diamètre de giration le plus fréquent (nm)	299 ± 27	84 ± 4	224	272 ± 106	305 ± 54
Diamètre équivalent à 10% de la hauteur du pic (nm)	132 ± 12	62 ± 4	196	67 ± 16	55 ± 10

^a Pas d'écart type suite à un problème d'acquisition du MALS

Concernant la condition avec le SDS, les NPs sont assez bien dispersées avec un diamètre le plus fréquent à 84 nm et à 62 nm à 10% de la hauteur du pic. Cette valeur reste cependant supérieure à celle déterminée par le JRC avec le MET qui est de 21 ± 10 nm ([Rasmussen et al., 2014](#)), ce qui traduit une agglomération des particules. Le triton X-100 et le FL-70 permettent d'obtenir des résultats similaires, avec des particules peu agglomérées dans la première partie du pic avec des diamètres respectifs de 67 et 55 nm. Néanmoins, une forte fraction d'agglomérats est présente avec un diamètre le plus fréquent de 272 nm pour le Triton X-100 et 305 nm pour le FL-70. Ces derniers résultats confortent l'idée de devoir allonger le temps de l'étape d'élution avec un flux croisé non nul afin de mieux séparer les NPs dispersées des agglomérats. Les conditions sans tensioactif et avec CTAC fournissent respectivement une valeur de diamètre le plus fréquent de 299 et 224 nm. Ces valeurs sont significativement supérieures au diamètre du NM-102, ce qui signifie que les NPs sont largement agglomérées. Même à 10% de la hauteur du pic, les conditions sans tensioactif et avec CTAC fournissent des diamètres élevés, respectivement, 132 et 196 nm. Par conséquent, ces conditions ne semblent pas adaptées pour l'analyse par AF4-ICP-MS. Les valeurs de potentiel zêta des NPs ([Tableau 11](#)) sont similaires en absolu pour les cinq conditions favorisant les répulsions électrostatiques avec une valeur $\approx \pm 30$ mV, ce qui devrait permettre une bonne dispersion ([Bihari et al., 2008](#)) des NPs. Etant donné que les diamètres de giration obtenus avec le MALS varient significativement, cela signifie que le choix de la nature chimique de l'éluant semble prépondérant pour bien disperser ces particules plutôt que les interactions électrostatiques.

En conclusion, le SDS, le Triton X-100 et le FL-70 sont les tensioactifs les plus intéressants à employer pour l'analyse de NPs de TiO₂ en AF4-ICP-MS puisqu'avec ces conditions, ils permettent d'obtenir une fraction de NPs peu agglomérées.

III.4.2.2 Détermination du taux de récupération des particules

Les taux de récupération des particules obtenus suivant la méthode décrite dans le [paragraphe III.4.1.4](#) sont présentés dans la [Figure 59](#).

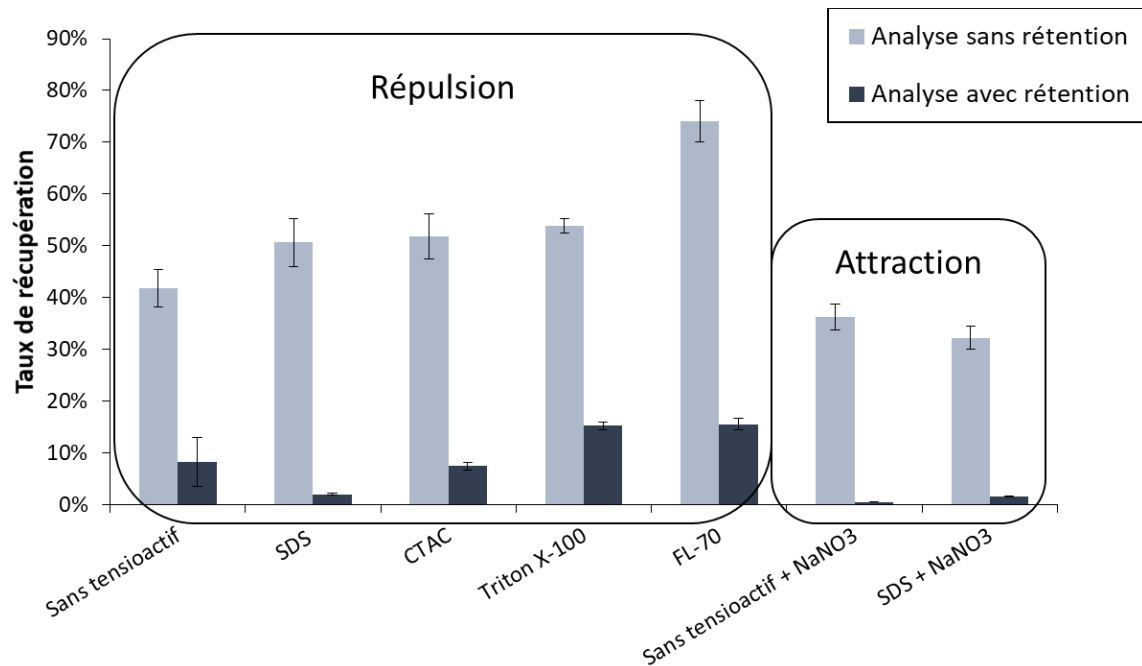


Figure 59 : Taux de récupération du NM-102 pour une analyse sans rétention et avec rétention. Répulsion = même signe de potentiel zêta des NPs et de la membrane. Attraction = signe opposé du potentiel zêta des NPs et de la membrane

III.4.2.2.1 Comparaison analyse sans rétention - analyse avec rétention

Les taux de récupération ne dépassent pas les 80% pour les analyses sans rétention. Il est donc probable d'avoir des interactions entre les particules et la membrane comme l'adsorption ou la perméation (passage à travers la membrane) sans flux croisé. Il est également possible que l'étape de passivation de la membrane ne soit pas suffisante et qu'il soit nécessaire de réaliser plus d'analyses de NPs en amont de l'analyse comme l'ont montré plusieurs études ([Benincasa and Giddings, 1992](#) ; [Ulrich et al., 2012](#)). Dans la publication de [Benincasa et Giddings \(1992\)](#), il suffit de deux injections de polystyrène pour avoir un signal maximum tandis que pour [Ulrich et al. \(2012\)](#), le taux de récupération

semble se stabiliser lors de la quatrième analyse de NPs d'Ag. Avec les NPs de TiO₂ il semble nécessaire de faire plus de trois analyses de NPs en amont pour avoir un meilleur taux de récupération. Par conséquent, ces résultats mettent en avant l'importance de mesurer précisément le taux de récupération et de ne pas le considérer automatiquement comme égal à 100% pour une analyse sans rétention.

Les résultats présentés en [Figure 59](#) montrent également que le taux de récupération diminue significativement dans le cas des analyses avec rétention. Cette observation était attendue puisque l'étape de concentration-relaxation et le flux croisé favorisent le rapprochement des NPs vers la membrane et augmente ainsi les probabilités d'adsorption. Les valeurs de taux de récupération pour une analyse avec rétention sont très faibles et ne dépassent pas les 20%. Cette petite fraction peut alors remettre en question la représentativité de l'échantillon lors d'une analyse par AF4-ICP-MS. Ces faibles taux de récupération peuvent provenir d'une part, du programme d'élution qui n'est pas optimisé et d'autre part de la méthode de calcul. En effet, l'analyse sans rétention ne permet pas d'obtenir un taux de récupération de 100% ce qui minimise donc le taux de récupération des analyses avec rétention.

III.4.2.2.2 Évaluation des conditions favorisant les attractions électrostatiques

Sur les sept conditions testées, deux d'entre elles permettent d'avoir des signes opposés de potentiel zêta des particules et de la membrane, ce qui favorise l'attraction électrostatique particule-membrane. L'ajout de NaNO₃ dans une phase mobile sans tensioactif ou avec du SDS permet d'obtenir des particules avec un potentiel zêta négatif et une membrane avec un potentiel zêta positif. D'après les résultats de la [Figure 59](#), ces deux conditions fournissent le taux de récupération de NPs le plus faible, que ce soit pour les analyses avec ou sans rétention. Cela confirme que les interactions électrostatiques ont un impact significatif sur la séparation des particules en AF4 comme l'ont observé [Dubascoux et al. \(2008\)](#) en travaillant avec plusieurs phases mobiles et avec des concentrations croissantes du nitrate d'ammonium (NH₄NO₃). Ils observent une diminution du taux de récupération avec l'augmentation de la concentration du sel, ce qui est comparable avec le NaNO₃ dans notre cas. Par conséquent, il semble déconseillé d'apporter des sels à l'éluant afin de diminuer l'adsorption des NPs sur la membrane.

III.4.2.2.3 Évaluation des conditions favorisant les répulsions électrostatiques

En regardant les cinq autres conditions qui présentent un signe de potentiel zêta identique pour les particules et la membrane, le taux de récupération le plus élevé ($74 \pm 4\%$) est obtenu avec l'éluant

contenant du FL-70 dans le cas d'une analyse sans rétention. Pour les analyses avec rétention, le FL-70 et le Triton X-100 fournissent les meilleurs taux de récupération, aux alentours de 16%.

Le taux de récupération le plus faible est obtenu avec l'utilisation du tensioactif SDS. [Meisterjahn et al. \(2016\)](#) ont également obtenu un meilleur taux de récupération en utilisant du FL-70 et un taux de récupération nul avec du SDS pour des NPs d'or. Le SDS peut diminuer l'efficacité de nébulisation ([Schmidt et al., 2011](#) ; [López-heras et al., 2014](#)) néanmoins l'étalonnage avec le NM-102 a également été fait avec du SDS, ce qui permet de s'affranchir de l'impact sur l'efficacité de nébulisation. [López-heras et al. \(2014\)](#) utilisent du méthanol pour pallier la diminution de l'efficacité de nébulisation, ce qui pourrait être envisagé pour de futures optimisations avec ce tensioactif. Cependant, ils travaillent avec une concentration élevée de SDS (0,2% m/m) proche de la CMC (0,24%), ce qui peut accentuer l'impact du SDS sur la nébulisation. [Correia et al. \(2018\)](#) obtiennent de meilleurs taux de récupération de NPs de TiO₂ avec le SDS de l'ordre de 89% avec une concentration plus faible en SDS (0,05% m/m) que celle utilisée dans ces travaux (0,12% m/m).

Enfin, les conditions sans tensioactif et avec le CTAC sont similaires, comme c'était le cas pour les résultats des tailles mesurées. Ces deux conditions ne seront donc pas retenues puisque leurs résultats concernant le diamètre sont moins pertinents et le taux de récupération n'est pas plus intéressant que celui avec le Triton X-100 ou le FL-70.

Finally, the AF4-ICP-MS tests have allowed identifying several conditions of eluent interesting for the TiO₂ NPs as Triton X-100, FL-70 and SDS. However, the measured diameters correspond to agglomerates and the calculated recovery rates were low. This means that the surfactants used do not currently allow obtaining satisfactory conditions to characterize the NPs by AF4-ICP-MS. Thus, the studies need to be continued by optimizing the elution program as well as the composition of the eluent (surfactant concentration and pH) in order to improve the dispersion and the recovery rate of the TiO₂ NPs.

III.5 Bilan

Cette étude préliminaire avait pour objectif de caractériser le matériau de référence NM-102, contenant des nanoparticules de TiO_2 afin de l'utiliser pour étudier et optimiser la méthode AF4-ICP-MS. Les charges de surface de ce matériau et des membranes AF4 ont été étudiées en fonction du pH, de la force ionique et de la présence de tensioactif dans l'éluant, afin d'évaluer les potentielles interactions électrostatiques pouvant être mises en jeu durant la séparation des particules dans le système AF4.

Concernant la caractérisation du NM-102, les résultats obtenus sont cohérents avec ceux de la littérature et ont conforté le choix d'utiliser ce matériau pour développer la méthode AF4-ICP-MS pour l'analyse de NPs de TiO_2 de l'additif alimentaire E171.

Les mesures de potentiel zêta des NPs et des membranes pour plusieurs conditions d'éluant a permis de dresser une base de données qui renseigne sur la charge de surface des NPs ou membranes en fonction du pH, de la force ionique ou de la présence de tensioactif de l'éluant. Parmi les paramètres évalués, la force ionique joue un rôle important au niveau du potentiel zêta de la membrane et il est conseillé d'avoir une force ionique faible pour garder la charge de surface de la membrane négative. Cela a permis par la suite de choisir cinq conditions d'éluant favorisant les répulsions électrostatiques et deux conditions favorisant les attractions électrostatiques pour l'analyse AF4-ICP-MS.

Bien que les interactions électrostatiques soient peu connues en AF4-ICP-MS, cette étude a mis en avant l'influence des répulsions et attractions électrostatiques sur le taux de récupération des NPs par l'ajout de NaNO_3 qui conduit à un changement du signe du potentiel zêta de la membrane. Grâce aux différents essais qui ont été menés avec différents tensioactifs, les résultats obtenus ont montré que le SDS permet d'avoir la meilleure dispersion avec une population de NPs de taille < 90 nm. Le Triton X-100 et le FL-70 permettent également d'obtenir une petite fraction de NPs peu agglomérées, avec des diamètres respectifs de 67 et 55 nm. Concernant le taux de récupération, ce sont les tensioactifs Triton X-100 et FL-70 qui semblent les plus intéressants. Néanmoins, le FL-70 est une solution contenant plusieurs composés et il est difficile de bien comprendre son action sur les NPs. Il est supposé que l'action de l'EDTA du FL-70 soit prépondérante puisque les potentiels zêta mesurés sont similaires avec ceux retrouvées dans littérature pour différents types de NPs en présence d'EDTA.

D'après ces travaux, les trois meilleures conditions d'éluant pour l'analyse AF4-ICP-MS sont le FL-70, le SDS et le Triton X-100 sans ajout de sels. Toutefois, les taux de récupération sont encore faibles (< 20%) et les diamètres mesurés restent supérieurs aux diamètres observés par MET, ce qui signifie que les NPs sont encore agglomérées. C'est pourquoi il sera nécessaire de poursuivre cette étude.

En termes de perspectives, il est important de mener des travaux d'optimisation du programme d'éluion afin d'améliorer la séparation et le taux de récupération des NPs. L'optimisation de la concentration de ces tensioactifs est également nécessaire, pour améliorer le taux de récupération. Il pourrait être également envisagé d'utiliser seulement l'EDTA pour complexer les NPs afin de vérifier l'influence du FL-70 et éviter leur adsorption sur la membrane AF4. Un autre axe de travail pourrait être d'utiliser plusieurs tensioactifs. C'est-à-dire, de disperser les NPs dans un premier tensioactif, comme le SDS et d'utiliser un éluant différent, comme le triton X-100, qui permet d'obtenir l'un des meilleurs taux de récupération. Enfin, il sera également nécessaire de travailler avec d'autres types de NPs de TiO_2 , afin de confirmer la justesse de la méthode pour un panel plus large de matériaux contenant des NPs de TiO_2 comme l'additif alimentaire E171.

En conclusion, compte tenu que la thèse est partagée en deux grands objectifs, avec une partie réalisée au CEA et l'autre à l'Anses, ces travaux sur l'AF4-ICP-MS n'ont pu totalement aboutir mais ont permis de donner des pistes pour une optimisation plus poussée de la méthode AF4-ICP-MS. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal Food Analytical Methods dont l'article est actuellement en révision (Cf. [Annexe C](#)).

Chapitre IV

Optimisation du traitement de données de la méthode « Single particle »-ICP-MS

IV.1 Sommaire

Chapitre IV Optimisation du traitement de données de la méthode « Single particle »-ICP-MS
Error! Bookmark not defined.

IV.1	Sommaire	Error! Bookmark not defined.
IV.2	Évolution du traitement de données en Sp-ICP-MS.....	Error! Bookmark not defined.
IV.3	Optimisation de la feuille de calcul du RIKILT	Error! Bookmark not defined.
IV.3.1	Présentation de la feuille de calcul du RIKILT.....	Error! Bookmark not defined.
IV.3.2	Développement d'une feuille de calcul interne	Error! Bookmark not defined.
IV.4	Traitement des données : Comparaisons entre le module npQuant (Thermo) et la méthode de calcul interne	Error! Bookmark not defined.
IV.4.1	Identification des paramètres à comparer.....	Error! Bookmark not defined.
IV.4.2	Méthode de comparaison	Error! Bookmark not defined.
IV.4.3	Résultats et discussion	Error! Bookmark not defined.
IV.4.4	Conclusion	Error! Bookmark not defined.
IV.5	Bilan	Error! Bookmark not defined.

Après avoir étudié la méthode AF4-ICP-MS, le [Chapitre IV](#) et [V](#) présentent les travaux menés sur la méthode Sp-ICP-MS, dont le principe a été présenté dans le [Chapitre II \(paragraphe II.8\)](#). Pour tous ces travaux, le NM-102 n'a pas pu être utilisé comme pour l'AF4-ICP-MS car le diamètre des NPs (≈ 20 nm) est plus faible que la plupart des limites de détection en taille (LDt) obtenues avec la méthode Sp-ICP-MS. Par conséquent, le Matériau de Référence (MR) NM-100 sera utilisé. Tout comme le NM-102, le NM-100 contient des NPs de TiO_2 de structure *anatase* et dont les diamètres sont plus élevés et polydisperses (20-600 nm). Il a aussi été caractérisé par le Centre commun de recherche (JRC) de la Commission européenne ([Rasmussen et al., 2014](#)).

Ce chapitre est dédié à l'optimisation du traitement des données obtenues par Sp-ICP-MS, qui est actuellement un défi sur plusieurs paramètres comme la détermination du seuil bruit de fond-particule ou le calcul de l'efficacité de transport.

La première partie présentera succinctement l'évolution du traitement de données en Sp-ICP-MS, avec notamment, l'intérêt d'utiliser un temps d'acquisition plus faible. Puis, la seconde partie présentera les travaux qui ont été menés pour améliorer un protocole de traitement de données. Enfin, ce traitement de données sera comparé aux capacités du logiciel constructeur.

IV.2 Évolution du traitement de données en Sp-ICP-MS

Dans la littérature, les travaux de [Pace et al. \(2011\)](#) et de [Laborda et al. \(2011\)](#) ont permis d'accroître l'intérêt pour la méthode Sp-ICP-MS. Dans leur publication, ils présentent la théorie de la méthode Sp-ICP-MS en détail et de nouvelles méthodes de calcul de l'efficacité de transport (TE), l'un des paramètres les plus critiques. Suite à ces travaux, l'institut du RIKILT au Pays-Bas a développé une feuille de calcul permettant d'automatiser le traitement de données et l'a mise à disposition en libre accès ([Peters et al., 2014a, 2015](#) ; [RIKILT Wageningen, 2015](#)). Cette feuille de calcul est adaptée pour des temps d'acquisition suffisamment élevés ($Dt > 3$ ms). En utilisant des composants électroniques et/ou des ICP-MS de dernière génération qui n'étaient pas accessibles à la plupart des laboratoires, des études ont montré les avantages que procure une acquisition amplifiée du signal à une fréquence plus élevée ([Engelhard, 2011](#) ; [Olesik and Gray, 2012](#) ; [Cornelis and Hassellöv, 2014](#)). En effet, peu de temps après, plusieurs études ([Hineman and Stephan, 2014](#) ; [Montaño et al., 2014](#) ; [Abad-álvaro et al., 2016](#)) ont mis en avant le fait que des Dt plus faibles, de l'ordre de la microseconde (10-100 μ s), peuvent augmenter le rapport signal sur bruit et ainsi améliorer les limites de détection en taille (LDt) des méthodes Sp-ICP-MS. Les constructeurs d'équipements se sont appuyés sur ces différentes études et sur la feuille de calcul du RIKILT pour développer des logiciels additionnels intégrés aux ICP-MS ([Thermo Scientific, 2016](#)). Le premier avantage est de pouvoir traiter les données directement plutôt que d'exporter et utiliser des feuilles de calcul internes. Perkin Elmer a été le premier constructeur d'ICP-MS à proposer un logiciel capable de traiter automatiquement des données Sp-ICP-MS à des Dt de l'ordre de 100 μ s pour l'analyse de NPs d'argent ([Hineman and Stephan, 2014](#)), suivi par d'autres constructeurs comme Agilent ([Nunez et al., 2016](#)) et Thermo Fisher Scientific ([Kutscher et al., 2016](#)). Actuellement, le traitement de données en Sp-ICP-MS n'est pas harmonisé, certaines études utilisant leur propre feuille de calcul interne, inaccessible aux autres équipes de recherche, tandis que d'autres utilisent les logiciels constructeurs qui sont souvent des boîtes noires ([Loeschner et al., 2018](#) ; [Peters et al., 2018](#) ; [Witzler et al., 2018](#)).

Temps d'acquisition (Dt)

Ce paramètre sera largement détaillé car c'est celui qui a le plus fait évoluer les analyses Sp-ICP-MS. Les analyses Sp-ICP-MS conventionnelles utilisent des Dt compris entre 3 et 10 ms. Avec ces Dt, il est supposé que, lorsqu'un pic de signal est obtenu, il est assimilé à une particule complète (Figure 60A). Comme la plage de temps du nuage d'ions d'une particule est estimée entre 200 et 500 μ s (Olesik and Gray, 2012), plusieurs biais peuvent survenir au cours de cette période : (i) deux particules peuvent être détectées dans un même Dt, ce qui entraînera une surestimation de la taille (Figure 60B) ; (ii) seulement une fraction de particule peut être détectée, ce qui provoquera une sous-estimation de la taille (Figure 60C) ; (iii) si la concentration en espèces ioniques est trop importante, le bruit de fond sera plus élevé et dégradera la limite de détection en taille (LDt) (Figure 60D) (Meermann and Nischwitz, 2018).

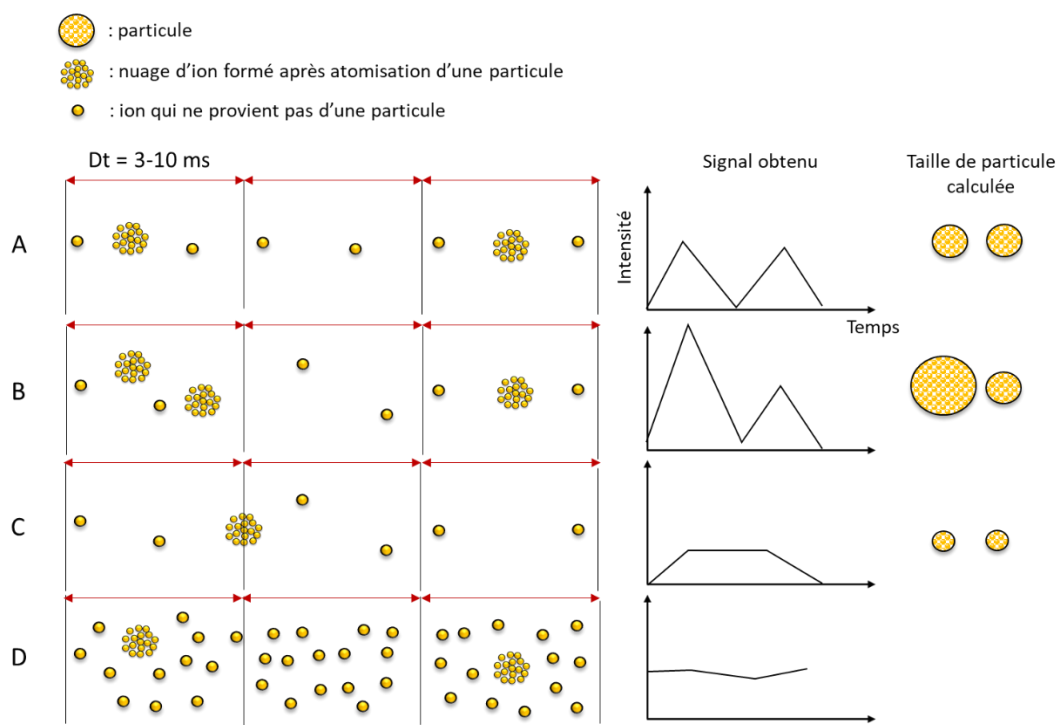


Figure 60 : Différents cas retrouvés en analyse Sp-ICP-MS conventionnelle : (A) Analyse idéale, (B) deux particules détectées dans un Dt, (C) fraction de particule détectée et (D) forte concentration de l'analyte sous forme ionique

Afin de minimiser ces biais, il est nécessaire de diluer les échantillons de manière adaptée pour n'envoyer qu'une seule particule sur un Dt donné (Meermann and Nischwitz, 2018). L'étude de Mitrano et al. (2012) a permis de déterminer un Dt optimal de 10 ms. Toutefois, il peut s'avérer avantageux d'utiliser des Dt plus faibles, entre 10 et 100 μ s, car la fraction ionique contribuera nettement moins au bruit de fond, permettant d'obtenir de meilleures limites de détection. Cela

permet aussi d'éviter les étapes de dilution supplémentaires de l'échantillon. L'inconvénient majeur lié à l'utilisation de faibles Dt est la détection fractionnée systématique des particules puisque le Dt est inférieur à la plage de temps de passage de la particule (200-500 μ s) qui nécessite un traitement des données adapté. Dans le cas classique du traitement de données en Sp-ICP-MS, plusieurs signaux consécutifs (supérieurs au seuil bruit de fond-particule) seront considérés comme plusieurs particules. La [Figure 61](#), illustre un traitement de données non-adapté/adapté lors de l'acquisition de plusieurs signaux consécutifs d'une même particule.

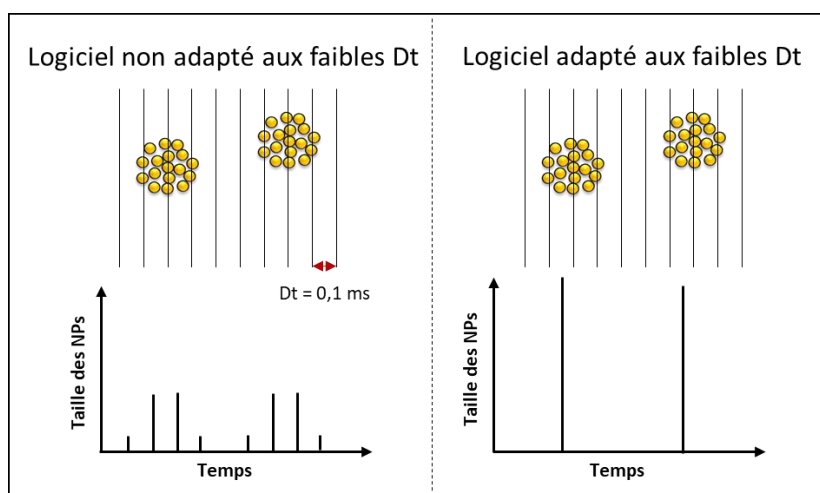


Figure 61 : Impact du type de traitement de données sur des résultats en taille de NPs

Pour utiliser des Dt entre 10 et 100 μ s, inférieurs à la plage de temps d'une particule, il est nécessaire (i) d'avoir un temps mort du détecteur (temps entre deux acquisitions) le plus faible possible afin que la perte d'informations durant ce temps mort soit négligeable ([Hineman and Stephan, 2014](#)) et (ii) de disposer de logiciels adaptés au traitement des données, de façon à pouvoir recomposer le signal de la particule, comme le montre la [Figure 61](#). Les logiciels et les performances techniques des ICP-MS ont donc évolués simultanément, entraînant une amélioration de l'acquisition des données, avec une résolution temporelle très élevée ([Engelhard, 2011](#) ; [Olesik and Gray, 2012](#) ; [Cornelis and Hassellöv, 2014](#)).

IV.3 Optimisation de la feuille de calcul du RIKILT

IV.3.1 Présentation de la feuille de calcul du RIKILT

La feuille de calcul développée par le RIKILT est en libre accès et permet de traiter des données brutes issues d'une analyse conventionnelle par Sp-ICP-MS, après les avoir exportées sous Excel. Elle est constituée de deux onglets, le premier est utilisé pour le calcul du TE et le deuxième (présenté dans la [Figure 62](#)) est dédié au traitement des données Sp-ICP-MS. On y distingue trois graphiques, le signal brut ([Figure 62A](#)), les signaux triés par fréquence ([Figure 62B](#)) et la distribution en taille des particules ([Figure 62C](#)). Ces graphiques sont obtenus à partir des données brutes de l'ICP-MS, qui sont exportées et insérées dans un tableau des données brutes de la feuille de calcul ([Figure 62D](#)). L'utilisateur doit renseigner les paramètres d'analyse tels que le TE ou le seuil bruit de fond-particule ([Figure 62E](#)) afin que les résultats de l'analyse se mettent à jour ([Figure 62F](#)). Ce dernier tableau fournit la concentration en nombre de particules, la concentration en masse, le diamètre moyen ainsi que la concentration ionique. Pour obtenir ces résultats, le traitement des données s'opère entre les colonnes « B » et « L » du fichier Excel. Cette partie est masquée afin de rendre l'interface plus confortable.

Sur la [Figure 63](#), il est possible de voir les colonnes non masquées dédiées au traitement des données brutes. Une fois les données brutes de l'ICP-MS insérées dans le tableau ([Figure 63A](#)), les colonnes B et C permettent de trier chaque signal en les identifiant comme bruit de fond ([Figure 63B](#)) ou particule ([Figure 63C](#)). Cette distinction peut se faire à l'aide du seuil bruit de fond-particule qui est indiqué par l'utilisateur. Les colonnes « D » ([Figure 63D](#)) et « E » ([Figure 63E](#)) correspondent respectivement aux conversions du signal des NPs en masse puis en diamètre en utilisant notamment les [Équations 7 et 8](#) ([paragraphe II.9.4.2](#)). Enfin, les dernières colonnes ([Figure 63F](#)) sont utilisées pour répertorier la fréquence des diamètres et représenter une distribution en taille. Les données ([Figure 63G](#)) sont des paramètres statistiques (moyenne, écart-type, médiane...) pour les différentes colonnes (B, C, D et E) permettant d'extraire les résultats d'intérêts (diamètre moyen, nombre de particules analysées...).

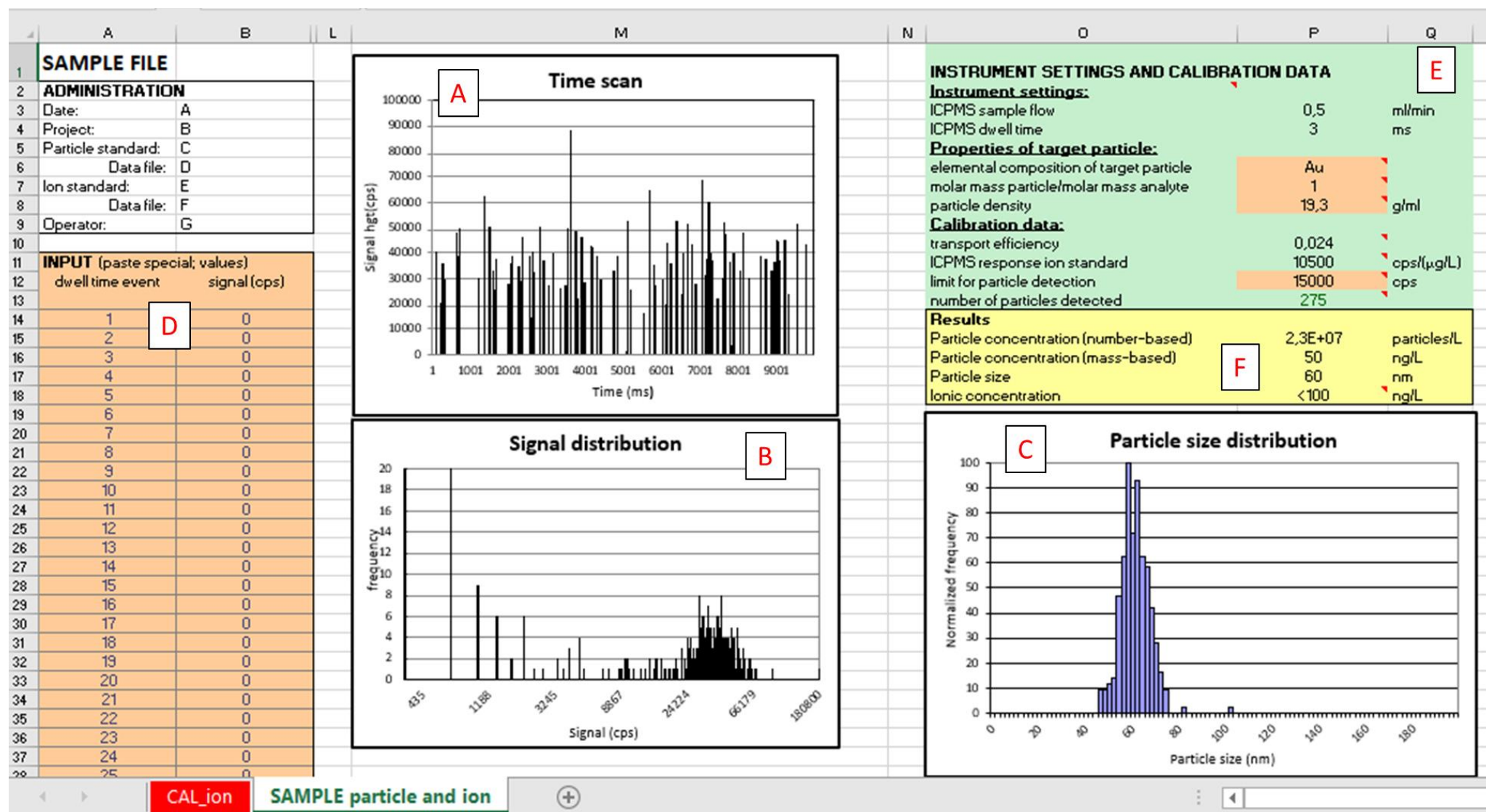


Figure 62 : Extrait de la feuille de calcul en accès libre du RIKILT

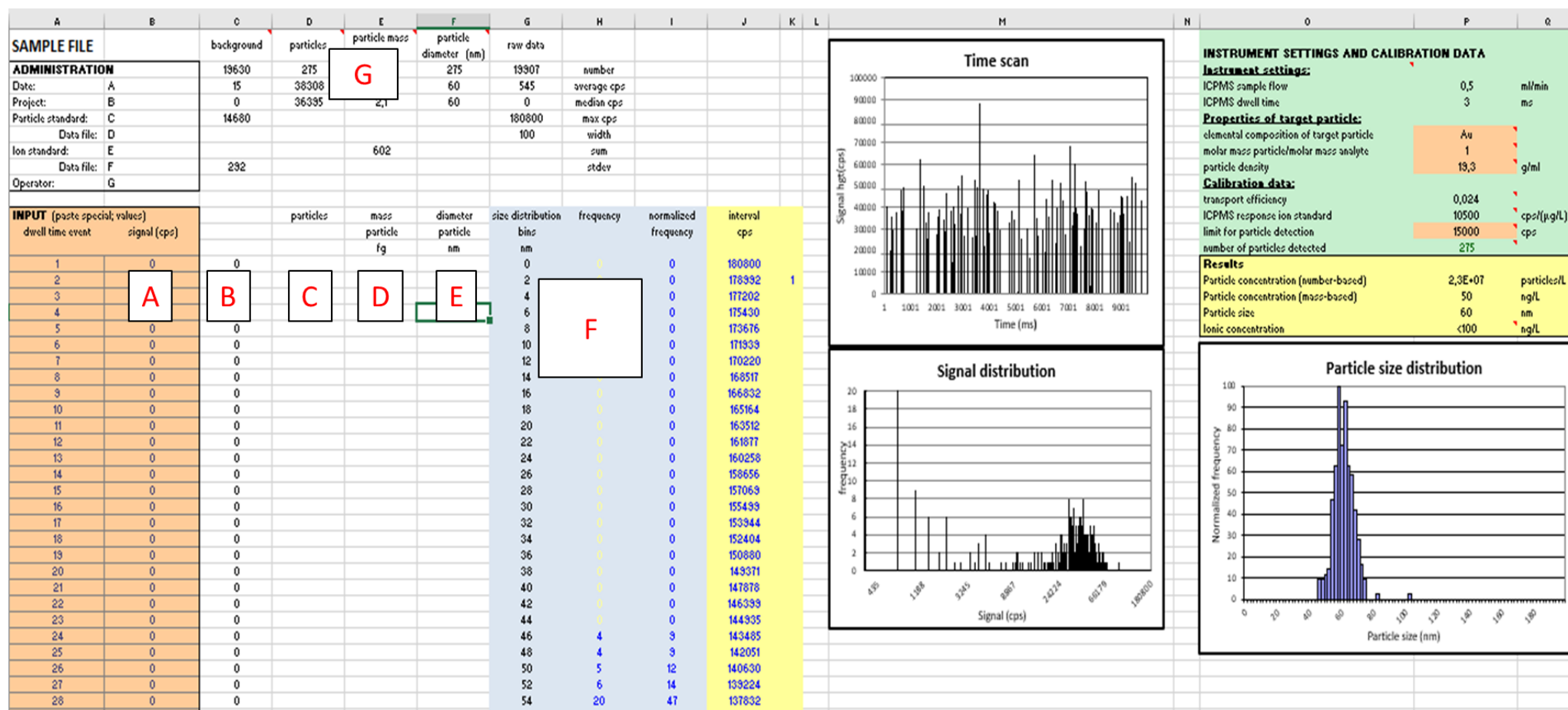


Figure 63 : Interface complète de la feuille de calcul en accès libre du RIKILT

Bien que la feuille de calcul du RIKILT soit simple d'utilisation, celle-ci est limitée sur plusieurs points tels que le graphique de la distribution en taille ([Figure 62C](#)) par exemple. Les axes de ce graphique sont définis avec un maximum à 200 nm. Par conséquent, tout échantillon contenant des particules avec un diamètre > 200 nm aura une distribution en taille incomplète. Ce choix a probablement été fait pour se concentrer sur la fraction nanoparticulaire du matériau. Une autre limite concerne le seuil bruit de fond-particule qui doit être déterminé par l'utilisateur alors que [Pace et al. \(2011\)](#) proposaient un calcul itératif à partir des données brutes (voir [paragraphe II.9.4.1](#)). Une seule méthode de calcul de l'efficacité de transport est proposée (méthode basée sur la concentration des particules) alors qu'une deuxième méthode existe (méthode basée sur la masse des particules) et qu'elle peut fournir des résultats significativement différents ([Aznar et al., 2017](#) ; [Geertsens et al., 2018](#)). Enfin, des paramètres importants pour ce type d'analyse, comme la fraction nanoparticulaire et la LDt, ne sont pas accessibles. La fraction nanoparticulaire peut être un critère pour définir un nanomatériau ([Commission européenne, 2011](#)) et la LDt permet de juger la performance de la méthode d'analyse. C'est pourquoi des modifications majeures ont été apportées à cette feuille de calcul au cours de cette thèse, afin de la rendre plus complète et plus polyvalente.

IV.3.2 Développement d'une feuille de calcul interne

IV.3.2.1 Calcul du seuil bruit de fond-particule

Dans la feuille de calcul RIKILT, le seuil bruit de fond-particule doit être indiqué par l'utilisateur et donc déterminé de façon arbitraire, alors qu'il peut être déterminé en utilisant la méthode de [Pace et al. \(2011\)](#). Un nouvel onglet a donc été créé afin de déterminer automatiquement le seuil bruit de fond-particule via la méthode itérative suggérée par [Pace et al. \(2011\)](#). La [Figure 64](#) permet de voir un exemple de données brutes utilisées pour calculer le seuil bruit de fond-particule.

5	n x StD									
6	4	Raw data	Correction 1	Correction 2	Correction 3	Correction 4	Correction 5	Correction 6	Correction 7	Cor
7		5 501	5501	5501	5501	5501	5501	5501	5501	
49		8 103	8103	8103	8103	8103	8103	8103	8103	
50		7 902	7902	7902	7902	7902	7902	7902	7902	
51		31 540	31540	31540	31540					
52		7 802	7802	7802	7802	7802	7802	7802	7802	
53		8 103	8103	8103	8103	8103	8103	8103	8103	
57		7 602	7602	7602	7602	7602	7602	7602	7602	
58		7 902	7902	7902	7902	7902	7902	7902	7902	
59		40 867	40867	40867	40867					
60		6 802	6802	6802	6802	6802	6802	6802	6802	
61		8 903	8903	8903	8903	8903	8903	8903	8903	
62		7 102	7102	7102	7102	7102	7102	7102	7102	
63		8 503	8503	8503	8503	8503	8503	8503	8503	
64		190 864	190864							
65		8 203	8203	8203	8203	8203	8203	8203	8203	
66		6 101	6101	6101	6101	6101	6101	6101	6101	
72		7 102	7102	7102	7102	7102	7102	7102	7102	
73		8 003	8003	8003	8003	8003	8003	8003	8003	
74		6 101	6101	6101	6101	6101	6101	6101	6101	
75		148 375	148375	148375						
76		6 502	6502	6502	6502	6502	6502	6502	6502	
77		7 602	7602	7602	7602	7602	7602	7602	7602	
78		6 101	6101	6101	6101	6101	6101	6101	6101	
79		179 288	179288							
80		9 504	9504	9504	9504	9504	9504	9504	9504	
88		6 302	6302	6302	6302	6302	6302	6302	6302	
89		8 503	8503	8503	8503	8503	8503	8503	8503	
90		7 402	7402	7402	7402	7402	7402	7402	7402	
91		1 109 021								
92		7 102	7102	7102	7102	7102	7102	7102	7102	
93		6 902	6902	6902	6902	6902	6902	6902	6902	
97		7 902	7902	7902	7902	7902	7902	7902	7902	
98		8 403	8403	8403	8403	8403	8403	8403	8403	
99		45 583	45583	45583	45583					
100		8 703	8703	8703	8703	8703	8703	8703	8703	
101		6 402	6402	6402	6402	6402	6402	6402	6402	
102		7 102	7102	7102	7102	7102	7102	7102	7102	
103		5 701	5701	5701	5701	5701	5701	5701	5701	

Figure 64 : Extrait de la feuille de calcul interne. Onglet concernant le calcul du seuil bruit de fond-particule avec en rouge les corrections itératives.

La colonne « Raw data » (la plus à gauche) représente les données brutes. Directement à sa droite se trouve la colonne (« Correction 1 ») dont les données supérieures au critère moyenne + $n \times ET$ sont

supprimées ; le paramètre n est fixé par l'utilisateur ($n = 4$ dans le cas de la [Figure 64](#)). Une nouvelle correction est appliquée à ces nouvelles données et les données répondant au critère $< \text{moyenne} + 4 \times \text{ET}$ sont notées dans la colonne « Correction 2 ». Cette correction est répétée à chaque nouvelle série de données jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de valeurs au-delà du seuil bruit de fond-particule, comme c'est le cas dans la colonne « Correction 7 ». Les données éliminées, identifiées comme provenant d'une particule, sont représentées dans les cercles rouges de la [Figure 64](#). Le seuil bruit de fond-particule est alors automatiquement transmis à l'onglet principal pour le traitement des signaux des particules. Le nombre d'écart-type ($n \times \text{ET}$) est un paramètre qui n'est pas fixe car dans certaines études, il a été mis en avant qu'utiliser le critère $3 \times \text{ET}$ n'était pas systématiquement le plus pertinent ([Tuoriniemi et al., 2012](#)).

IV.3.2.2 *Étalonnage avec des solutions d'analyte sous forme ionique*

La méthode Sp-ICP-MS nécessite de faire plusieurs étalonnages. Un premier pour déterminer le TE ([paragraphe II.9.1.2](#)) et un deuxième pour quantifier le diamètre des NPs ([paragraphe II.9.4.2](#)). Dans la feuille de calcul du RIKILT, le premier étalonnage n'est pas proposé car le TE est calculé uniquement avec la méthode basée sur la concentration en particules. Pour le deuxième étalonnage, la feuille du RIKILT nécessite de renseigner directement la sensibilité. Un onglet a donc été ajouté à la feuille de calcul afin de calculer automatiquement la sensibilité de l'étalonnage obtenu à partir d'une solution ionique de l'analyte étudié ([Figure 65](#)).

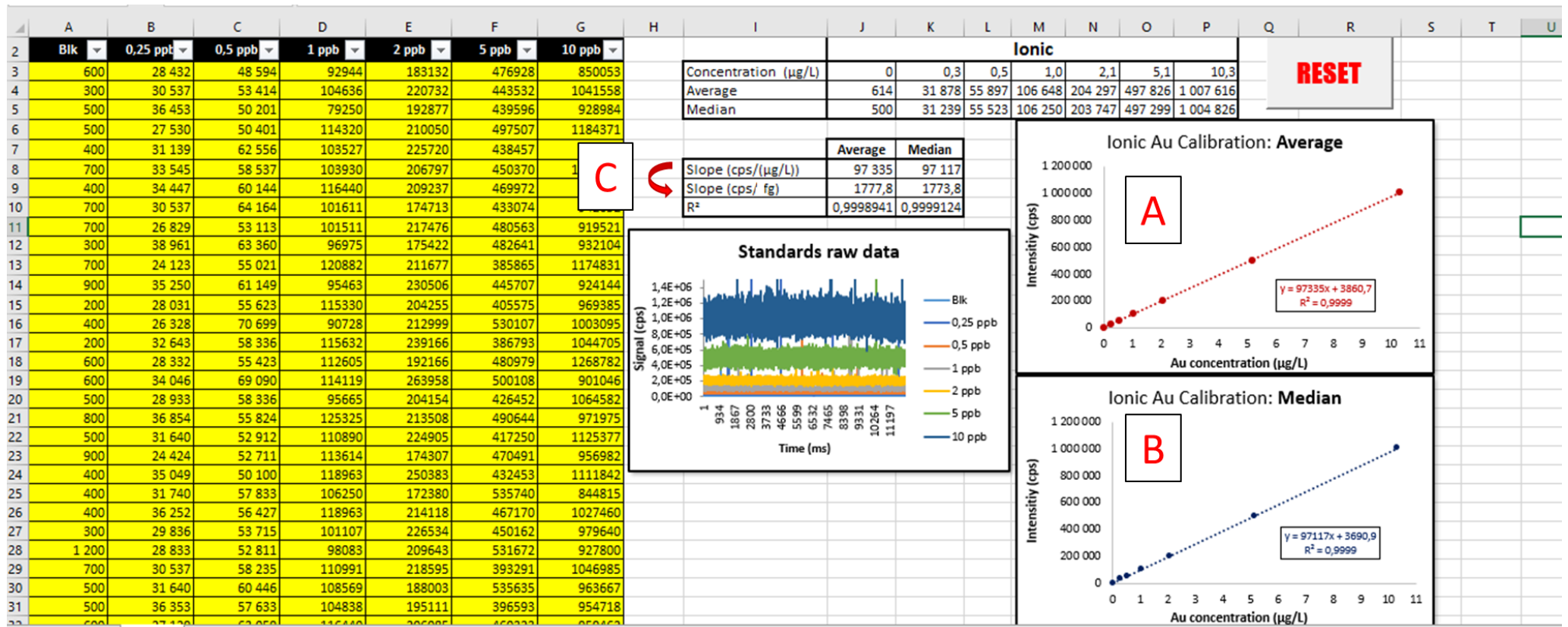


Figure 65 : Nouvel onglet dédié au calcul de la sensibilité

Dans cet onglet, les valeurs d'intensité pour l'étalonnage sont déterminées en calculant la moyenne (Figure 65A) mais aussi la médiane (Figure 65B) des intensités mesurées. L'intérêt de calculer la sensibilité à partir de la médiane des intensités mesurées permet de limiter les biais de mesures liés à l'introduction d'air dans le système, comme il est possible de le constater sur la Figure 66.

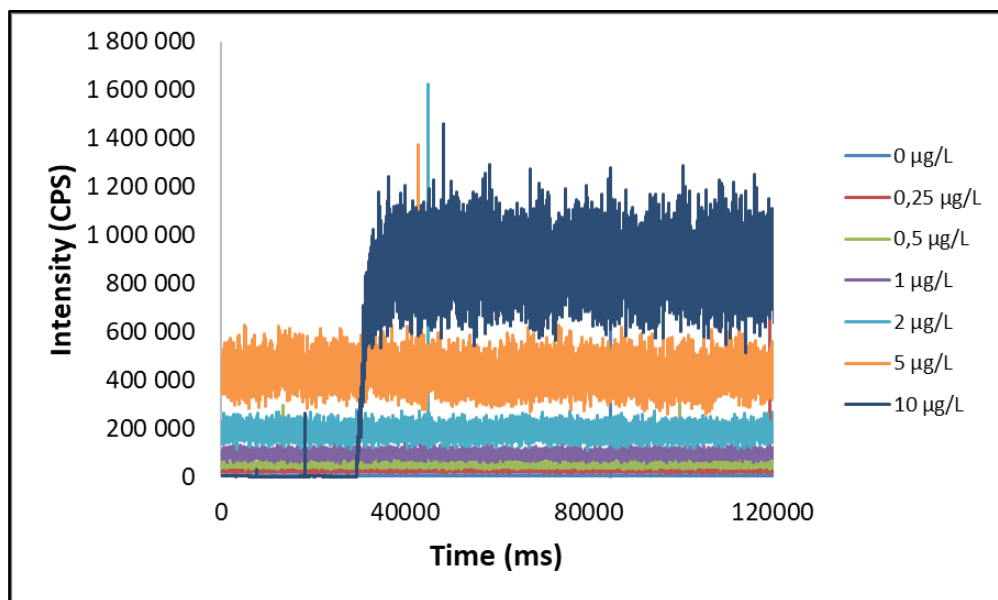


Figure 66 : Exemple d'analyse de plusieurs étalons de titane sous forme ionique

Sur cette Figure 66, il apparaît que l'analyse de l'étalon à 10 µg/L est faussée par une entrée d'air dans le système qui est représentée par un signal proche de 0 cps, entre 0 et 30 000 ms, alors que le signal moyen est en réalité d'environ 900 000 cps. Dans ce type de situation, si la moyenne du signal est prise en compte pour faire l'étalonnage, celui-ci sera biaisé. Il est donc préférable d'utiliser la médiane du signal qui permet de s'affranchir des valeurs extrêmes. Le Tableau 16 permet de constater l'impact du mode de calcul de la sensibilité lorsqu'on utilise la moyenne ou la médiane des intensités.

Tableau 16 : Comparaison des sensibilités calculées à partir de la moyenne ou de la médiane des intensités mesurées (en bleu, étalonnage impacté par l'entrée d'air dans le système)

Concentration (µg/L)	Moyenne (cps)	Médiane (cps)
0	5967	5901
0,25	28325	28031
0,5	51054	50803
1,0	94893	94456
2,0	187378	186481
5,0	429694	427797
10,0	644106	808743
Sensibilité (cps/(µg/L))	63783	78467
Coefficient de détermination (R ²)	0,975	0,999

L'écart entre les deux pentes peut générer un écart supérieur à 10 nm sur le calcul des diamètres quantifiés des NPs. C'est pourquoi il a été jugé important de mettre en place cette amélioration dans la feuille de calcul interne, afin d'automatiser et de fiabiliser les étalonnages. Ainsi, la sensibilité est calculée automatiquement à partir de la meilleure corrélation mesurée, en comparant les coefficients de détermination (obtenus avec la moyenne et la médiane). Une fois la pente obtenue (Figure 65C), celle-ci est convertie de façon à avoir une sensibilité qui s'exprime en signal-masse (cps/fg) plutôt qu'en signal-concentration (cps/(µg/L)) en utilisant l'Équation 14 :

Équation 14

$$a_{masse} = \frac{a_{conc.} \times 60}{Dt \times Q \times 1000}$$

avec :

a_{masse} : sensibilité en (cps/fg)

$a_{conc.}$: sensibilité en (cps/(µg/L))

Dt : temps d'acquisition (ms)

Q : débit d'introduction de l'échantillon (mL/min)

La valeur de cette sensibilité est alors automatiquement envoyée à l'onglet principal pour le traitement des données Sp-ICP-MS.

IV.3.2.3 Calcul de l'efficacité de transport

Comme cela a été expliqué dans le [paragraphe II.9.1](#), le TE peut être calculé selon trois méthodes différentes. La feuille de calcul mise en place par le RIKILT ne propose que la méthode basée sur la concentration en particules d'un échantillon de référence. Une modification a donc été apportée afin de calculer l'efficacité de transport via les deux méthodes qui semblent être les plus fiables selon [Pace et al. \(2011\)](#) : la méthode basée sur la concentration des particules ainsi que celle basée sur leur masse. Pour ce faire, l'intensité moyenne générée par un étalon contenant une population monodisperse de NPs est assimilée à la masse de la particule, celle-ci est indiquée dans la feuille de calcul. Un étalonnage avec deux points est alors créé comme le montre la [Figure 67](#).

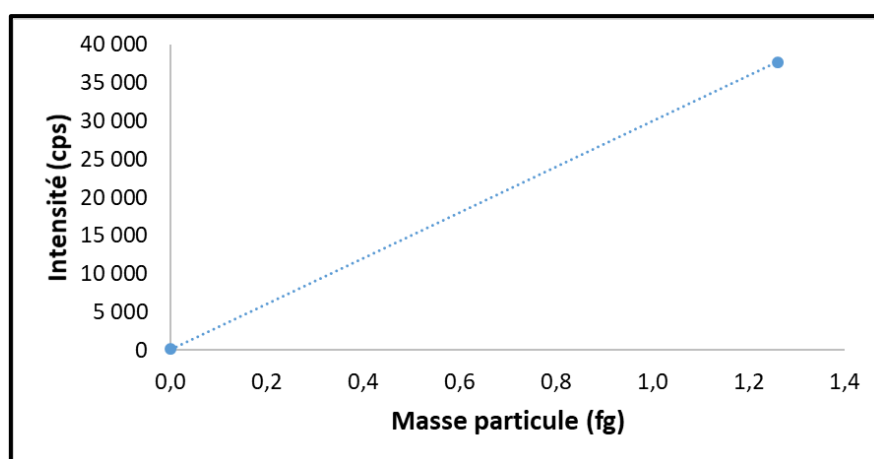


Figure 67 : Droite d'étalonnage obtenue à partir d'une dispersion de NPs d'or de 50 nm, d'une masse de 1,25 fg

La pente calculée est ensuite comparée à la pente obtenue pour l'étalonnage de l'analyte (sous forme ionique) et permet ainsi de déterminer le TE ([paragraphe II.9.1.2](#)). Cet ajout au sein de la feuille de calcul permet de calculer le TE selon les deux manières différentes (concentration ou masse des NPs, cf. [paragraphe II.9.1](#)) afin de pouvoir les comparer et déterminer la plus pertinente à utiliser.

IV.3.2.4 Automatisation des représentations graphiques

Une des informations les plus pertinentes en méthode Sp-ICP-MS est la distribution en taille des NPs qui est souvent fournie sous forme de graphique. Dans la feuille du RIKILT, le graphique ne s'adapte pas à la taille des particules et possède un pas fixe de 2 nm en abscisse. Dans la feuille de calcul interne développée, l'automatisation de la représentation graphique est proposée en utilisant la fonction des plages de données qui s'adapte au nombre de données du tableur. Ainsi, il est possible de modifier le

pas de taille en abscisse mais aussi l'extrémité de l'axe en fonction du type de particule. La [Figure 68](#) permet de voir l'impact du pas et de l'échelle sur une même distribution en taille.

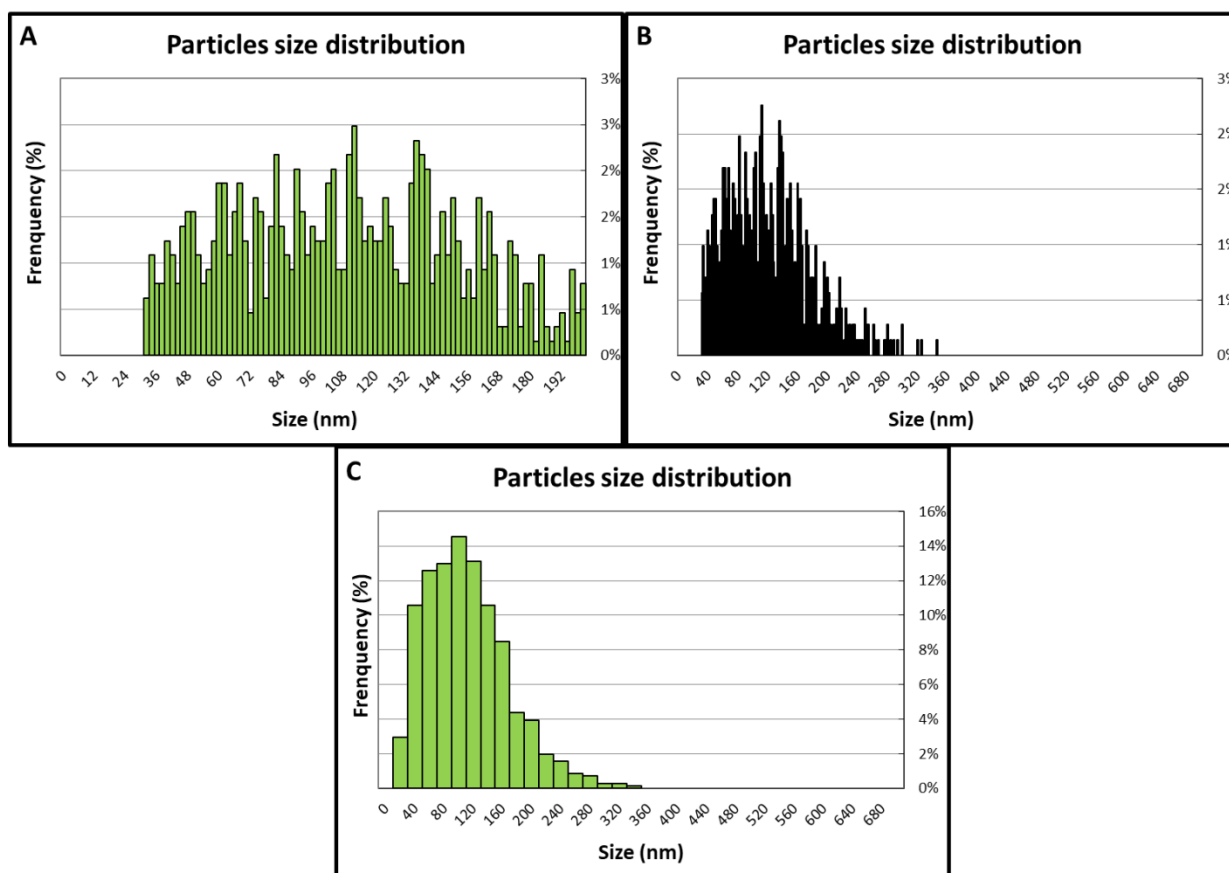


Figure 68 : Distribution en taille du matériau NM-100 présentée avec un pas de 2 nm (A) jusqu'à 200 nm ; (B) jusqu'à 700 nm ou (C) avec un pas de 20 nm jusqu'à 700 nm

La [Figure 68A](#) représente la distribution en taille issue de la feuille de calcul du RIKILT. En augmentant l'échelle des abscisses (« Size » sur la [Figure 68](#)) de cette distribution, cela permet de mieux se rendre compte de sa forme, comme montré à la [Figure 68B](#). Enfin, le paramètre du pas (intervalle entre chaque barre de l'histogramme) est rendu accessible à l'utilisateur qui peut alors le modifier de façon à avoir une représentation graphique plus lisible ([Figure 68C](#)).

De nouveaux graphiques, complémentaires au graphique initial de la distribution des signaux ([Figure 62B](#)), ont également été mis en place ([Figure 69](#)). Les [Figures 69A et B](#) sont celles proposées par la feuille RIKILT.

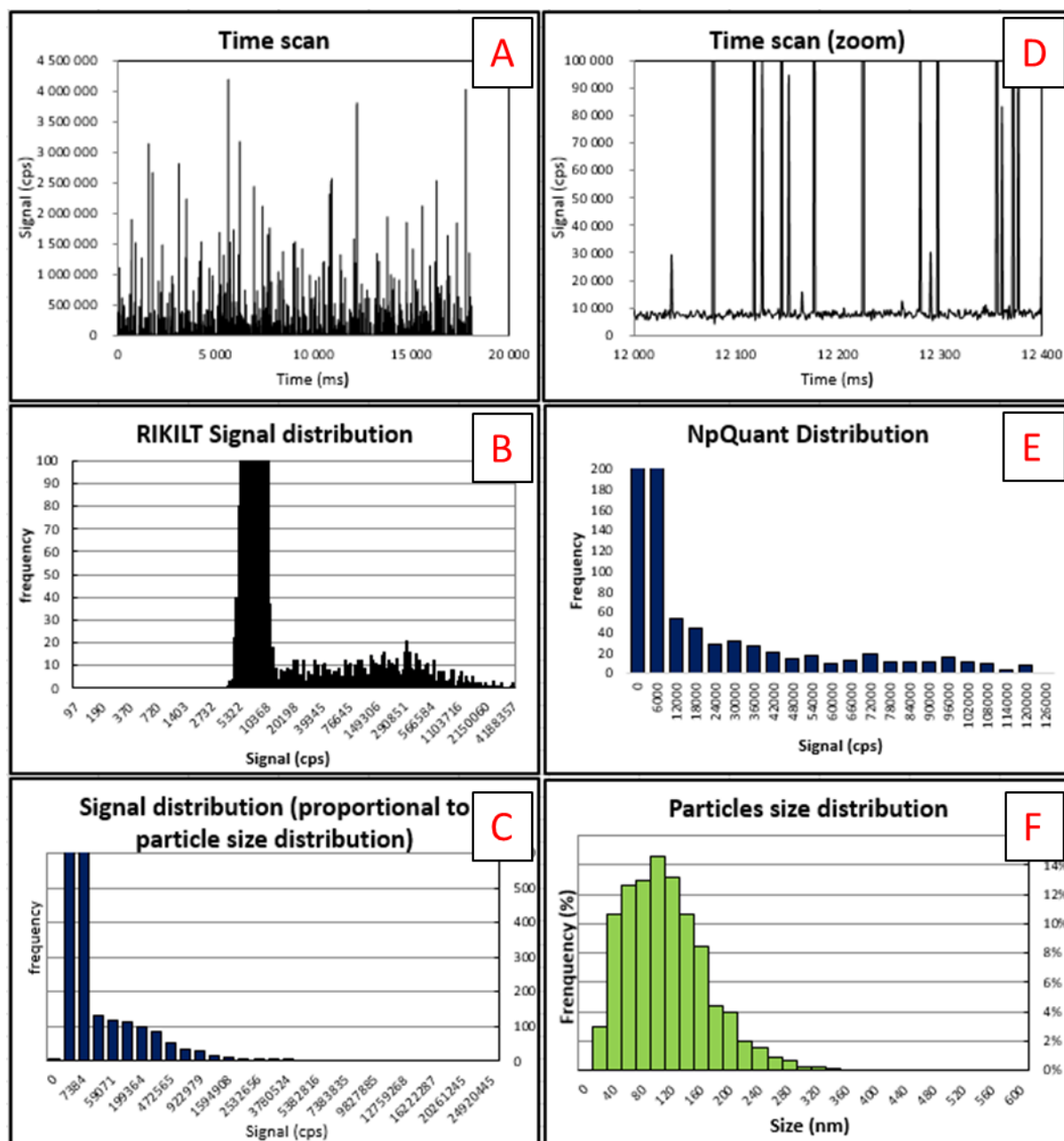


Figure 69 : Nouvelle interface de la feuille de calcul modifiée du RIKILT

La Figure 69C représente la distribution de signaux proportionnelle à la distribution en taille (Figure 69F) afin de mieux distinguer les populations de NPs. La Figure 69D est quant à elle, un grossissement de la Figure 69A. La Figure 69E est la distribution des signaux proposée par le logiciel npQuant de l'ICP-MS (qui a donc été créée dans cette feuille de calcul). L'intérêt de disposer de plusieurs types de distribution permet de pouvoir accéder à plus d'informations visuellement. La distribution des signaux proposée par npQuant (Figure 69E) est moins lisible car son échelle des abscisses est linéaire. C'est-à-dire que l'intervalle entre chaque barre est constant. Or, l'intensité

fournie par les particules n'évolue pas de façon linéaire par rapport à leur diamètre. C'est pourquoi les [Figure 69B et C](#) sont plus pertinentes visuellement.

IV.3.2.5 Calcul de la limite de détection en taille (LDt)

La LDt est un paramètre important à déterminer pour les analyses Sp-ICP-MS puisqu'elle permet de déterminer à partir de quel diamètre les particules ne sont plus détectées, ce qui peut générer dans certains cas des biais au niveau de la distribution en taille, de la taille moyenne, de la fraction nanoparticulaire... Dans la feuille du RIKILT, le seuil bruit de fond-particule n'est pas déterminé automatiquement, or, c'est à partir de ce dernier que la LDt est calculée ([paragraphe II.9.4.3](#)). C'est pourquoi, il a été ajouté à la feuille de calcul interne, un calcul de la LDt à partir du seuil bruit de fond-particule, en utilisant successivement les [Équations 7 et 8](#). Ce résultat est affiché dans un tableau dédié aux résultats de la feuille de calcul ([Figure 70](#)).

Resultats	
Fraction nanoparticulaire	39,1%
Diamètre le plus fréquent (nm)	91
Diamètre moyen (nm)	121
Limite de détection en taille (nm)	33,1
Concentration en particules en nombre (Part/mL)	38214
Concentration en particules en masse (ng/L)	243,1
Nombre de particules détectées (Part)	708
Diamètre médian (nm)	114,3
Diamètre minimum (nm)	33,2
Diamètre maximum (nm)	347,6

Figure 70 : Tableaux des résultats Sp-ICP-MS de la feuille de calcul interne

IV.3.2.6 Calcul de la fraction nanoparticulaire

La fraction nanoparticulaire représente la fraction en nombre de nanoparticules par rapport à l'ensemble des particules du matériau. C'est aussi un paramètre important pour évaluer la quantité de NPs, paramètre pouvant être déterminant d'un point de vue réglementaire ([Commission européenne, 2011](#)). La feuille de calcul du RIKILT ne permettant pas de la déterminer, a donc été modifiée pour calculer automatiquement la fraction nanoparticulaire d'un échantillon analysé ([Figure 70](#)).

IV.3.2.7 Correction des signaux provenant des particules fractionnées

Lorsqu'une analyse Sp-ICP-MS s'effectue avec un Dt < 3 ms, il est probable qu'une particule soit « fractionnée » et se retrouve sur deux acquisitions, ce qui biaise l'analyse ([Figure 61C](#)). Bien que la

feuille de calcul proposée par le RIKILT ne prenne pas en compte ce type d'évènement, il est possible d'avoir des particules fractionnées, même avec des $Dt > 3$ ms. Dans la feuille de calcul interne, une modification majeure permet de sommer chaque signal de NPs consécutif, afin de les considérer comme provenant d'une seule particule. La Figure 71 est un exemple de correction de plusieurs signaux consécutifs. Cette correction s'applique aussi pour les cas où plus de deux signaux de NPs sont consécutifs.

Particules with no correction (Cps)	Corrected Particles (Cps)
79 360	79360
139 673	139673
445 725	679456
233 731	
191 767	191767
45 575	394347
348 772	

Figure 71 : Extrait de la feuille de calcul interne mettant en avant la correction des signaux consécutifs (entouré en jaune)

Cet apport à la feuille de calcul permet ainsi de corriger des distributions en taille comme le montre la Figure 72.

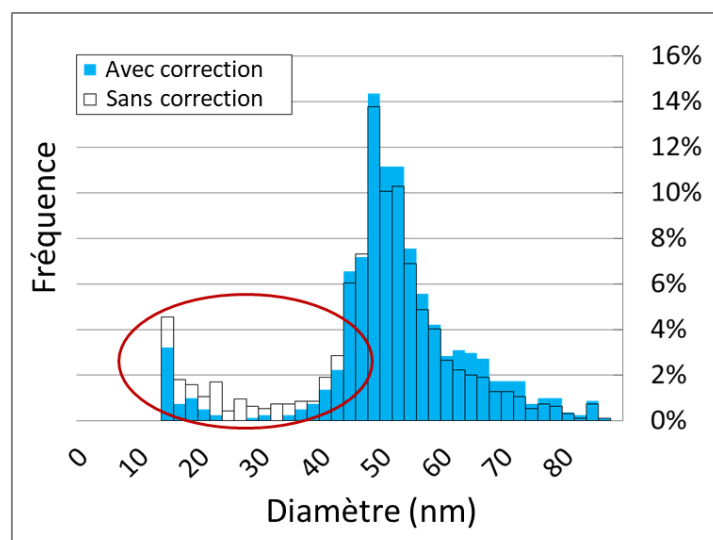


Figure 72 : Impact de la correction sur une distribution en taille de particules d'une dispersion de NPs d'or ayant une taille de 50 nm (en rouge, la gamme de taille corrigée)

La Figure 72 permet de voir l'impact d'une telle correction, notamment entre 20 et 40 nm. Sans correction, la fréquence de détection des particules dont la taille est inférieure à 40 nm est

significativement plus importante qu'avec la correction appliquée. La correction du diamètre des particules permet d'obtenir une distribution en taille plus juste, plus centrée sur la taille réelle qui est de 50 nm. Il reste cependant des particules détectées autour de 10-20 nm qui pourraient laisser penser que la valeur du seuil bruit de fond-particule utilisée n'était pas assez élevée.

IV.3.2.8 Détermination de la taille la plus fréquente

Les distributions en taille des NPs peuvent être modélisées et interpolées par une loi log-normale (Verleysen et al., 2014; Lee and Chan, 2015; Mast et al., 2015; Arnould, 2018). Pour ce type de fonction, le diamètre moyen ne représente pas systématiquement le diamètre le plus fréquent en nombre de la population de NPs comme le montre la Figure 73.

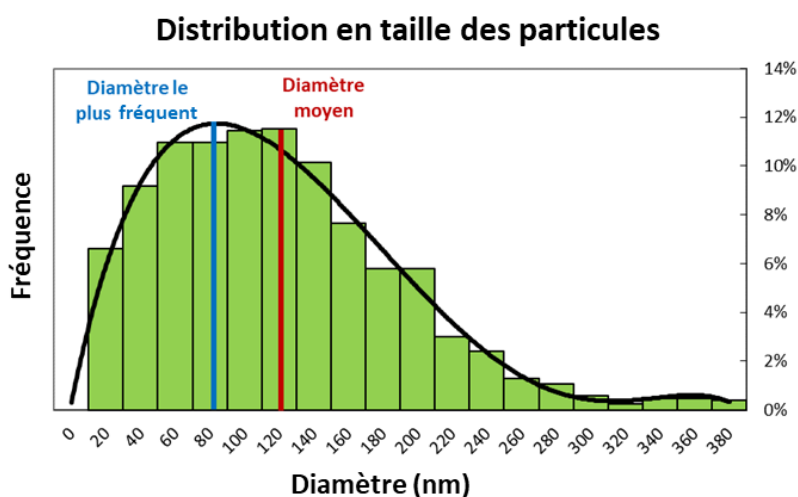


Figure 73 : Exemple d'une distribution en taille de NPs avec l'indication du diamètre le plus fréquent (bleu) et du diamètre moyen (rouge)

Ainsi, la caractérisation des NPs par le diamètre le plus fréquent semble plus pertinent en termes d'évaluation des risques ou de toxicité. C'est pourquoi le calcul de ce paramètre a été ajouté dans la feuille de calcul interne. Etant donné que le tableur Excel n'est pas en mesure de modéliser une fonction log-normale à partir d'une série de données, une approche par modélisation d'une fonction polynomiale a été effectuée. En effet, la fonction Excel permettant de modéliser un polynôme est capable de s'approcher d'une fonction log-normale (Rawlings et al., 1998). Pour effectuer cette modélisation, il est admis qu'une fonction polynomiale de degré 5 est suffisante pour obtenir un résultat cohérent et juste. Cet ajout permet d'avoir un résultat supplémentaire sur la caractérisation des NPs, qui est aussi plus représentatif de celle-ci pour des distributions en taille de type log-normale.

IV.3.2.9 Qualité de la distribution en taille des particules

Enfin, cette dernière partie concerne des fonctions qui sont proposées à l'utilisateur afin d'évaluer la qualité de sa distribution automatiquement. Les paramètres sont présentés dans la [Figure 74](#).

Qualité de la distribution		
Ratio nombre de particules / nombre d'acquisitions	4%	Bad
Distribution en taille des particules	Good	
Ratio signaux de particules corrigés / nombre de particules	12,4%	

Figure 74 : Paramètres de qualité proposés dans la feuille de calcul interne

Le premier paramètre correspond au pourcentage que représentent les signaux des particules par rapport au nombre de signaux total. En effet, des études recommandent d'avoir un ratio compris entre 5 et 10% ([Montaño et al., 2014](#) ; [Huynh et al., 2016](#)). Un indicateur est alors rajouté afin de savoir si une dilution de l'échantillon est nécessaire. Dans l'exemple de la [Figure 74](#), le ratio de 4% est considéré comme trop faible et nécessite de passer un échantillon plus concentré. Pour le second paramètre, « Distribution en taille des particules », il est admis qu'il faut qu'au moins une des valeurs de fréquence de la distribution en taille atteigne un minimum de 100 particules pour que l'on considère que la distribution soit pertinente. Enfin, le dernier paramètre indique le ratio de signaux de particules corrigés avec les signaux consécutifs (voir [paragraphe IV.3.2.7](#)) par rapport aux nombres de particules détectées au total. Ces deux derniers paramètres ont été ajoutés de façon arbitraire et ne peuvent être justifiés scientifiquement. Cependant, il a été estimé que cela pouvait être utile, notamment si des ratios « signaux de particules corrigés / nombre de particules » très différents étaient observés selon les échantillons. En effet, cela pourrait être corrélé au taux d'agglomération, ce qui fournirait une information supplémentaire.

IV.3.2.10 Méthode et temps de calcul

La feuille du RIKILT pouvait initialement traiter 20 000 données maximum. Suite à l'automatisation de la feuille de calcul, le nombre de données pouvant être traitées n'est restreint que par la capacité du tableur lui-même, qui est d'environ 1 000 000 de données. Le [Tableau 17](#) permet de se rendre compte du nombre de données acquises par la méthode Sp-ICP-MS en fonction du temps d'analyse et du temps d'acquisition (Dt).

Tableau 17 : Nombre de données obtenues par Sp-ICP-MS en fonction du temps d'analyse et du temps d'acquisition

Temps d'analyse (min)	Temps d'acquisition (ms)	Nombre de données
3	10	18 000
3	3	60 000
1	3	20 000
1	0,1	600 000
1	0,05	1 200 000

Ce tableau reprend des conditions classiques en Sp-ICP-MS et montre qu'une limite de 20 000 données restreint aussi les conditions d'analyses (temps d'analyse et temps d'acquisition). La feuille de calcul du RIKILT est destinée aux expériences avec $Dt \geq 3$ ms. Pour des $Dt < 3$ ms, le nombre de données augmente considérablement et la feuille du RIKILT n'est plus en capacité de les traiter.

Avec l'ajout de toutes les modifications présentées dans ce chapitre, le temps de calcul a été augmenté à ≈ 30 s par échantillon contre 2-3 s initialement. Le nombre de données pouvant être traitées étant élevé, certaines modifications ont été apportées afin d'alléger les calculs effectués par le tableur. Lors de la conversion du signal en masse (Équation 7) puis en taille (Équation 8), il a été décidé de regrouper toutes les constantes requises sous un seul facteur, qui sera appliqué à chaque signal. Cela diminue le temps de calcul du tableur de ≈ 10 s et permet un traitement des données plus rapide.

IV.3.2.11 Synthèse des optimisations de la feuille de calcul interne

La nouvelle feuille de traitement de données développée en interne à partir de la feuille de calcul du RIKILT permet de mieux répondre aux enjeux concernant la caractérisation de NPs par Sp-ICP-MS. L'interface de cette nouvelle feuille de calcul est présentée dans la Figure 75. Les données brutes sont collées dans la colonne dédiée (Figure 75A) tandis qu'un tableau (Figure 75B) est consacré aux paramètres d'analyse que l'utilisateur doit renseigner (Débit, masse volumique, Dt ...), un autre tableau est dédié aux graphiques (Figure 75C) afin d'ajuster le pas de la distribution en taille et les extrémités des axes. Le troisième tableau (Figure 75D) résume tous les résultats liés aux particules analysées, comme la fraction nanoparticulaire, le diamètre moyen et le plus fréquent, la concentration en particules, en nombre et en masse ou encore la LDt. Enfin, le dernier tableau permet à l'utilisateur d'évaluer la qualité de la distribution en taille (Figure 75E). Enfin, les graphiques (Figure 75F) sont créés à partir de toutes ces données.

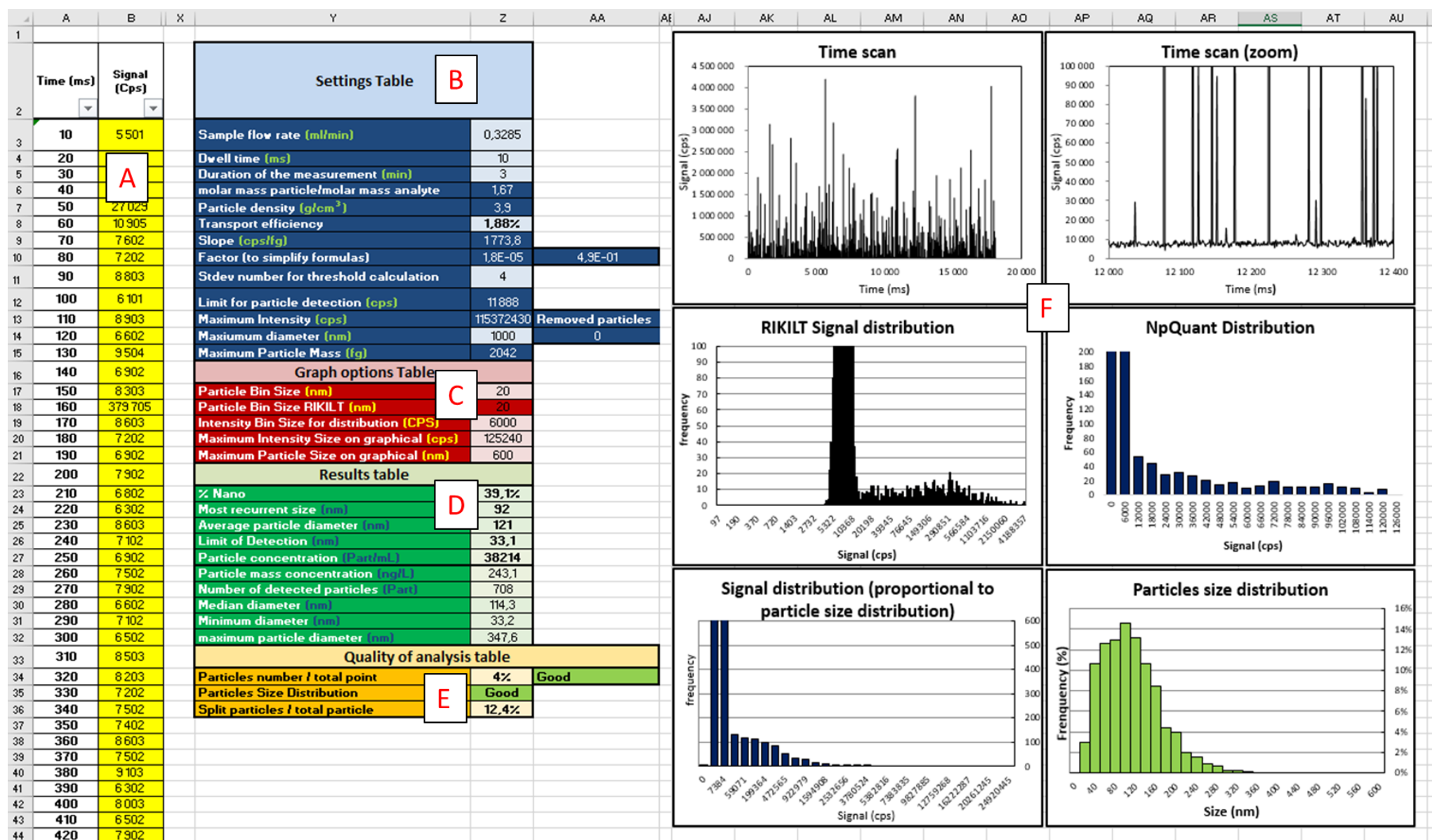


Figure 75 : Interface de la nouvelle feuille de traitement de données Sp-ICP-MS

Le [Error! Not a valid bookmark self-reference.](#) résume les différentes optimisations qui ont été effectuées pour développer cette feuille de calcul interne.

Tableau 18 : Résumé des optimisations effectuées sur la feuille de calcul interne

Optimisation	Feuille de calcul du RIKILT	Feuille de calcul interne
Calcul du seuil bruit de fond-particule	Déterminé de façon arbitraire	Automatisation, l'utilisateur doit fixer le paramètre $n \times ET$
Etalonnage avec des analytes sous forme ionique	Ne prend en compte que la moyenne	Prend en compte la médiane et la moyenne et utilise la meilleure corrélation
Calcul du TE	Méthode basée sur la concentration des particules	Calcul avec les deux méthodes : basées sur la masse et la concentration des particules
Automatisation des graphiques	Pas fixe de 2 nm et maximum fixé à 200 nm	Peut régler le pas des abscisses et les extrémités des axes – ajout de nouveaux graphiques
Méthode de calcul	Limité à 20 000 données pouvant être traitées	Simplification des calculs et augmentation du nombre de données pouvant être traitées (théoriquement 1 000 000)
Calcul de la LDt	-	Automatisation à partir de la valeur du seuil bruit de fond-particule
Calcul de la fraction nanoparticulaire	-	Automatisation
Signaux consécutifs	-	Correction en sommant les signaux consécutifs
Qualité de la distribution en taille	-	Ajout de contrôles qualité internes permettant d'évaluer la distribution en taille

En conclusion, la feuille de calcul initiale mise à disposition par le RIKILT a été largement améliorée au cours de ces travaux, afin de la compléter par des paramètres d'intérêts pour la caractérisation des NPs, tout en automatisant certains calculs et graphiques. Les résultats obtenus vont ensuite être comparés avec ceux obtenus par le logiciel npQuant.

IV.4 Traitement des données : Comparaisons entre le module npQuant (Thermo) et la méthode de calcul interne

Les données obtenues par Sp-ICP-MS peuvent être traitées soit à partir de la feuille de calcul interne développée au cours de cette thèse, soit en utilisant le module npQuant qui fait partie de la plateforme QTegra de l'ICP-MS utilisé. Toutefois, il faut souligner que l'un des inconvénients de ce module est que c'est une boîte noire, c'est-à-dire qu'il n'est pas possible de déterminer comment sont calculés les différents résultats fournis. Contrairement au logiciel constructeur, la feuille de calcul interne permet d'accéder à tous les calculs utilisés et elle peut être aisément modifiée et améliorée. Malgré tout, nous avons souhaité réaliser cette comparaison afin d'évaluer les capacités du module et d'estimer l'intérêt de l'utiliser par la suite, malgré ses principaux défauts suscités.

IV.4.1 Identification des paramètres à comparer

Parmi les paramètres importants en Sp-ICP-MS, le module npQuant calcule la sensibilité et le TE avec les deux méthodes proposées par [Pace et al. \(2011\)](#). Il détermine également le diamètre moyen des particules. Tous ces paramètres seront donc comparés à ceux calculés par la feuille de calcul développée en interne. Le [Tableau 19](#) résume les paramètres pouvant être déterminés par le logiciel npQuant et par la feuille de calcul interne.

Tableau 19 : Liste des paramètres pertinents en Sp-ICP-MS disponibles avec le traitement de données par npQuant ou avec la feuille de calcul interne

Paramètres	npQuant	Feuille de calcul interne	Comparaison possible
Sensibilité en mode ionique (S)	X	X	X
Efficacité de transport (méthode masse)	X	X	X
Efficacité de transport (méthode concentration)	X	X	X
Diamètre moyen	X	X	X
Limite de détection en taille	X	X	X
Diamètre le plus fréquent		X	
Fraction nanoparticulaire		X	

Le diamètre le plus fréquent, ainsi que la fraction nanoparticulaire, ne sont pas déterminés automatiquement par le module npQuant bien que ces paramètres soient importants pour caractériser des NPs. Ainsi, cinq sur sept paramètres accessibles seront comparés via les deux traitements de données. Il est intéressant de noter que le logiciel laisse le choix à l'utilisateur de calculer automatiquement certains paramètres, comme la sensibilité ou l'efficacité de transport.

IV.4.2 Méthode de comparaison

Pour comparer les deux traitements de données, le matériau NM-100 a été analysé sur plusieurs jours ($n = 15$) en suivant le protocole décrit dans le [paragraphe V.2.2.2](#). Les valeurs obtenues pour les différents paramètres ont été comparées à l'aide d'un test statistique de Student par pair. Ce test est appliqué car les mesures d'un jour à l'autre sont indépendantes (TE, débit...), nécessitant de comparer npQuant et la feuille de calcul pour chaque jour d'analyse. Le paramètre de Student expérimental (t_{exp}) est calculé suivant l'[Équation 15](#).

Équation 15

$$t_{exp} = \frac{\bar{x}_{dif} \times \sqrt{n_{paires}}}{\Delta_{dif}}$$

avec :

$\bar{x}_{dif}$: la moyenne des différences

n_{paires} : le nombre de paires comparées

Δ_{dif} : l'écart-type des différences

Ce paramètre de Student expérimental est ensuite comparé au paramètre de Student théorique ($t_{théo} = 1,761$) obtenu selon la table fournie en annexe ([Annexe D, Tableau D1](#)). Ce paramètre est choisi pour un risque de 0,05 ($p = 0,05$) et dépend du nombre de paires comparées. Si $t_{exp} > t_{théo}$, alors les résultats issus des deux traitements de données seront considérés comme significativement différents.

De plus, le Centre commun de la recherche (JRC) de la Commission Européenne a caractérisé le NM-100 par microscopie électronique et a obtenu un diamètre moyen à 164,2 nm. Les résultats de la feuille de calcul et du npQuant seront comparés à cette valeur pour évaluer la justesse.

IV.4.3 Résultats et discussion

Les résultats obtenus pour chaque paramètre sont présentés dans la [Figure 76](#). Seulement deux paramètres sont similaires ($T_{exp} < T_{théo}$), à savoir la sensibilité et la LDt ([Figure 76A-B](#)). Concernant les quatre autres paramètres considérés comme significativement différents entre npQuant et la feuille de calcul, il est difficile d'expliquer d'où peut provenir l'écart puisque le module npQuant ne donne pas d'information précise sur sa façon de traiter les résultats. Il est indiqué que celui-ci se base sur la théorie présentée dans l'étude de [Pace et al. \(2011\)](#), tout comme la feuille de calcul qui a été développée en interne.

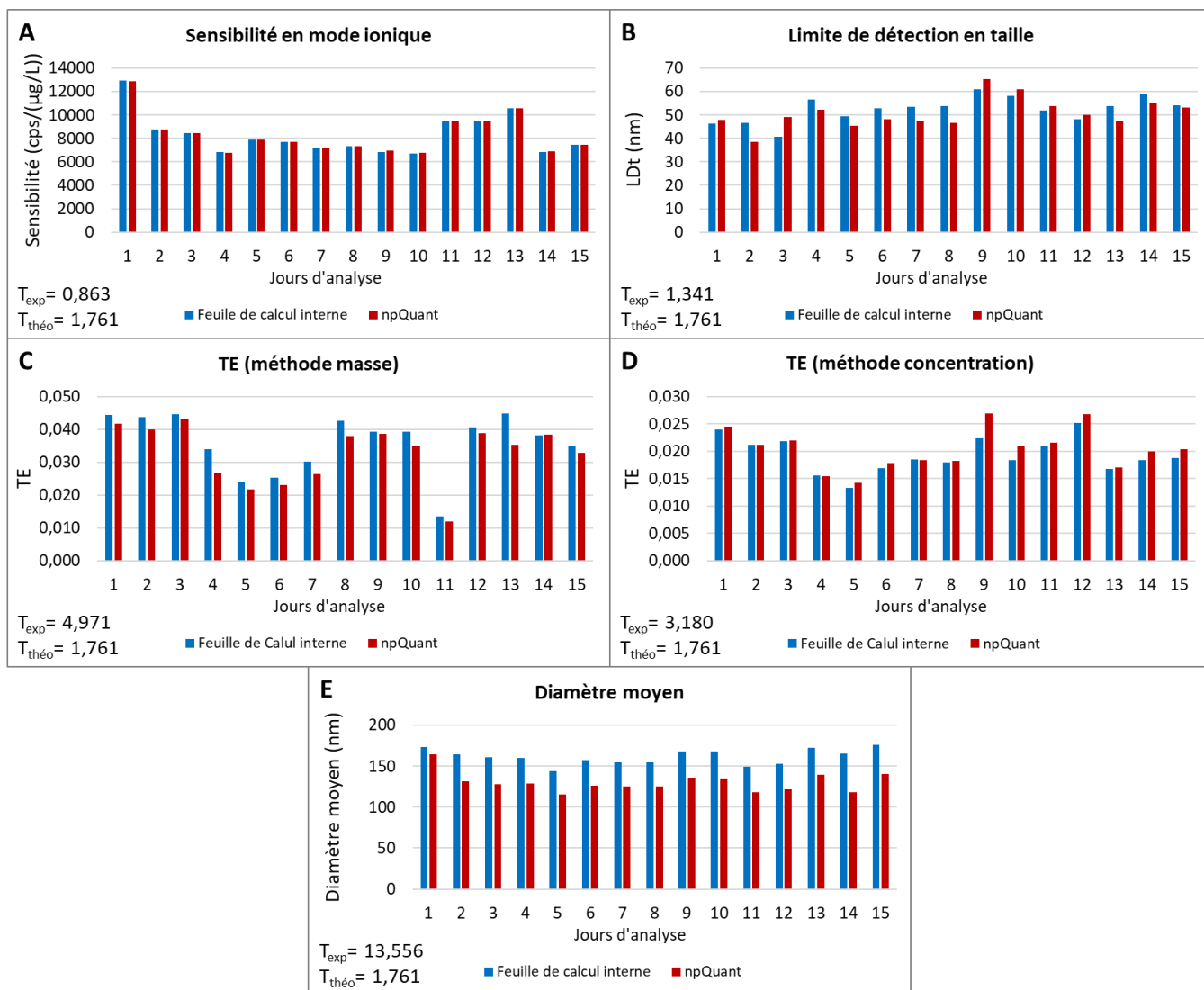


Figure 76 : Comparaison entre la feuille de calcul interne et le module npQuant pour l'analyse du NM-100 ($n=15$) pour différents paramètres : Sensibilité en mode ionique (A), LDt (B), TE basé sur la masse des particules (C), TE basé sur la concentration des particules (D), et le diamètre moyen (E)

Dans le cas de la méthode basée sur la masse (Figure 76C), la différence ne peut pas provenir de la sensibilité puisque ce paramètre ne présente pas de différence significative (Figure 76A). La différence peut alors provenir de la masse assimilée à la particule d'Au de référence. En effet, le producteur indique 1,26 fg tandis que le npQuant effectue une conversion à partir de la taille et obtient 1,36 fg. Cette différence de masse a donc un impact sur la sensibilité particulière calculée et donc sur le TE (paragraphe II.9.1.2).

Pour la méthode basée sur la concentration des particules (Figure 76D), le TE présente des résultats significativement différents. Cela peut s'expliquer car la feuille de calcul interne est capable de reconstruire les signaux consécutifs de particules fractionnées, ce qui n'est pas le cas avec npQuant. Ainsi, le nombre de particules mesurées est systématiquement inférieur par rapport au logiciel

npQuant. Etant donné que le calcul de ce TE se base sur le nombre de particules détectées (Équation 6 du paragraphe II.9.1.3), le TE est donc impacté par cette différence.

La différence de TE a un impact direct sur la conversion « signal-diamètre » des particules et donc sur le diamètre moyen des particules. Cela peut alors expliquer la différence observée sur ce paramètre (Figure 76E), où les diamètres fournis par la feuille de calcul sont systématiquement supérieurs à ceux obtenus avec npQuant.

Le Tableau 20 résume les différences statistiques des résultats observés par les deux modes de calcul provenant du module npQuant et de la feuille de calcul interne.

Tableau 20 : Conclusion du test statistique de Student par pair pour différents paramètres entre npQuant et la feuille de calcul interne

Paramètres	Résultats du test statistique	Justification possible
Efficacité de transport (méthode masse)	Différent	Masse assimilée à la particule différente
Efficacité de transport (méthode concentration)	Différent	Correction des signaux consécutifs
Sensibilité en mode ionique	Similaire	-
Diamètre moyen	Différent	Différence de TE
Limite de détection en taille	Similaire	-

La justesse sur le diamètre moyen a été évaluée (Figure 76E). La valeur moyenne obtenue avec la feuille de calcul est de 158 ± 11 nm contre 130 ± 12 nm avec npQuant, pour une valeur estimée à 164,2 nm par le JRC.

En conclusion, la feuille de calcul interne permet d'obtenir des résultats plus justes que le module npQuant pour la détermination de la concentration massique.

IV.4.4 Conclusion

La comparaison entre le module npQuant et la feuille de calcul développée en interne a permis d'identifier les avantages et inconvénients de chacun ([Tableau 21](#)).

Tableau 21 : Avantages et inconvénients d'utilisation du logiciel ou de la feuille de calcul pour traiter les données

	Module npQuant	Feuille de calcul interne
Avantages	• Traitement direct des résultats • Vitesse de traitement des données	• Accès à plus de paramètres sur les NPs • Maîtrise des calculs • Modifiable pour améliorations • Justesse
Inconvénients	• Manque des paramètres (Tableau 19) • Manque d'informations sur la façon de calculer • Justesse sur diamètre moyen	• Prise en main • Traitement indirect des résultats • Vitesse de traitement des données

Le principal avantage du module npQuant est qu'il permet de traiter les données directement et de façon rapide, contrairement à la feuille de calcul qui nécessite d'exporter les données après analyse et nécessite un temps plus élevé de traitement. Cependant, il ne fournit pas assez de résultats intéressants ([Tableau 19](#)) comme la fraction nanoparticulaire ou le diamètre le plus fréquent qui peut varier significativement du diamètre moyen, dans le cas d'une distribution de type log-normale. De plus, certains aspects « boîte noire » du module npQuant ne permettent pas d'avoir un contrôle sur la façon de traiter les données. Toutefois, le logiciel laisse le choix à l'utilisateur de calculer automatiquement ou non la sensibilité ou l'efficacité de transport.

Concernant la sensibilité, bien que ce paramètre soit similaire ([Tableau 20](#)), le module npQuant peut être moins robuste dans certaines situations (idem pour la feuille de calcul du RIKILT). En effet, l'introduction de l'échantillon étant manuelle, il est possible d'avoir des problèmes durant l'acquisition tels qu'une entrée d'air si le tube n'a pas été bien placé (cf [Figure 66](#)). Le module npQuant ne mesurant que les valeurs moyennes, il est donc impacté dans ce type de situation. Enfin, la feuille de calcul interne s'est révélée plus juste que le module npQuant concernant la détermination du diamètre moyen.

IV.5 Bilan

Ce chapitre a présenté l'évolution du traitement de données en Sp-ICP-MS et mis en avant les avantages et inconvénients d'utiliser un Dt supérieur à quelques millisecondes ou de l'ordre de la centaine de microsecondes. Une feuille de calcul interne permettant de traiter les données a été développée à partir de celle proposée par le RIKILT. Plusieurs améliorations ont été apportées comme le calcul des LDt de la fraction nanoparticulaire mais aussi l'automatisation du calcul du seuil bruit de fond-particule ou encore la détermination du diamètre le plus fréquent. Cette feuille de calcul a ensuite été comparée à un logiciel dédié aux analyses par Sp-ICP-MS et a permis de mettre en avant que la feuille de calcul interne donne des résultats plus proches de la valeur de référence, tout en fournissant des paramètres supplémentaires. Bien que le logiciel npQuant à l'avantage de pouvoir traiter les données directement et rapidement, la feuille de calcul interne sera utilisée pour optimiser la méthode Sp-ICP-MS, lors de l'analyse des échantillons alimentaires dans le chapitre suivant.

Chapitre V

Caractérisation des NPs de TiO₂ dans les aliments par Sp-ICP-MS

V.1 Sommaire

V.1	Sommaire.....	Error! Bookmark not defined.
V.2	Optimisation de la méthode Sp-ICP-MS.....	Error! Bookmark not defined.
V.2.1	Données de la littérature.....	Error! Bookmark not defined.
V.2.2	Matériels et méthodes	Error! Bookmark not defined.
V.2.3	Optimisation du temps d'acquisition (Dt)	Error! Bookmark not defined.
V.2.4	Calcul du seuil bruit de fond-particule	Error! Bookmark not defined.
V.2.5	Optimisation de la stabilité des suspensions de NPs en fonction du type de flacon	Error! Bookmark not defined.
V.2.6	Détermination du mode d'introduction de l'échantillon dans l'ICP-MS	Error! Bookmark not defined.
V.2.7	Optimisation du mode d'analyse de l'ICP-MS.....	Error! Bookmark not defined.
V.2.8	Choix du milieu de dispersion pour l'analyse de NPs.....	Error! Bookmark not defined.
V.2.9	Sélection de l'isotope de titane le plus adapté pour l'analyse des NPs	Error! Bookmark not defined.
V.2.10	Détermination du calcul de l'efficacité de transport (TE) .	Error! Bookmark not defined.
V.2.11	Bilan	Error! Bookmark not defined.
V.3	Analyse d'échantillons alimentaires.....	Error! Bookmark not defined.
V.3.1	Choix des denrées alimentaires	Error! Bookmark not defined.
V.3.2	Protocole d'extraction des NPs de TiO ₂ des échantillons alimentaires	Error! Bookmark not defined.
V.3.3	Échantillons alimentaires	Error! Bookmark not defined.
V.4	Bilan	Error! Bookmark not defined.

L'additif alimentaire de TiO₂, le E171, est présent dans de nombreux produits de consommation. Bien que la microscopie électronique soit la méthode la plus utilisée pour caractériser cet additif, la méthode « Single particle » ICP-MS (Sp-ICP-MS) se présente comme un complément ou une alternative à celle-ci. L'avantage de la méthode Sp-ICP-MS est de pouvoir analyser rapidement des échantillons tout en fournissant des informations sur la taille et la nature chimique des particules. Une feuille de calcul interne a été développée ([Chapitre IV](#)) pour permettre d'optimiser la méthode Sp-ICP-MS sur

plusieurs paramètres comme le mode et le temps d'acquisition, le choix de l'isotope ou encore le mode de calcul de l'efficacité de transport. Une fois la méthode de caractérisation Sp-ICP-MS optimisée, l'objectif est de l'éprouver sur des échantillons alimentaires contenant du E171, afin de caractériser les NPs de TiO₂ susceptibles d'être présentes.

V.2 Optimisation de la méthode Sp-ICP-MS

V.2.1 Données de la littérature

Le [Tableau 22](#) répertorie de nombreuses études sur la méthode Sp-ICP-MS. Plusieurs paramètres se distinguent à savoir le traitement de données utilisé, la méthode pour calculer l'efficacité de transport (TE), le temps d'acquisition (Dt) ou encore la méthode pour déterminer le seuil bruit de fond-particule. Ces différents paramètres seront étudiés pour pouvoir optimiser la méthode Sp-ICP-MS. Plusieurs éléments du tableau seront repris afin de les comparer avec les différentes optimisations qui vont être menées.

Tableau 22 : Résumé des différents paramètres de la méthode Sp-ICP-MS utilisés dans la dernière décennie

Instrument	Traitement des données	Type de NPs, type d'échantillon	Milieu de dispersion	Méthode TE	Dt (ms)	Durée analyse (s)	Seuil bruit de fond-particule	LDt (nm)	Référence
Agilent 7500	Feuille de calcul interne	Au, Ag Solution simple	Eau ultrapure	Masse : 9% Concentration : 9% Gravimétrique : 14,5%	10	30	3xET	NI	Pace et al. 2011
Agilent 7500	Feuille de calcul interne	Au, Ag, Solution simple, Acides humiques	Eau ultrapure HNO ₃ 0,2%	Concentration : NI	10	30	3xET	NI	Pace et al. 2012
PerkinElmer NexION 300Q	Feuille de calcul interne	Ag, solution simple	Eau ultrapure	NI : 5%	0,1 1 5 10 15 20	80	NI	20	Mitrano et al. 2012
PerkinElmer NexION series	Syngistix™ Nano Application Module	Au, solution simple	NI	NI	0,01 à 10	NI	Manuel	NI	Hineman and Stephan 2014
PerkinElmer NexION 300Q	Syngistix™ Nano Application Module	Ag, Au, CeO ₂ Eau de rivière	Eau ultrapure	Masse : NI Concentration : NI	10 3 0,1	NI	NI	NI	Montaño et al. 2014
Thermo Scientific X-Series II	Feuille de calcul interne	Au, Ag, TiO ₂ Eau de rivière, eau du robinet	Eau ultrapure	Masse : 1,5%-2,1%	10	60	3xET	Au : 13 Ag : 75 TiO ₂ : 91	Lee et al. 2014
PerkinElmer NexION 350D	Syngistix™ Nano Application Module	TiO ₂ , Crème solaire	Eau ultrapure	Concentration : NI	0,1	100	NI	NI	Dan et al. 2015

NI : Non Indiqué

* Communication personnelle

Instrument	Traitement des données	Type de NPs, type d'échantillon	Milieu de dispersion	Méthode TE	Dt (ms)	Durée analyse (s)	Seuil bruit de fond-particule	LDt (nm)	Référence
Thermo Scientific X-Series II, Finnigan Element	Feuille de calcul RIKILT	Au, Ag, TiO ₂ Eau usée, viande, milieu de culture	Eau ultrapure	Concentration : 2%-2,5%	2-3	60	Manuel	Au : 20 Ag : 20 TiO ₂ : 50 SiO ₂ : 200	Peters et al. 2015
Agilent 8800	Feuille de calcul interne	Ag Aliment	Eau ultrapure	NI	3	60	NI	13	Verleysen et al. 2015
Agilent 7500	NI	Au, solution simple	Eau ultrapure	Concentration : 2,1%	10	60	NI	NI	Lee and Chan 2015
Agilent 8900	Single Nanoparticle Application Module	Au, solution simple	L-cysteine 0,01%	Masse : NI	0,1	60	Manuel	3	Nunez et al. 2016
Thermo Scientific iCapQ	Module npQuant	Au, Ag solution simple	NI	NI : 6,8%	3-10	60	NI	NI	Kutscher et al. 2016
Agilent 7700x	Feuille de calcul interne	Ag, Au Eau de surface, Eau usée	Eau ultrapure	Concentration : NI	3	60	5xET	Au : 20 Ag : 19	Yang et al. 2016
Agilent 7900	Feuille de calcul interne	Ag, TiO ₂ Eau de surface	NI	Masse : 5,3%-5,5%	3-10	30-100	3xET	Ag : 37 TiO ₂ : 34	Vidmar et al. 2017
PerkinElmer NexION 300D	Syngistix™ Nano Application Module	Ag, Eau de surface Cosmétique	Eau ultrapure	Masse : 11% Concentration : 7-9% Gravimétrique : 14%	0,05	60	NI	20-30	Aznar et al. 2017
PerkinElmer NexION 300D	Syngistix™ Nano Application Module	TiO ₂ Plante de riz	Eau ultrapure	Masse : NI	0,1	60	Manuel	NI	Deng et al. 2017

NI : Non Indiqué

Instrument	Traitement des données	Type de NPs, type d'échantillon	Milieu de dispersion	Méthode TE	Dt (ms)	Durée analyse (s)	Seuil bruit de fond-particule	LDt (nm)	Référence
Agilent 8800	Feuille de calcul RIKILT modifiée	SiO ₂	Eau ultrapure	Concentration : 7,2%	3	60	3xET	75-290	Bolea-Fernandez et al. 2017
PerkinElmer NexION 300X	Syngistix™ Nano Application Module	Au, TiO ₂ Cosmétiques	Eau ultrapure SDS	Masse : 7-10%	0,1	100	NI	Au : 18 TiO ₂ : 25-30*	de la Calle et al. 2017
Agilent 8800 Thermo Scientific Element II	Logiciel Nanocount	TiO ₂ Matrice enrichie en calcium	Matrice enrichie en Ca Eau ultrapure	Masse : 7%	3 5	NI	3xET	10-133	Tharaud et al. 2017
Thermo Scientific iCapQ	Feuille de calcul interne	Pb Viande de gibier	Solution enzymatique (Proteinase K + SDS + bicarbonate d'ammonium + azoture de sodium)	Concentration : NI	5	60-180	NI	56-80	Kollander et al. 2017
Thermo Scientific X-Series II	NI	TiO ₂ Eau de surface	NI	Masse : NI	10	NI	3xET	148-173	Venkatesan et al. 2018a
Thermo Scientific X-Series II	NI	Sn, Pb, Fe, Cu, Ti, Ag Eau du robinet	NI	Masse : NI	10	180	4xET	Sn : 26 Pb : 11 Fe : 55 Cu : 40 Ti : 75 Ag : 13	Venkatesan et al. 2018b
PerkinElmer NexION 300X Agilent 7900	Syngistix™ Nano Application Module Single Nanoparticle Application Module	TiO ₂ Crème solaire, chocolat	Eau ultrapure	Concentration : 6,7%-10,5%	0,1	60	NI	25-30*	de la Calle et al. 2018a
PerkinElmer NexION 300X	Syngistix™ Nano Application Module	TiO ₂ Aliments	Eau ultrapure	Masse : 8%	0,1	100	NI	25-30*	de la Calle et al. 2018b
Thermo Scientific iCapQ	Feuille de calcul RIKILT	Ag, TiO ₂ , CeO ₂ Eau de surface	NI	Concentration : 2%	3	60	NI	Ag : 14 TiO ₂ : 100 CeO ₂ : 10	Peters et al. 2018

NI : Non Indiqué

* Communication personnelle

Instrument	Traitement des données	Type de NPs, type d'échantillon	Milieu de dispersion	Méthode TE	Dt (ms)	Durée analyse (s)	Seuil bruit de fond-particule	LDt (nm)	Référence
PerkinElmer NexION 350D	NI	TiO ₂ Textile	Triton X-100 (0,0001%)	Masse : 6,5-7,5%	0,1	100-300	NI	27-33	Mackevica et al. 2018
Agilent 8800	NI	TiO ₂ , SiO ₂ ustensile de cuisine	Eau ultrapure	NI	3	180	NI	NI	Addo Ntim et al. 2018
Agilent 7900	Single Nanoparticle Application Module	CuO Tissus végétaux	Eau ultrapure	NI	0,1	60	NI	NI	Keller et al. 2018
PerkinElmer NexION 350D	Feuille de calcul interne	Au, Ag, Sang humain	Eau ultrapure	NI : 6,5%	0,05	60	NI	30	Witzler et al. 2018
Thermo Scientific iCapQ	Feuille de calcul interne	Al ₂ O ₃ , Al ₂ Si ₂ O ₅ Nouilles chinoises	Eau ultrapure	Concentration : NI	3	60-180	Algorithme itératif	68	Loeschner et al. 2018
Thermo Scientific iCAP TQ	Module npQuant	TiO ₂ , Chewing-gum	Eau ultrapure	Concentration : 5,8%	10	180-300	NI	26-107	Candás-Zapico et al. 2018
Agilent 7900	Feuille de calcul interne Single Nanoparticle Application Module	Se Levures	SDS (4% m/v)	Concentration : 3,5%	5 0,1	60	3xET	18-83	Jiménez-Lamana et al. 2018
PerkinElmer NexION 300X	Syngistix™ Nano Application Module	TiO ₂ , Ag Urine	Glycérol (1% v/v)	NI : ≈ 5%	0,1	100	NI	TiO ₂ : 15-18 Ag : 8-9	Badalova et al. 2019
Agilent 7900	Single Nanoparticle Application Module	Ag Eau usée	NI	NI	0,1	60	NI	20	Cervantes-Avilés et al. 2019

NI : Non Indiqué

V.2.2 Matériels et méthodes

V.2.2.1 Réactifs

Les solutions étalons d'or (1000 µg/L), de titane (1000 µg/L) et de calcium ionique (1000 µg/L) proviennent de Astasol (Prague, République Tchèque). Le sulfate d'ammonium (99,999%), le chlorure de magnésium (≥ 98%) et l'hydrogénophosphate de sodium (> 98%) ont été achetés chez Sigma (Steinheim, Allemagne). Les nanoparticules (NPs) d'or proviennent de BBI Solution (Cardiff, Royaume-Uni) et leur diamètre moyen est garanti par le producteur à 51,2 nm (mais ce n'est pas considéré comme un Matériau de Référence Certifié (MRC)) à l'aide de la microscopie électronique. La concentration en particules est aussi garantie à $4,5 \times 10^{10}$ particules/mL. L'acide nitrique (67-69%) provient de NORMATOM (Leuven, Belgique). Le méthanol (≥ 99,9%) a été acheté chez Merck (Darmstadt, Allemagne) tandis que l'acide acétique (NORMApur, > 99,8%) provient de VWR (Louvain, Belgique). L'eau ultra pure utilisée (18,2 mΩ) est obtenue à partir d'un système de purification d'eau Millipore Milli-QTM (Millipore S.A., St Quentin en Yvelines, France).

Pour toutes les optimisations effectuées, le Matériau de Référence (MR) NM-100 sera utilisé. Ce matériau est constitué de NPs de TiO₂ de structure cristallographique *anatase*, avec une surface spécifique de 9-10 m²/g. Le NM-100 a été caractérisé par le Joint Research Center (JRC) de la Commission européenne ([Rasmussen et al., 2014](#)). Les particules observées par Microscopie Électronique en Transmission (MET) présentent des diamètres variés allant de 20 à 660 nm, avec un diamètre moyen de 164,2 nm et une fraction nanoparticulaire en nombre de 27,1%. Ces deux valeurs ont servi de valeurs cibles pour les différentes optimisations. Le NM-102 n'a pas pu être utilisé comme pour l'AF4-ICP-MS car le diamètre des NPs est de l'ordre de 20 nm, ce qui est plus faible que la plupart des limites de détection en taille (LDt) obtenues avec la méthode Sp-ICP-MS ([Tableau 22](#)).

V.2.2.2 Protocole d'étalonnage de l'ICP-MS

Les analyses ont été effectuées avec un ICP-MS iCapQ de Thermo Scientific (Courtabœuf, France). Plusieurs paramètres de l'appareil sont contrôlés avant chaque analyse et sont présentés dans l'annexe ([Annexe D, Tableau D2](#)). Pour chaque optimisation, plusieurs manipulations ont été effectuées et sont détaillées dans les paragraphes suivants.

V.2.2.2.1 Mesure du débit

Avant et après la séquence d'analyse, le débit d'introduction est mesuré. Cette mesure se fait à l'aide d'un flacon contenant de l'eau ultrapure dont la masse est mesurée avec une balance de précision XP 504 DR (Mettler-Toledo, Viroflay, France). L'eau est ensuite aspirée pendant 4 à 20 min par le système de nébulisation, puis la masse du flacon est de nouveau mesurée. Le débit est alors déterminé suivant l'Équation 16.

Équation 16

$$Q = \frac{m_1 - m_2}{t}$$

avec :

Q : débit (mL/s),

m₁ : masse du flacon avant le prélèvement (g)

m₂ : masse du flacon après le prélèvement (g)

t : délai du prélèvement (s)

Dans ce cas, il est admis que la masse volumique de la solution prélevée est égale à 1 g/mL. La moyenne du débit est alors utilisée pour le traitement de données concernant les analyses de la journée.

V.2.2.2.1 Mesure de l'Efficacité de Transport (TE)

Le TE est déterminé avant chaque analyse. Une gamme d'étalonnage à partir de quatre solutions d'or ionique à 0 ; 0,5 ; 1 et 2 µg/L est préparée dans le même solvant utilisé pour disperser les particules de TiO₂ afin d'avoir des conditions identiques. Une dispersion de NPs d'or de 50 nm à une concentration de 45 000 particules/mL est préparée en triplicata dans le même solvant que l'or ionique. La dispersion mère des NPs d'or est mise dans un bain ultrasons (Modèle 86483, Fisher BioBlock Scientific, Rungis, France) pendant 5 min à 140% de puissance avant de préparer les dispersions. Le TE est calculé à partir de la méthode basée sur la concentration des particules (voir [paragraphe II.9.1.3](#)) et de la méthode basée sur la masse des particules (voir [paragraphe II.9.1.2](#)).

V.2.2.2.2 Etalonnage du titane

Pour convertir les intensités mesurées des particules de TiO₂ en diamètre, un étalonnage est réalisé à partir de sept solutions étalons de Ti ionique : 0 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 µg/L. Ces étalons sont préparés dans le même solvant que celui utilisé pour les dispersions de NPs de TiO₂ et d'Au, afin d'avoir des

conditions de milieu identique. Pour vérifier la qualité de l'analyse, un échantillon de NM-100 à 1 µg/L (à partir d'une dispersion mère de 1000 mg/L) est analysé après passage préalable aux ultrasons pendant 15 min. Le diamètre et la fraction nanoparticulaire sont contrôlés et un intervalle de confiance de 30% est arbitrairement fixé pour valider nos résultats par rapport aux valeurs cibles du JRC (164,2 nm et 27,1%).

V.2.2.2.3 Séquence d'analyse

Lors de la séquence d'analyse, un rinçage successif à l'acide nitrique (2%, v/v) et à l'eau ultrapure pendant 2 min est effectué après l'analyse de chaque échantillon contenant des particules. Avant injection, chaque échantillon est passé au vortex pendant 5 s afin de maintenir en suspension les particules.

V.2.2.2.4 Traitement des données

Le traitement des données est effectué à partir de la feuille de calcul interne précédemment optimisée (Cf. [Chapitre IV](#)).

V.2.3 Optimisation du temps d'acquisition (Dt)

V.2.3.1 Méthodes

Afin d'optimiser le temps d'acquisition (Dt), une suspension de NM-100 est préparée à 1 µg/L dans de l'eau ultrapure et analysée pendant 3 min à différents Dt : 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 et 100 ms. Les différentes étapes présentées dans le [paragraphe V.2.2.2](#) ont été réalisées. L'efficacité de transport (TE) utilisée est celle issue de la méthode basée sur la concentration des particules (voir [paragraphe II.9.1.3](#)). Lors de cette expérience, la feuille de calcul interne n'était pas encore finalisée et il n'était pas encore possible d'intégrer les signaux consécutifs ([paragraphe IV.3.2.7](#)). Le diamètre moyen et la fraction nanoparticulaire ont été mesurés et comparés avec les valeurs de référence du JRC ([Rasmussen et al., 2014](#)).

V.2.3.2 Résultats et discussion

La [Figure 77](#) présente pour chaque Dt, la fraction nanoparticulaire et le diamètre moyen du NM-100 mesurés.

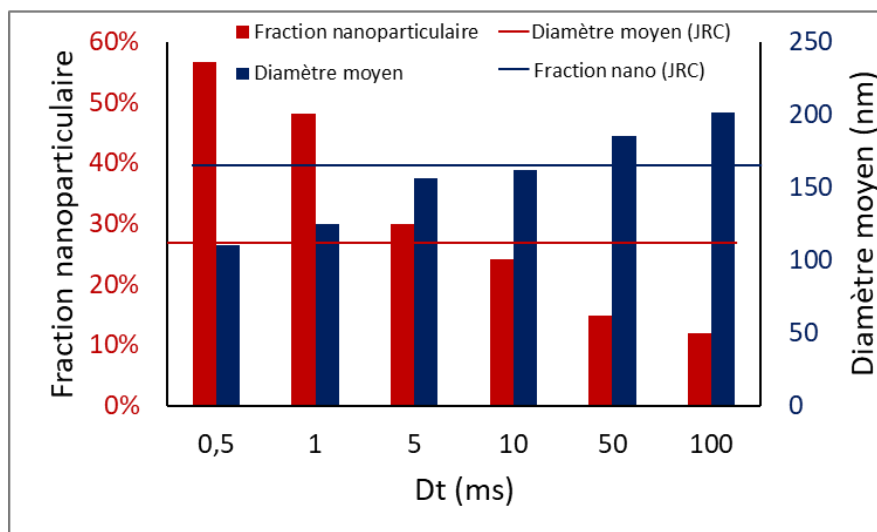


Figure 77 : Diamètre moyen et fraction nanoparticulaire mesurés pour le NM-100 en fonction de plusieurs temps d'acquisition.

Concernant les Dt de 50 et 100 ms, le diamètre moyen est surestimé tandis que la fraction nanoparticulaire est nettement sous-estimée. Cela est probablement dû au fait qu'avec des Dt élevés, la probabilité d'avoir deux particules concomitantes pendant une acquisition est plus élevée. De ce fait, la taille des particules est surestimée ([Figure 60](#)) et la fraction nanoparticulaire sous-estimée.

A l'inverse, pour les Dt de 0,5 et 1 ms, le diamètre est sous-estimé et la fraction nanoparticulaire surestimée ([Figure 60](#)). Cela provient du fait que la probabilité de détecter une fraction de particule augmente et que la feuille de calcul interne utilisée pour cette optimisation n'était pas encore capable d'intégrer des signaux consécutifs liés à une particule ([paragraphe IV.3.2.7](#)).

Les Dt de 5 et 10 ms permettent d'obtenir un diamètre moyen et une fraction nanoparticulaire proche des valeurs de référence fournies par le JRC. Un Dt de 10 ms fournit deux fois moins de données à traiter qu'un Dt de 5 ms pour un temps d'analyse identique. Par conséquent, le Dt de 10 ms est retenu pour la suite. [Mitrano et al. \(2012\)](#) ont aussi évalué différents Dt (0,1 à 20 ms) et ont également considéré qu'un Dt de 10 ms était optimal. Il est important de noter que plusieurs études ont mis en avant l'intérêt d'avoir un Dt de 100 μ s pour diminuer la limite de détection en taille ([Montaño et al., 2014](#) ; [Abad-álvaro et al., 2016](#) ; [Jiménez-Lamana et al., 2018](#)). Néanmoins, les Dt compris entre 3 et 10 ms sont encore largement utilisés actuellement ([Tableau 22](#)).

V.2.4 Calcul du seuil bruit de fond-particule

V.2.4.1 Méthode

Le calcul du seuil bruit de fond-particule est déterminé pour chaque échantillon par la méthode itérative proposée par [Pace et al. \(2011\)](#). Ce calcul a été automatisé dans le chapitre précédent avec la nouvelle feuille de calcul interne ([paragraphe IV.3.2.1](#)). Le TE utilisé est issu de la méthode basée sur la concentration des particules ([paragraphe II.9.1.3](#)). Une dispersion de NM-100 a été analysée en respectant les différentes étapes décrites dans le [paragraphe V.2.2.2](#). La distribution en taille est analysée pour déterminer le paramètre nxET à utiliser. La distribution en taille des NPs d'or a aussi été évaluée puisque ces NPs servent à déterminer le TE.

V.2.4.2 Résultats et discussion

Les distributions en taille des NPs d'or obtenues sont présentées dans la [Figure 78](#).

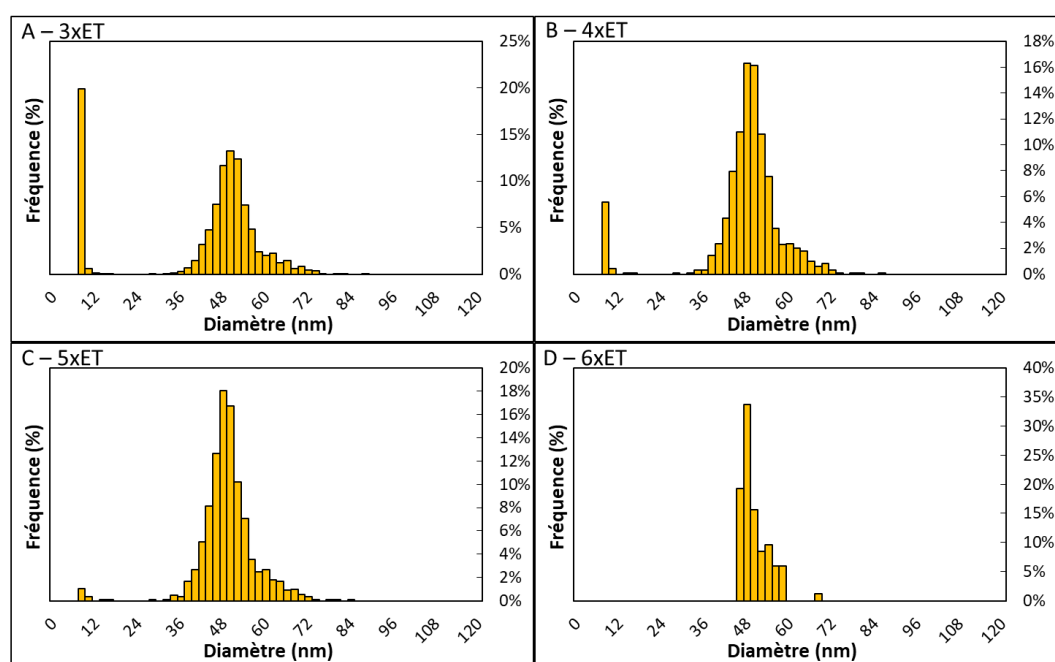


Figure 78 : Distribution en taille des NPs d'or en fonction du paramètre nxET pour calculer le seuil bruit de fond-particule

Pour les paramètres 3xET et 4xET ([Figure 78A-B](#)), l'observation des distributions en taille montre que le bruit de fond est pris en compte comme étant des particules de diamètre ≈ 10 nm. En augmentant le nombre d'écart type ([Figure 78C-D](#)) pour le calcul du seuil bruit de fond-particule, on observe une diminution significative du bruit de fond. Cependant, pour le paramètre 6xET ([Figure 78D](#)), la

distribution en taille est nettement moins bien représentée. Par conséquent le paramètre 5xET sera utilisé pour les NPs d'or. Dans la littérature ([Tableau 22](#)), ce critère n'est pas systématiquement détaillé ([Montaño et al., 2014](#) ; [Lee and Chan, 2015](#) ; [Kutscher et al., 2016](#)) ou bien déterminé manuellement ([Hineman and Stephan, 2014](#) ; [Peters et al., 2015](#) ; [Nunez et al., 2016](#)) pour l'analyse de NPs d'Au. Toutefois, le critère 5xET est également utilisé par [Yang et al. \(2016\)](#) pour des NPs d'Au et d'Ag.

Concernant les NPs de TiO₂, leurs distributions en taille sont représentées dans la [Figure 79](#).

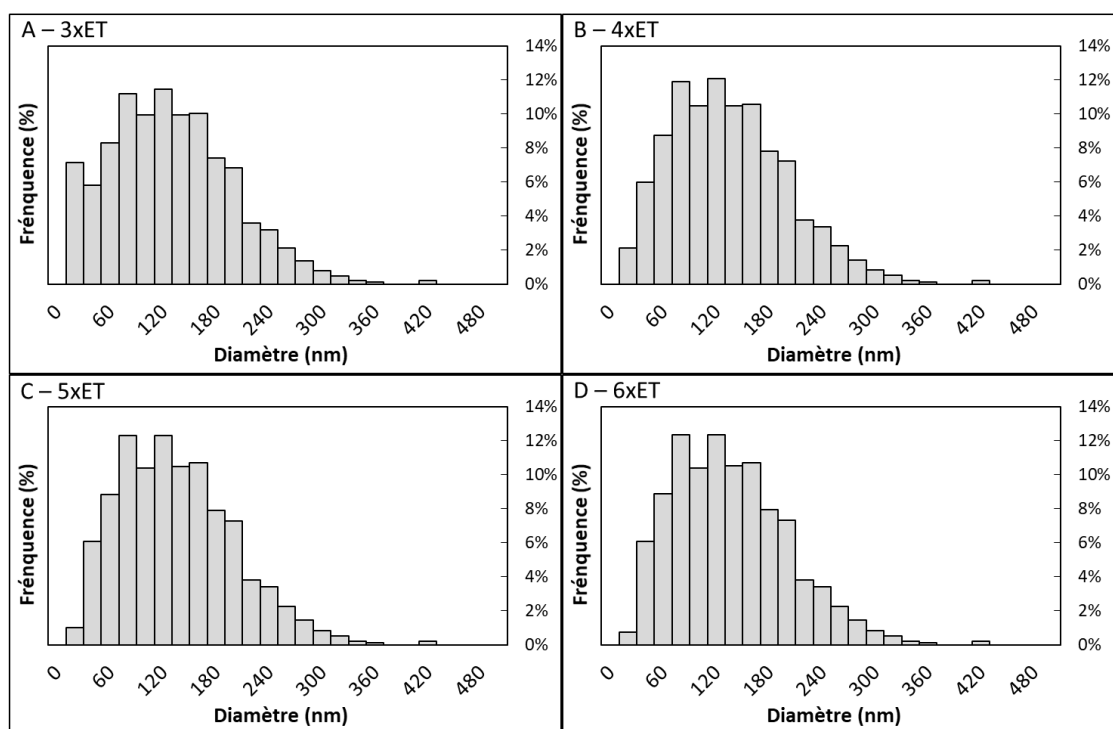


Figure 79 : Distribution en taille des NPs de TiO₂ du NM-100 en fonction de plusieurs paramètres nxET pour calculer le seuil bruit de fond-particule

D'après les observations des distributions en taille, seule celle avec le paramètre 3xET ([Figure 79A](#)) semble prendre en compte du bruit de fond aux alentours de 20-40 nm. Les autres distributions n'étant pas significativement différentes, le paramètre 4xET sera retenu pour les analyses des NPs de TiO₂. D'après le [Tableau 22](#), la plupart des études qui portent sur l'analyse du TiO₂ utilisent le paramètre 3xET ([Lee et al., 2014](#) ; [Tharaud et al., 2017](#) ; [Vidmar et al., 2017](#)) ce qui diffère du résultat obtenu mais qui peut s'expliquer par l'utilisation de différents ICP-MS. Toutefois, une étude utilise également le paramètre 4xET ([Venkatesan et al., 2018b](#)).

V.2.5 Optimisation de la stabilité des suspensions de NPs en fonction du type de flacon

V.2.5.1 Méthode

L'objectif est d'évaluer le type de matériau composant les flacons le plus adapté pour assurer la stabilité des dispersions des particules de TiO₂ afin d'éviter tout biais lié à leur adsorption sur les parois. Trois types de flaconnage ont été étudiés dans ce but : le polypropylène (Perkin Elmer, Courtabœuf, France), le verre (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) et le perfluoroalkoxy (PFA) (Saville, Eden Prairie, USA). Avant de préparer les dispersions de NPs de TiO₂, chaque flacon subit un protocole de nettoyage identique décrit dans la [Figure 80](#).

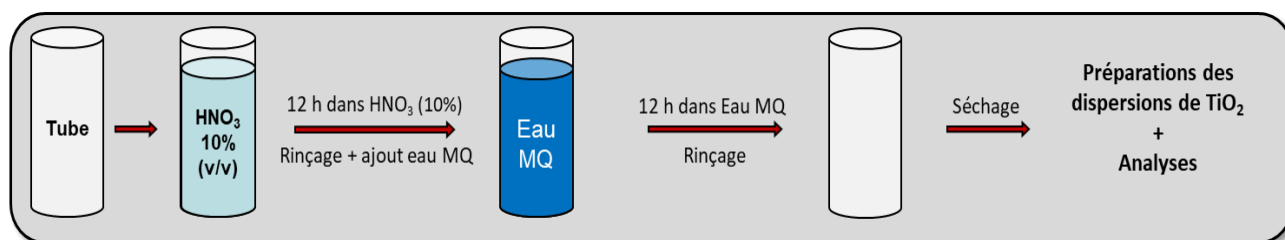


Figure 80 : Protocole de lavage appliqué pour les différents types de flacon

Le NM-100 est alors dispersé dans chaque flacon nettoyé, à une concentration finale de 50 µg/L. Les dispersions sont préparées en triplicata. Toutes les dispersions ont été analysées la même journée pour avoir une sensibilité et un TE identiques. Pour cette optimisation, la quantification a été réalisée en mode conventionnel (analyse de la concentration totale). Les cinq isotopes du titane (⁴⁶Ti, ⁴⁷Ti, ⁴⁸Ti, ⁴⁹Ti, ⁵⁰Ti) ont été analysés avec des temps d'acquisition de 200 ms chacun. Pour la quantification, plusieurs étalons de Ti ionique ont été préparés à des concentrations de 0, 10, 20, 30, 40 et 50 µg/L dans des flacons en polypropylène couramment utilisés au laboratoire.

V.2.5.2 Résultats et discussion

La moyenne de la concentration en TiO₂ calculée pour chaque tube est présentée dans la [Figure 81](#).

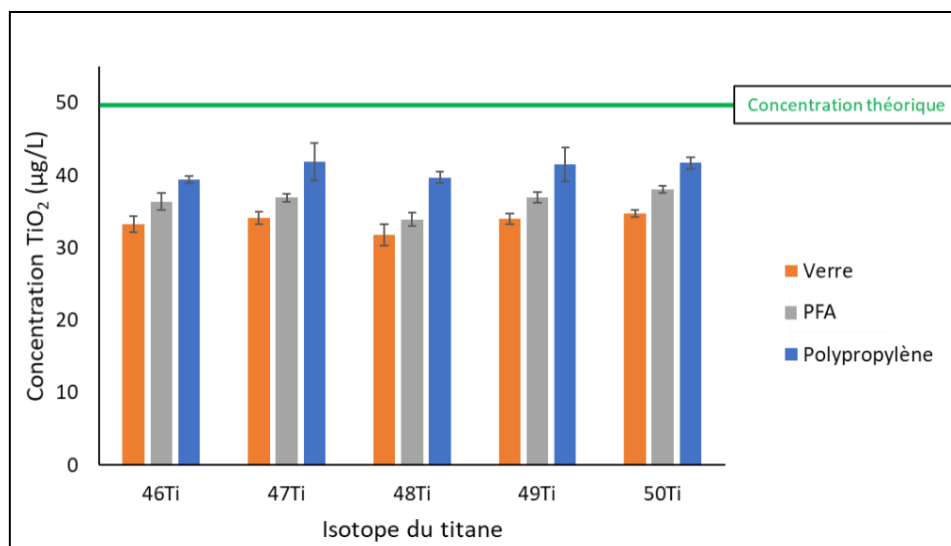


Figure 81 : Concentration moyenne en TiO₂ en fonction des différents types de flacon et isotopes du Ti

Les concentrations de TiO₂ calculées ne montrent pas de différence significative en fonction des différents isotopes de titane. Les résultats obtenus avec les flacons en polypropylène sont les plus proches de la concentration théorique de 50 µg/L. À l'inverse, ceux obtenus avec les flacons en verre sont les plus éloignés de la valeur théorique. Les flacons en PFA permettent d'obtenir des résultats intermédiaires. Il est intéressant de noter qu'aucun résultat n'est égal à la valeur théorique. Cela est probablement dû à l'adsorption des particules sur les parois des flacons et des tubes de prélèvement. Le type de flacon utilisé dans les études n'est pas précisé dans le [Tableau 22](#), mais la plupart utilisent des flacons en polypropylène ou polyéthylène ([Deng et al., 2017](#) ; [Tharaud et al., 2017](#) ; [Vidmar et al., 2017](#) ; [Mackevica et al., 2018](#) ; [Badalova et al., 2019](#)), ce qui conforte les résultats obtenus. Par conséquent, pour la suite des expériences, les dispersions de TiO₂ seront préparées dans des flacons en polypropylène.

V.2.5.3 Influence du lavage des flacons en polypropylène sur la stabilité des NPs

Afin d'améliorer l'efficacité de la préparation des échantillons, l'influence du protocole de lavage des flacons (voir [Figure 80](#)) sur la quantification de la concentration en TiO₂ a été évaluée. Des dispersions de NM-100 à 5 µg/L ont été préparées, ainsi qu'une série d'étalons de Ti ionique allant de 0 à 5 µg/L.

Les échantillons ont été préparés en triplicata et la moyenne de la concentration quantifiée est représentée dans la [Figure 82](#).

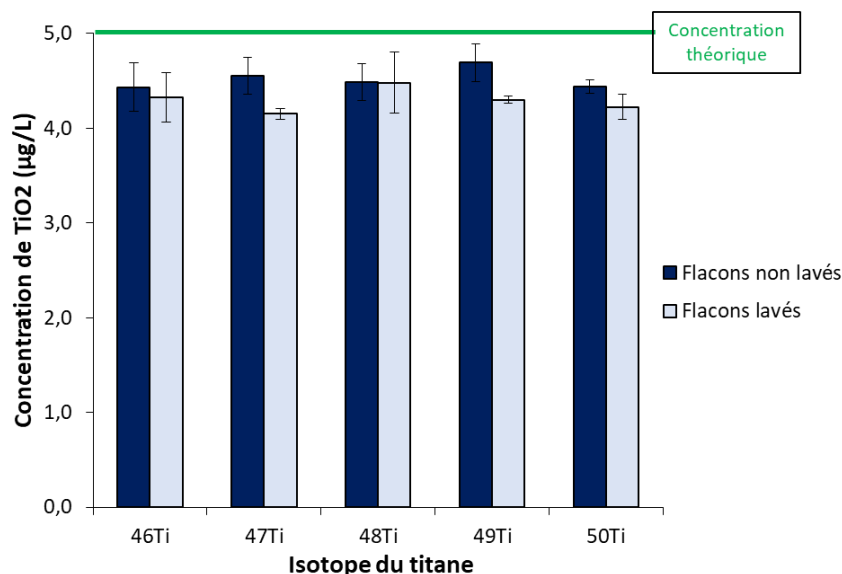


Figure 82 : Concentration des dispersions de TiO₂ dans des flacons de polypropylène ayant subi ou non le protocole de lavage (détaillé dans la [Figure 80](#)) pour les 5 isotopes du titane

D'un point de vue global, il n'y a pas de différence significative entre les résultats des flacons (polypropylène) lavés et non lavés. L'étape supplémentaire du lavage des flacons en polypropylène peut donc être évitée afin de gagner du temps pour la préparation des échantillons. A noter que les concentrations sont toujours inférieures à la concentration théorique, comme pour les dispersions dans les autres flacons ([Figure 81](#)). L'écart relatif moyen à la valeur théorique est de $18 \pm 3\%$ dans la première expérience et de $10 \pm 2\%$ pour celle-ci. Cela pourrait confirmer que la pureté du matériau n'est pas de 100%, ce qui entrainerait un écart systématique par rapport à la concentration théorique.

V.2.6 Détermination du mode d'introduction de l'échantillon dans l'ICP-MS

V.2.6.1 Méthode

Il existe deux modes d'introduction d'échantillon liquide en ICP-MS qui sont (i) le prélèvement via une pompe péristaltique et (ii) le prélèvement par aspiration libre qui déplace l'échantillon grâce à un effet Venturi. Ce dernier mode consiste à plonger le tube de prélèvement directement dans la solution, sans que celui-ci passe par la pompe péristaltique. Le liquide est déplacé grâce au changement de pression

à l'extrémité du nébuliseur. En Sp-ICP-MS, il est recommandé par le constructeur de travailler en mode aspiration libre pour pouvoir s'affranchir du bruit de fond généré par la pompe péristaltique. Cette augmentation du bruit de fond par la pompe, peut entraîner une diminution de la qualité du signal et une augmentation de la LDt. Pour évaluer l'impact de ces deux modes de prélèvement, plusieurs blancs sont analysés en utilisant la pompe péristaltique et en utilisant l'aspiration libre, à un débit d'environ 0,40 mL/min pour ces deux modes d'introduction. Chaque mesure est faite en triplicata.

V.2.6.2 Résultats

L'intensité du signal brut en fonction du temps est représentée en [Figure 83](#). Lorsque la pompe péristaltique est utilisée, le signal est beaucoup plus bruité que celui obtenu dans le cas d'une aspiration libre.

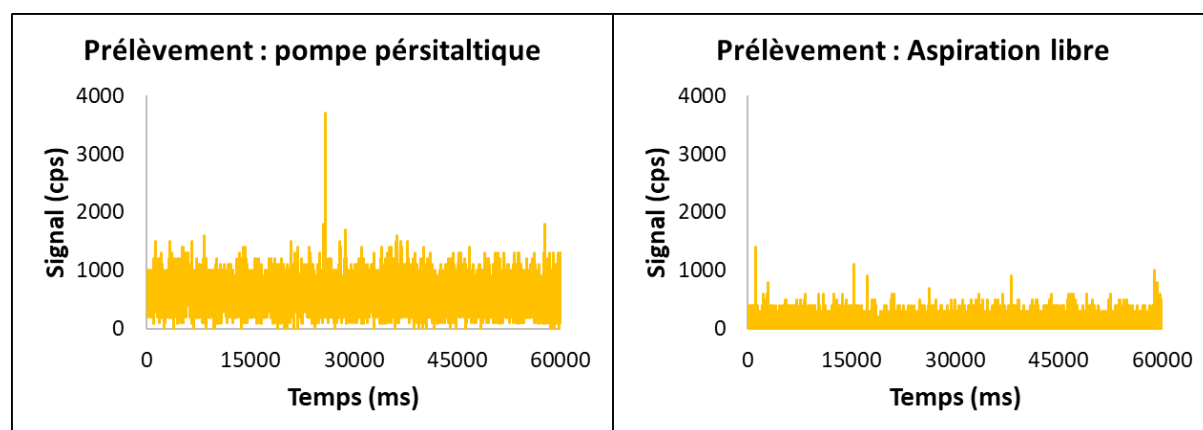


Figure 83 : Comparaison du signal brut d'un blanc en fonction de deux types de prélèvement (avec pompe péristaltique et par aspiration libre)

Les seuils bruit de fond-particule ont été déterminés pour chaque analyse. Il est de 1150 ± 172 cps pour l'analyse avec le prélèvement par pompe péristaltique et de 487 ± 10 cps avec l'aspiration libre. [Venkatesan et al., \(2018b\)](#) ont aussi réussi à diminuer la Limite de Détection en taille (LDt) pour l'analyse de NPs de cuivre en utilisant une introduction d'échantillon par aspiration libre. Par conséquent, pour la suite des expériences, les échantillons seront prélevés par aspiration libre afin de minimiser le seuil bruit de fond-particule.

V.2.7 Optimisation du mode d'analyse de l'ICP-MS

V.2.7.1 Méthode

Pour cette optimisation, deux modes d'analyse de l'ICP-MS sont comparés, à savoir : le mode standard à haute sensibilité (STDS) et le mode discrimination d'énergie cinétique à haute sensibilité (KEDS). Dans le cas de ce dernier, une cellule de collision est utilisée pour diminuer les interférences spectrales polyatomiques, ce qui permet de diminuer le bruit de fond mais diminue également le TE. En mode KEDS, l'hélium est utilisé en tant que gaz de collision. Les étapes décrites dans le [paragraphe V.2.2.2](#) sont réalisées dans les deux modes. Enfin, du NM-100 à 1 µg/L a été analysé en triplicata en STDS et KEDS afin de comparer et choisir le mode le plus adapté. Le TE utilisé est celui dont la méthode de calcul est basée sur la concentration des particules.

V.2.7.2 Résultats

La [Figure 84](#) présente un extrait des données brutes de l'analyse du NM-100 en mode STDS et KEDS. Le mode KEDS a considérablement réduit le bruit de fond et les signaux liés aux particules restent détectables. Les seuils bruit de fond-particule calculés pour les modes STDS et KEDS sont respectivement de 1410 et 102 coups par seconde (cps).

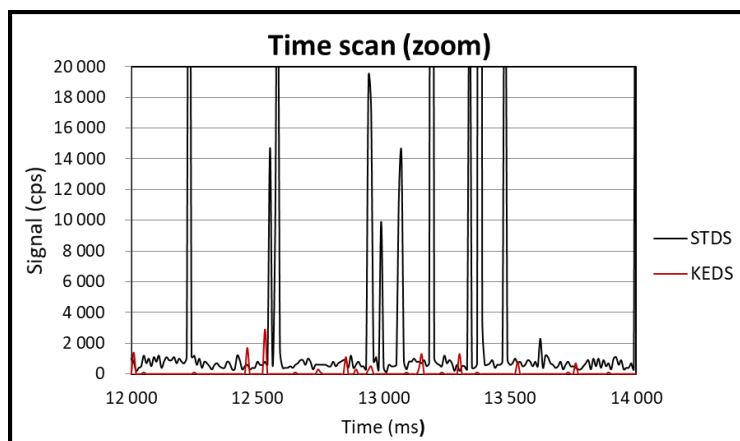


Figure 84 : Extrait des données brutes de l'analyse du NM-100 en mode STDS et KEDS

Bien que le seuil bruit de fond-particule soit plus faible en mode KEDS, sa conversion en LDt (cf. [paragraphe II.9.4.3](#)) présente une valeur de 72,9 nm contre 44,7 nm en STDS. Cela est dû à une diminution de la sensibilité d'un facteur ≈ 40 entre les modes STDS et KEDS. La fraction nanoparticulaire calculée est de 26,4% en mode STDS pour 13,9% en mode KEDS (valeur référence = 27,1%, [Rasmussen et al., 2014](#)). La LDt trop élevée en mode KEDS empêche de détecter

les particules < 70 nm. Par conséquent, le mode d'acquisition KEDS semble moins adapté à l'analyse des NPs de TiO₂ par Sp-ICP-MS, du moins sur le modèle d'ICP-MS utilisé pour cette étude. Le mode STDS est retenu pour la suite de ces travaux.

V.2.8 Choix du milieu de dispersion pour l'analyse de NPs

V.2.8.1 Méthodes

Afin d'évaluer l'impact du solvant de dispersion sur l'analyse Sp-ICP-MS, plusieurs solvants ont été utilisés à savoir : l'eau ultrapure, l'acide nitrique (HNO₃) 0,1% (v/v) et le méthanol (MeOH) 2% (v/v). Lors de la réalisation des différentes étapes décrites dans le [paragraphe V.2.2.2](#), les dispersions étalons de NPs d'or, ainsi que les étalons d'or ioniques, mais aussi les étalons de titane ionique ont tous été préparés avec les trois types de solvants. Toutes les analyses ont été effectuées la même journée et cette expérience a été reproduite une deuxième fois, afin de confirmer les résultats obtenus. En ce qui concerne le traitement de données, la feuille de calcul interne étant en développement en parallèle, la correction concernant les signaux provenant d'une fraction de particule n'avait pas été encore développée. Le TE utilisé est celui basé sur la concentration des particules.

V.2.8.2 Résultats et discussion

Les moyennes des fractions nanoparticulaires et des diamètres du NM-100 sont répertoriées dans la [Figure 85](#).

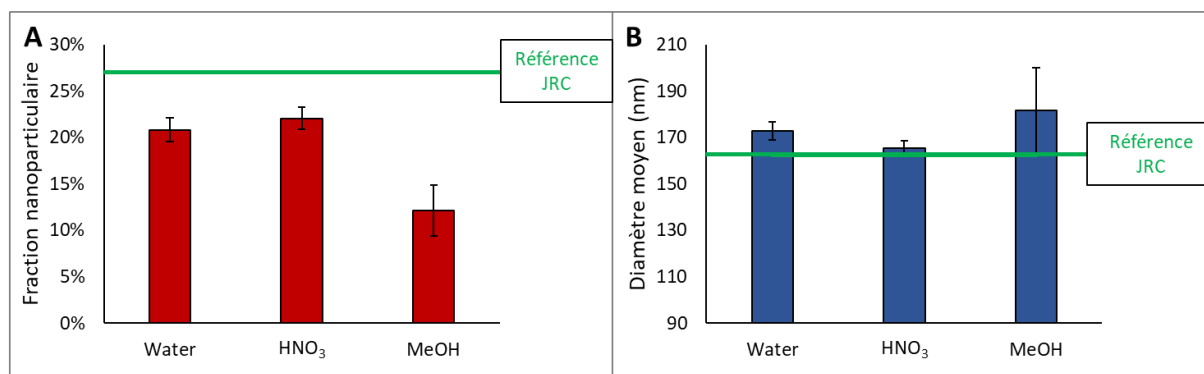


Figure 85 : Fraction nanoparticulaire (A) et diamètre moyen (B) du NM-100 en fonction du solvant de dispersion utilisé. La ligne verte représente la valeur référence du JRC

Concernant la fraction nanoparticulaire du NM-100 (Figure 85A), les résultats obtenus avec l'eau ultrapure et HNO₃ 0,1% ne présentent pas de différence significative puisqu'on obtient respectivement $20,8 \pm 1,3\%$ et $22,1 \pm 1,2\%$. La fraction nanoparticulaire obtenue avec MeOH 2% est plus faible avec une valeur de $12,2 \pm 2,8\%$ ce qui fait que ce résultat est le plus éloigné de la valeur du JRC qui est de 27,1%.

Concernant les résultats du diamètre moyen (Figure 85B), l'utilisation d'HNO₃ 0,1% permet d'obtenir un diamètre de 165 ± 3 nm contre un diamètre de 164,2 nm déterminé par JRC. C'est le résultat le plus proche de la valeur de référence puisqu'avec l'eau ultrapure, le diamètre obtenu est de 173 ± 4 nm, tandis qu'avec MeOH 2%, le diamètre moyen du NM-100 est égal à 182 ± 18 nm. L'utilisation de HNO₃ 0,1% permet donc d'obtenir des résultats se rapprochant le plus des valeurs de référence du JRC.

De plus, lors de l'étalonnage avec le Ti ionique, le HNO₃ permet d'obtenir des droites avec des coefficients de détermination plus élevés (Tableau 23).

Tableau 23 : Comparaison des coefficients de détermination des droites d'étalonnage avec les différents solvants

	Coefficient de détermination		
	Eau	HNO ₃ 0,1%	MeOH 2%
J1	0,9997	0,9999	0,9997
J2	0,9976	0,9999	0,9965

Ces résultats montrent que HNO₃ permet d'avoir également une meilleure stabilité avec le Ti ionique.

D'après les données des études du Tableau 22, plus de 60% des études répertoriées utilisent de l'eau ultrapure pour disperser les NPs. Concernant le TiO₂ cela correspond même à 75%. De la Calle et al. (2017) ont essayé d'utiliser du SDS pour disperser les NPs de TiO₂, mais leur TE se retrouve trop diminué et les auteurs ont préféré utiliser de l'eau ultrapure. Une seule autre étude utilise un autre milieu de dispersion pour le TiO₂, à savoir du Triton X-100 dans le but d'éviter les agglomérations et la précipitation des particules (Mackevica et al., 2018).

Dans notre cas, les sensibilités obtenues avec l'eau et HNO₃ 0,1% sont significativement différentes d'un facteur de 20-30%. Il est donc nécessaire que le titane ionique et les NPs de TiO₂ soient introduits dans le même milieu pour avoir une sensibilité identique. Par conséquent HNO₃ 0,1% (v/v) sera utilisé comme milieu de dispersion des particules et pour les étalonnages ioniques de l'Au et du Ti.

V.2.9 Sélection de l'isotope de titane le plus adapté pour l'analyse des NPs

V.2.9.1 Méthode

Un des inconvénients de la méthode Sp-ICP-MS est de ne pas pouvoir mesurer plusieurs isotopes simultanément. C'est pourquoi il est important de sélectionner l'isotope le plus adapté pour l'analyse des NPs de TiO₂. Le [Tableau 24](#) indique les abondances respectives de chaque isotope du Ti et leurs principaux interférents.

Tableau 24 : Isotopes et principaux interférents du titane

Isotope	Abondance naturelle	Interférent
⁴⁶ Ti	8,25%	³² S ¹⁴ N ; ⁴⁶ Ca ; ¹⁵ N ₂ ¹⁶ O ⁺ ; ¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ⁺ ; ¹² C ¹⁷ O ¹⁷ O
⁴⁷ Ti	7,44%	³² S ¹⁵ N ; ³³ S ¹⁴ N ; ¹² C ³⁵ Cl ; ³¹ P ¹⁶ O ; ³² S ¹⁴ N ¹ H ; ³⁰ Si ¹⁶ O ¹ H ; ¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ⁺ ; ¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ ; ¹¹ B ³⁶ Ar ; ⁷ Li ⁴⁰ Ar ; ¹² C ¹⁸ O ¹⁶ O ¹ H
⁴⁸ Ti	73,72%	³⁴ S ¹⁴ N ; ³³ S ¹⁵ N ; ³² S ¹⁶ O ; ¹⁴ N ¹⁶ O ¹⁸ O ; ¹⁴ N ¹⁷ N ₂ ⁺ ; ³⁶ Ar ¹² C ; ¹² C ₄ ; ⁴⁸ Ca
⁴⁹ Ti	5,41%	³² S ¹⁷ O ; ³³ S ¹⁶ O ; ³² S ¹⁶ O ¹ H ; ³⁵ Cl ¹⁴ N ; ³⁴ S ¹⁵ N ; ³³ S ¹⁶ O ; ¹⁴ N ¹⁷ O ₂ ¹ H ; ³⁶ Ar ¹³ C ; ³⁶ Ar ¹² C ¹ H ; ⁴⁰ Ar ⁹ Be ; ¹² C ³⁷ Cl ; ³¹ P ¹⁸ O ; ¹⁴ N ¹⁸ O ¹⁶ O ¹ H
⁵⁰ Ti	5,18%	³² S ¹⁸ O ; ³³ S ¹⁷ O ; ³⁴ S ¹⁶ O ; ³² S ¹⁷ O ¹ H ; ³⁴ S ¹⁵ O ¹ H ; ³⁶ Ar ¹⁴ N ; ³⁵ Cl ¹⁵ N ; ³⁶ S ¹⁴ N ; ¹⁴ N ³⁵ Cl ¹ H ; ³⁸ Ar ¹² C ; ⁵⁰ Cr ; ⁵⁰ V

L'isotope ⁴⁸Ti est le plus abondant mais est aussi facilement interféré par le calcium (⁴⁸Ca). Pour évaluer l'isotope le moins interféré, plusieurs solutions de Ti ionique (3 µg/L) sont préparées avec une quantité croissante en interférents. Les différents interférents employés sont le soufre, le chlore, le phosphore, le carbone et le calcium. Le [Tableau 25](#) indique les différents produits chimiques utilisés pour obtenir les différents interférents.

Tableau 25 : Liste des interférents et des différents produits chimiques utilisés pour évaluer l'impact des interférents sur les différents isotopes du titane

Interférents	Produit chimique utilisé	Formule chimique
Soufre	Sulfate d'ammonium	(NH ₄) ₂ SO ₄
Chlore	Chlorure de magnésium	MgCl ₂
Phosphore	Hydrogénophosphate de sodium	Na ₂ HPO ₄
Carbone	Acide acétique	CH ₃ COOH
Calcium	Nitrate de calcium	Ca(NO ₃) ₂

Les solutions de titane sont préparées à six niveaux de concentration d'éléments interférents : 0, 1, 10, 25, 50 et 100 mg/L. L'analyse a été effectuée avec les deux modes STDS et KEDS afin d'évaluer en parallèle l'impact du mode KEDS. Le scandium (⁴⁵Sc) est utilisé comme standard interne pour la quantification. Pour cette optimisation, la quantification a été réalisée en mode conventionnel (analyse de la concentration totale) et non en mode Sp-ICP-MS. Les cinq isotopes du titane (⁴⁶Ti, ⁴⁷Ti, ⁴⁸Ti, ⁴⁹Ti, ⁵⁰Ti) ont été analysés avec des temps d'acquisition de 200 ms chacun.

V.2.9.2 Résultats

Les résultats en mode STDS (Figure 86) montrent qu'à partir de 10 mg/L, tous les résultats sont biaisés à cause des interférences spectrales polyatomiques. L'isotope ⁴⁸Ti est le plus interféré dès la présence de 1 mg/L d'interférents, notamment par son isobare, le ⁴⁸Ca.

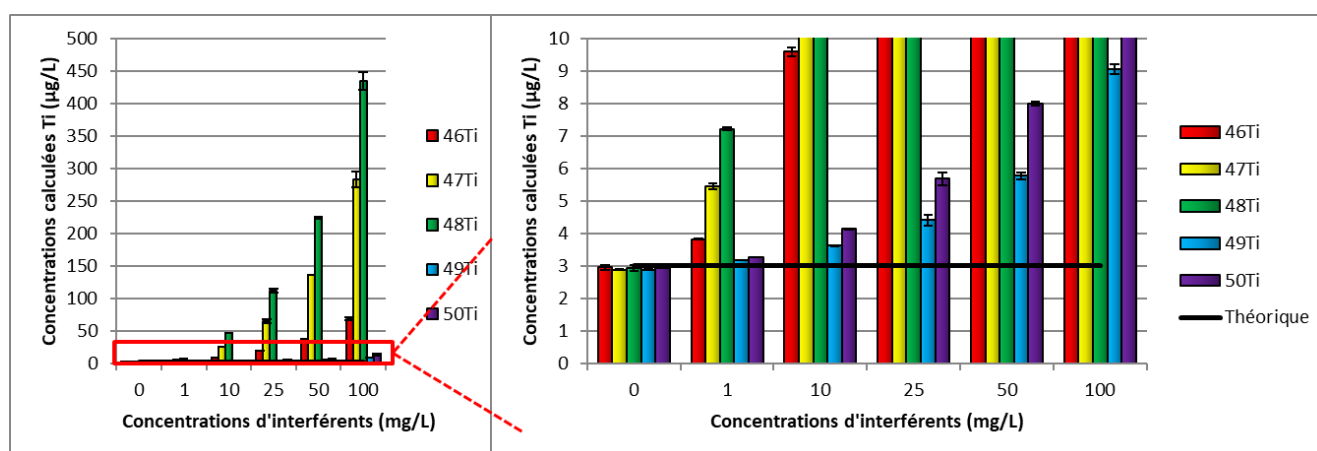


Figure 86 : Concentration de Ti mesurée à partir des différents isotopes en mode STDS en fonction de la concentration en interférents. Le graphique à droite est un agrandissement de celui de gauche.

A l'inverse, le ⁴⁹Ti donnent de meilleurs résultats, avec un écart d'environ 6 µg/L avec l'échantillon le plus concentré en interférents. Par conséquent, en mode STDS, l'ordre des isotopes du plus au moins interféré peut être défini de cette façon : ⁴⁸Ti > ⁴⁷Ti > ⁴⁶Ti > ⁵⁰Ti > ⁴⁹Ti.

Les résultats en mode KEDS (Figure 87) permettent de voir que les concentrations mesurées sont significativement moins biaisées qu'en mode STDS. L'analyse des isotopes ⁴⁹Ti et ⁵⁰Ti permet d'obtenir des concentrations similaires avec la concentration réelle, quelle que soit la concentration en interférent.

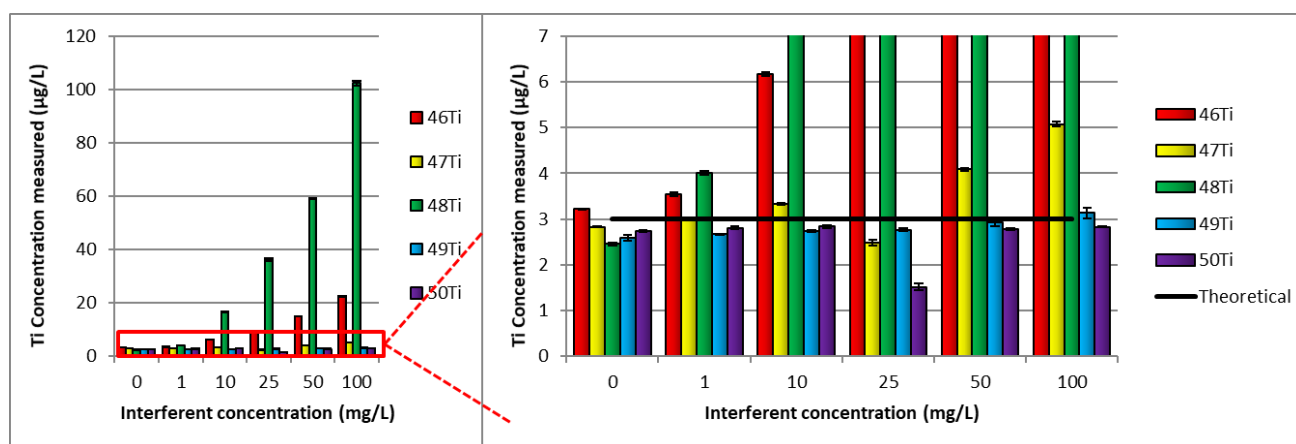


Figure 87 : Concentration de Ti mesurée à partir des différents isotopes en mode KEDS en fonction de la concentration en interférents. Le graphique à droite est un agrandissement de celui de gauche.

Cependant, les isotopes ⁴⁶Ti et ⁴⁸Ti restent interférés à cause de la présence du calcium qui possède des isotopes aux mêmes masses (⁴⁶Ca – 0,004% et ⁴⁸Ca – 0,187%) et qui ne peuvent être éliminés via le mode KEDS. Un nouveau classement des isotopes interférés peut donc être déterminé : ⁴⁸Ti > ⁴⁶Ti > ⁴⁷Ti > ⁵⁰Ti = ⁴⁹Ti.

En conclusion, en présence d'interférents, l'isotope ⁴⁹Ti est préférable pour l'analyse en Sp-ICP-MS. Toutefois, il pourrait s'avérer intéressant d'analyser également le ⁴⁸Ti, qui est l'isotope le plus abondant (Tableau 24). Si aucune interférence n'est détectable, cela nous permettra d'améliorer nos limites de détection. En ce qui concerne le mode, il a été vu dans le paragraphe V.2.7 que le mode KEDS augmentait la Limite de Détection en taille (LDt), de ce fait le mode STDS sera favorisé.

V.2.10 Détermination du calcul de l'efficacité de transport (TE)

V.2.10.1 *Etudes du TE pour la Sp-ICP-MS dans la littérature*

Comme expliqué dans le [paragraphe II.9.1](#), il existe plusieurs méthodes pour déterminer le TE : la méthode gravimétrique, la méthode basée sur la masse des particules et celle basée sur la concentration des particules. Dans la publication de [Pace et al. \(2011\)](#), les trois méthodes ont été étudiées. Ils concluent que la méthode gravimétrique n'est pas précise et préconisent les deux autres méthodes qui sont dites « directes ». Si dans l'étude de [Pace et al. \(2011\)](#) aucune différence significative n'avait été mise en avant entre les méthodes basées sur la concentration et la masse des particules, d'autres études ont à l'inverse noté des écarts entre les valeurs de TE ([Tuoriniemi et al., 2014](#) ; [Aznar et al., 2017](#) ; [Geertsens et al., 2018](#)). Concernant l'étude de [Tuoriniemi et al. \(2014\)](#), ils ne concluent pas sur une méthode plus adaptée que l'autre. Cependant, les distributions en taille des particules obtenues avec le TE issu de la méthode basée sur la masse des particules sont les plus proches de celles obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB). [Aznar et al. \(2017\)](#) ont comparé les valeurs obtenues par les méthodes basées sur la masse et sur la concentration des particules avec plusieurs matériaux de référence, notamment d'Ag et d'Au. Ils ont remarqué que le TE pouvait varier suivant la méthode de calcul (10% d'écart) mais aussi suivant l'élément utilisé (8% d'écart). Ils ont finalement retenu la méthode qui présentait la meilleure répétabilité sur 4 jours d'expérience à savoir, le TE calculé avec la méthode basée sur la concentration. Une autre étude récente de [Geertsens et al. \(2018\)](#) a aussi observé des différences entre les deux méthodes, avec des écarts pouvant aller jusqu'à 39%. A l'inverse, ils ont finalement retenu la méthode basée sur la masse des particules car elle avait une meilleure répétabilité. Il est intéressant de noter que sur les 34 publications répertoriées dans le [Tableau 22](#), la méthode basée sur la concentration est utilisée 15 fois contre 13 fois pour la méthode basée sur la masse, le reste ne mentionnant pas la méthode utilisée. Cela permet de voir qu'il n'y a pas de méthode plus utilisée actuellement. Dans cette étude, seuls les TE issus des méthodes basées sur la masse et la concentration en particules seront étudiés. Les valeurs des TE ont été suivies sur plusieurs semaines, en utilisant le protocole détaillé du [paragraphe V.2.2.2](#).

V.2.10.2 *Comparaison directe des valeurs de TE*

Le TE a été calculé en réalisant le protocole détaillé dans le [paragraphe V.2.2.2.1](#) et en utilisant les deux méthodes directes (masse et concentration) sur 15 jours d'analyses. Les résultats sont présentés dans la [Figure 88](#).

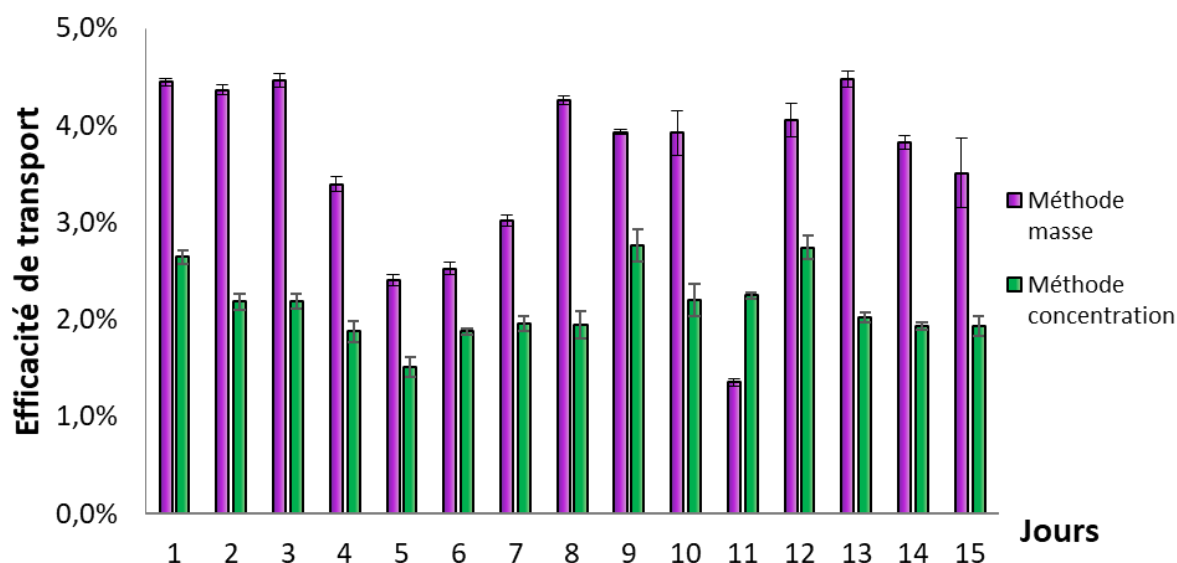


Figure 88 : Suivi de l'efficacité de transport (TE) sur plusieurs jours d'analyse, calculée à partir de la méthode masse et de la méthode concentration

Les valeurs de TE sont significativement différentes, avec un écart pouvant aller jusqu'à 55%. Le Coefficient de Variation (CV) sur l'ensemble des 15 jours est de 16% pour la méthode basée sur la concentration, contre 25% pour la méthode basée sur la masse.

Les écarts obtenus entre les deux méthodes corroborent les résultats obtenus par [Geertsens et al. \(2018\)](#) au niveau des écarts retrouvés entre les deux méthodes. Concernant la répétabilité, nos résultats confirment ceux d'[Aznar et al. \(2017\)](#) qui concluent que la méthode basée sur la concentration des particules est plus répétable. Etant donné qu'un nombre limité de publications s'attarde sur l'optimisation de la détermination du TE et que leurs résultats diffèrent, la suite de cette étude approfondira l'évaluation du TE afin de retenir le plus pertinent. Pour cela, plusieurs échantillons de référence ont été analysés en Sp-ICP-MS et leur diamètre et fraction nanoparticulaire comparés avec les valeurs de référence ou avec les résultats retrouvés dans la littérature. Trois approches sont donc distinguées : l'analyse de plusieurs suspensions de NPs d'or, l'analyse du NM-100 et l'analyse d'un E171, qui est le plus cité dans la littérature.

V.2.10.3 Analyse du NM-100

V.2.10.3.1 Méthodes

Le NM-100 a été analysé et les TE ont été suivis sur plusieurs semaines en utilisant le protocole détaillé en [paragraphe V.2.2.2](#). Pour rappel, le JRC a estimé que le NM-100 possède une fraction nanoparticulaire de 27,1% et un diamètre de 162,4 nm (déterminé par MEB).

V.2.10.3.2 Résultats

Le matériau NM-100 a été analysé à plusieurs reprises et sa fraction nanoparticulaire a été mesurée à partir des deux modes de calcul du TE sélectionnés ([Figure 89](#)).

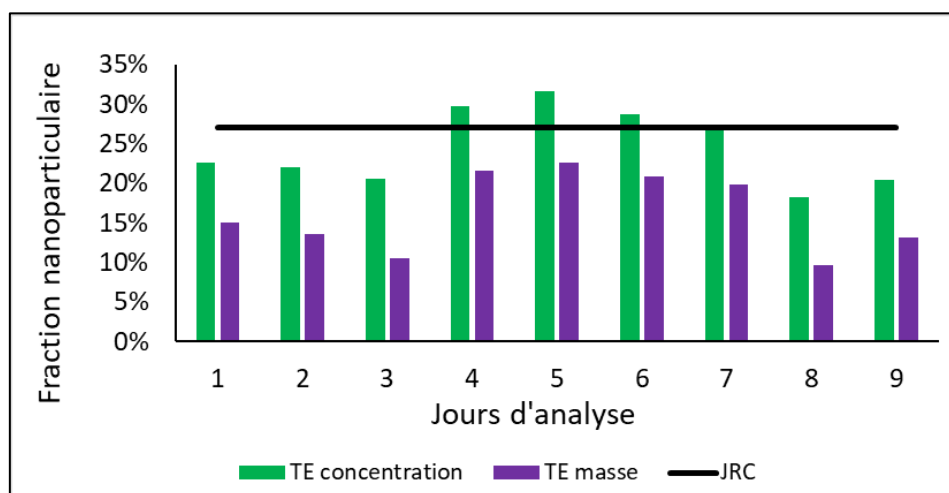


Figure 89 : Comparaison de la fraction nanoparticulaire du NM-100 calculée à partir des deux TE avec la valeur référence obtenue par le JRC

La moyenne des écarts relatifs par rapport à la valeur du JRC est plus faible pour les résultats utilisant le TE calculé avec la méthode basée sur la concentration des particules (17% contre 40%). Cette méthode paraît plus juste que celle basée sur la masse des particules.

Concernant le diamètre moyen des particules mesuré ([Figure 90](#)), les résultats les plus proches du diamètre déterminé par le JRC (164,2 nm) sont aussi obtenus avec le TE calculé via la méthode basée sur la concentration des particules.

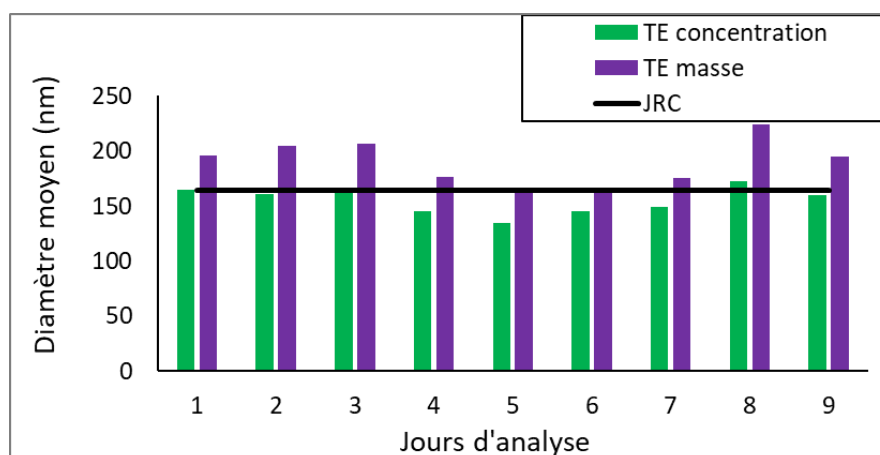


Figure 90 : Comparaison du diamètre moyen du NM-100 mesuré à partir des deux méthodes de calcul du TE et de la valeur estimée par le JRC

L'écart relatif moyen est de 7% avec le TE calculé sur la base de la concentration et de 16% avec le TE calculé sur la base de la masse des particules. Par conséquent, concernant le NM-100, le TE issu de la méthode basée sur la concentration en particules semble être plus pertinent.

V.2.10.3.3 Analyse d'un échantillon de E171

V.2.10.3.4 Méthodes

Dans la littérature, plusieurs E171 ont déjà été analysés mais la provenance de ces échantillons n'est pas toujours précisée. Le E171 produit par Fiorio Colori Spa (Milan, Italie) est cependant le plus cité (Weir et al., 2012 ; Yang et al., 2014 ; Jovanović et al., 2016). Une analyse respectant le protocole complet, décrit en [paragraphe V.2.2.2](#), a été effectuée sur cet échantillon afin de comparer les fractions nanoparticulaires et tailles moyennes obtenues avec les deux méthodes, avec les valeurs de la littérature.

V.2.10.3.1 Résultats

Parmi les études qui ont mesuré le diamètre moyen ainsi que la fraction nanoparticulaire de cet échantillon de E171 produit par Fiorio Colori Spa (Milan, Italie), deux d'entre elles ont utilisé la microscopie électronique à balayage (MET) (Weir et al., 2012 ; Yang et al., 2014) et une a utilisé l'AFM (diamètre) et la DLS (fraction nanoparticulaire) (Jovanović et al., 2016). Le diamètre moyen et la fraction nanoparticulaire déterminés au cours de notre étude à partir des deux TE, ont été comparés avec les valeurs des études précédentes ([Figure 91](#)).

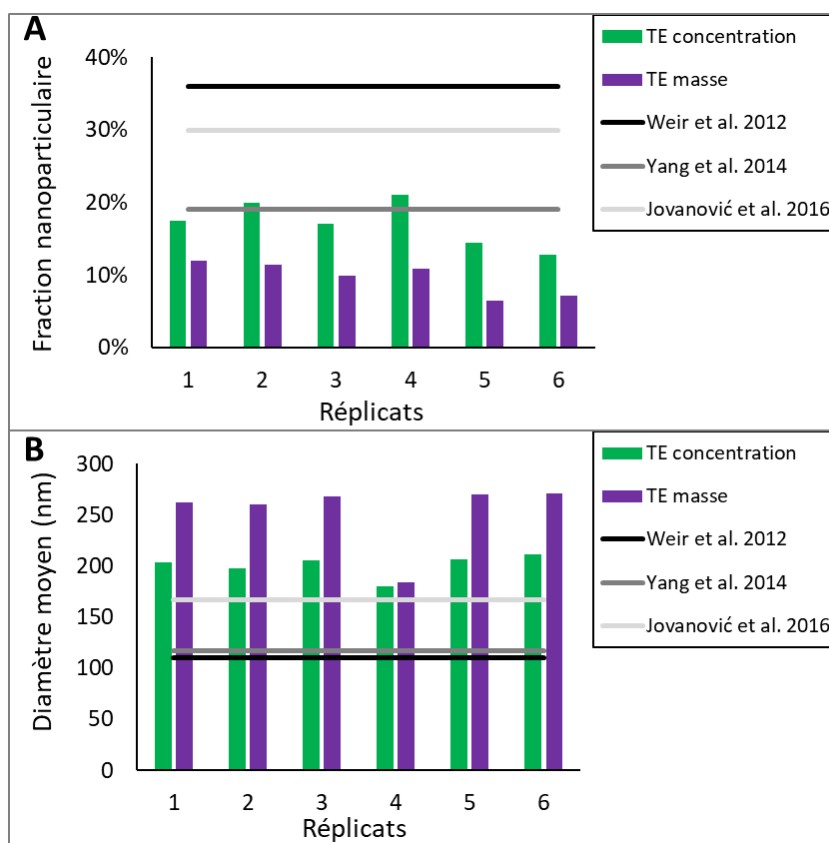


Figure 91 : Comparaison avec la littérature de la fraction nanoparticulaire (A) et de la taille moyenne (B) obtenues avec les TE issus des méthodes basées sur la masse ou la concentration des particules.

Concernant la fraction nanoparticulaire (Figure 91A), les résultats les plus proches des valeurs répertoriées dans la littérature sont obtenus avec le TE calculé par la méthode basée sur la concentration des particules. En effet, le résultat est similaire à celui déterminé par Yang et al. (2014) tandis que les résultats avec le TE calculé avec la méthode basée sur la masse des particules présente un écart significatif de 50%. Concernant la taille moyenne (Figure 91B), les résultats sont proches de ceux obtenus par Jovanović et al. (2016) avec le TE basé sur la concentration en particules. Dans l'étude de Jovanović et al. (2016), ils précisent qu'ils sont assez différents des deux autres études (Weir et al., 2012 ; Yang et al., 2014) mais que cela peut provenir de la différence entre les lots. Toutefois, les valeurs obtenues avec le TE basé sur la masse semblent surestimer le diamètre moyen par rapport aux autres résultats de la littérature. Enfin, il est important de noter que l'écart de diamètre obtenu avec les deux types de TE peut atteindre 50 nm, ce qui est très significatif par rapport aux ordres de grandeurs des diamètres. Par conséquent, avec l'analyse de cet échantillon de E171, la méthode la plus pertinente pour calculer l'efficacité de transport semble être également la méthode basée sur la concentration en particules. Étant donné que les résultats de la Figure 91 sont issues de techniques différentes, il est délicat de tirer des conclusions pertinentes. Ces travaux seront donc considérés

comme une aide à la décision concernant le type de calcul du TE, mais des études plus poussées sont nécessaires à cette optimisation.

V.2.10.3.2 Analyses de nanoparticules d'or de référence

V.2.10.3.3 Méthodes

Dans les théories de la méthode Sp-ICP-MS, le TE est le même pour n'importe quel élément et pour n'importe quel type de taille de NPs. C'est pourquoi le protocole de détermination du TE décrit dans le [paragraphe V.2.2.2.1](#) ne s'effectue qu'avec une seule population de NPs d'or (50 nm). Dans le cadre de l'étude sur le TE, ce protocole a été appliqué à d'autres suspensions de NPs d'or ayant des diamètres différents (20, 40, 50, 60 et 80 nm) provenant de BBI Solutions (Cardiff, UK) afin de déterminer si le diamètre des NPs peut influencer les résultats du TE. De même, leur diamètre sera calculé à partir des deux TE puis comparé aux valeurs fournies par le producteur. Cela permettra de comparer la justesse des deux méthodes.

V.2.10.3.4 Résultats

Les TE sont comparés dans la [Figure 92](#) et les résultats montrent qu'il y a bien une différence significative entre les deux types de méthode de calcul du TE pour les particules de 40, 50 et 60 nm de diamètre. Pour les NPs de 20 et 80 nm de diamètre, les deux méthodes fournissent un TE similaire.

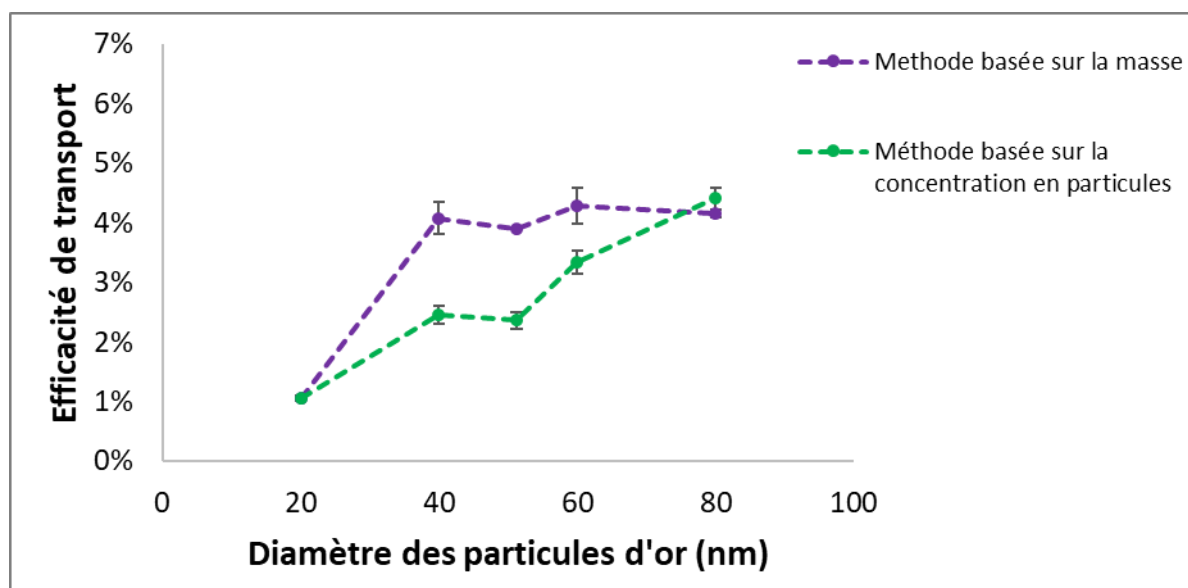


Figure 92 : Efficacité de transport déterminée par les méthodes basées sur la masse et sur la concentration en particules pour différentes tailles de NPs d'or

Concernant la méthode basée sur la concentration en particules, les résultats indiquent clairement qu'il y a une corrélation entre le diamètre des particules et le TE. Par conséquent, le taux de nébulisation serait plus efficace pour des particules de plus grande taille. Si ce comportement se transpose aux particules de TiO₂, alors il faudrait appliquer un facteur correctif pour établir la distribution en taille, ce qui remettrait en cause les traitements de données utilisés en Sp-ICP-MS. Dans la théorie de la méthode Sp-ICP-MS (Pace et al., 2011), le TE est utilisé pour la conversion du signal des particules en masse. Il est aussi utilisé pour calculer la concentration totale massique ou en nombre. Or, comme les résultats le montrent (Figure 92), il est possible qu'il faille distinguer plusieurs corrections liées au TE plutôt que d'utiliser une seule valeur. Les valeurs de TE de la méthode basée sur la concentration ont été comparées avec les résultats de Geertsen et al. (2018) dans la Figure 93.

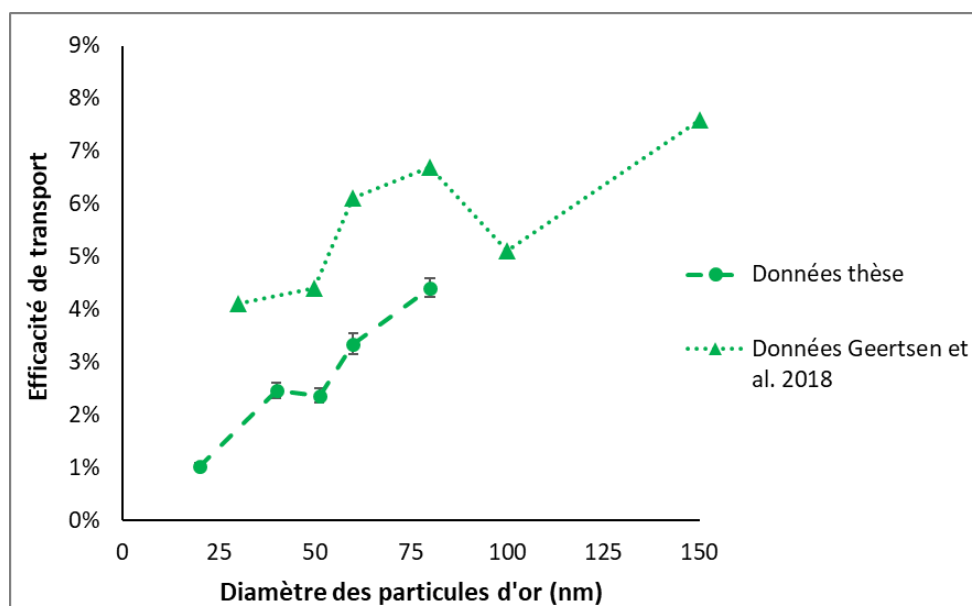


Figure 93 : Comparaison du TE (concentration) avec celui obtenu par Geertsen et al. (2018) en fonction du diamètre des NPs d'or

Dans leur étude, les auteurs travaillent avec le même modèle d'ICP-MS (iCapQ). La corrélation entre le TE et la taille des NPs est moins mise en avant, mais il est intéressant d'observer que les plus petites particules fournissent le plus petit TE, tandis que les plus grosses particules obtiennent le TE le plus élevé. Si cette tendance venait à se vérifier avec d'autres études sur différents ICP-MS, alors, il faudrait envisager de nouveaux calculs pour corriger la concentration de NPs ainsi que la distribution en taille.

Concernant la méthode basée sur la masse (Figure 92), le TE obtenu semble être stable ($\approx 4\%$) sauf pour les NPs de 20 nm. Pour cette dernière méthode, les résultats liés aux différentes tailles de NPs

d'or ont aussi été rassemblés (Figure 94) afin de vérifier la pertinence du point concernant les particules de 20 nm de diamètre, de la Figure 92.

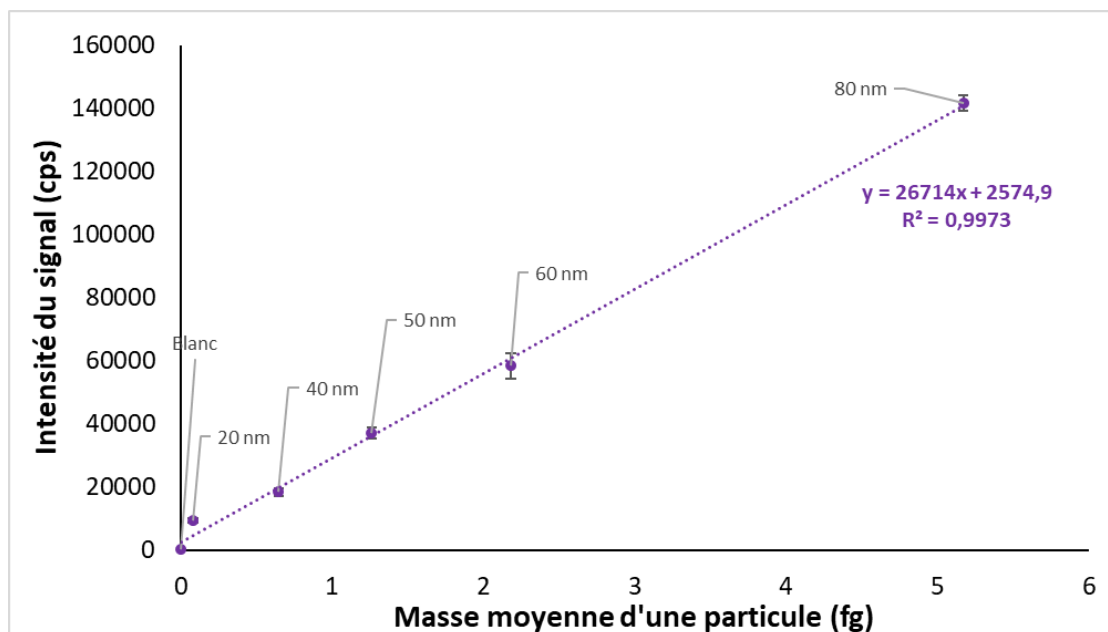


Figure 94 : Etalonnage à partir de différentes tailles de NPs d'or (indiquées pour chaque point) pour la détermination du TE avec la méthode basée sur la masse des NPs

Pour rappel, la droite de la Figure 94 est obtenue grâce à la méthode basée sur la masse décrite dans le paragraphe II.9.1.2. Les résultats mettent en évidence que le point concernant les NPs de 20 nm est le moins bien corrélé par rapport au reste des points. Par conséquent, les NPs d'or de 20 nm ne sont probablement pas adaptées pour la mesure du TE. Ces résultats (Figure 92) sont similaires à ceux de Fuchs et al. (2018) et Geertsen et al. (2018) qui trouvent un signal plus faible à partir de 100 nm de diamètre. Cela permet aussi de confirmer que le TE obtenu par la méthode basée sur la masse ne varie pas selon la taille de la particule jusqu'à un diamètre de 80 nm (Figure 92).

Enfin, les diamètres des différentes NPs d'or (20-40-50-60-80 nm) ont été calculés à partir des deux TE et ces diamètres ont été comparés au diamètre de référence fourni par le producteur ([Figure 95](#)).

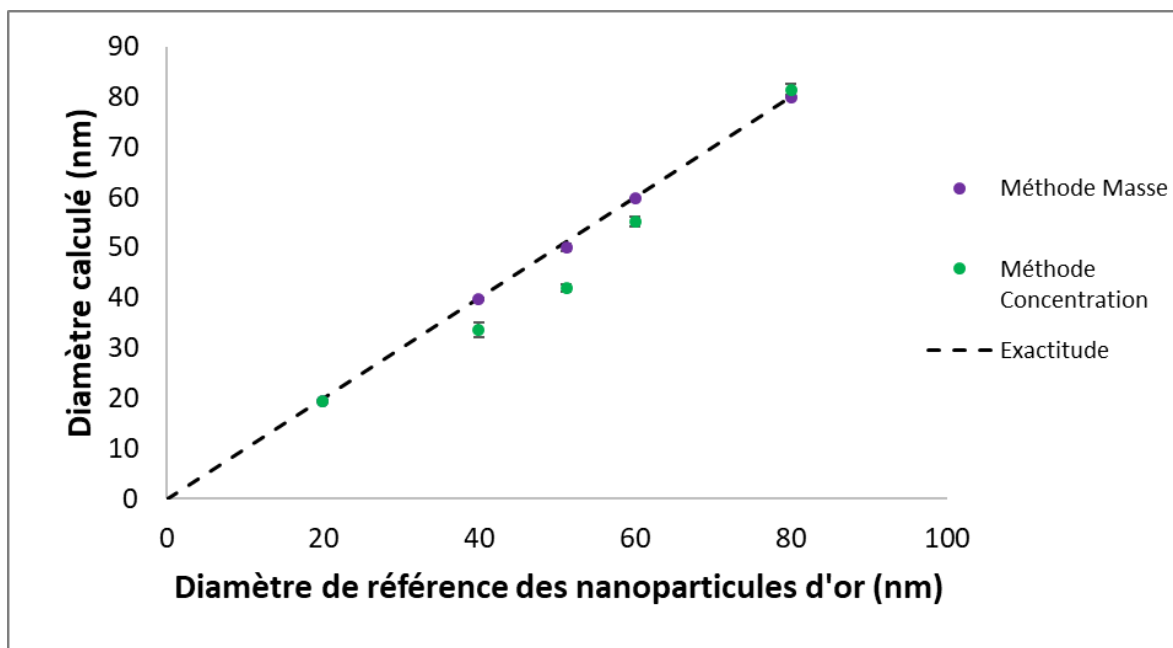


Figure 95 : Comparaison des diamètres des NPs d'or de référence avec les diamètres calculés à partir des TE basés sur la méthode de la masse et sur la méthode de la concentration

La méthode basée sur la masse des particules permet d'avoir un résultat similaire pour toutes les tailles de NPs d'or, même avec celles de 20 nm (points confondus à 20 nm). Ce qui montre que pour des NPs d'or, la différence de calcul du TE n'a pas de réel impact sur la mesure du diamètre des petites NPs. Pour la méthode basée sur la concentration, celle-ci entraîne des biais qui peuvent être significatifs pour les NPs de diamètre 40, 50 et 60 nm. Cependant, comme attendu pour les NPs de 80 nm, le résultat est similaire au résultat de la méthode de la masse car les TE sont similaires ([Figure 92](#)). A partir de ces données obtenues sur les NPs d'or, il est donc plus pertinent d'utiliser la méthode basée sur la masse des particules plutôt que celle basée sur leur concentration.

V.2.10.4 Conclusion concernant la mesure du TE

Trois approches ont été comparées afin d'évaluer la méthode la plus pertinente pour calculer le TE. Néanmoins, la conclusion diffère selon les différentes expériences menées ([Tableau 26](#)).

Tableau 26 : Choix retenu pour la méthode de calcul du TE en fonction des analyses effectuées

	Méthode basée sur la masse des particules	Méthode basée sur la concentration des particules
NM-100		X
E171		X
NPs d'or	X	

La méthode de calcul du TE basée sur la masse des particules semble plus adaptée pour l'analyse des NPs d'or, tandis que la méthode basée sur la concentration en particules semble plus adaptée pour le TiO₂ (NM-100 et E171) ([Tableau 26](#)). Les échantillons alimentaires seront analysés en utilisant les deux méthodes de calcul du TE, afin de comparer les écarts de résultats que cela peut engendrer. Toutefois, en tenant compte que le but principal de ces travaux de thèse est la caractérisation de NPs de TiO₂, c'est la méthode basée sur la concentration qui sera favorisée pour exploiter les résultats obtenus.

Il est important de noter que ces observations mettent en avant une limite actuelle de la méthode Sp-ICP-MS sur la justesse des analyses à cause du manque de MRC en NPs de TiO₂ qui permettrait de réaliser une meilleure optimisation de la méthode Sp-ICP-MS.

Actuellement, dans la littérature, les distributions en taille obtenues par Sp-ICP-MS ne prennent pas en compte le fait que des particules de tailles différentes puissent avoir des efficacités de transport différentes alors que les résultats de la [Figure 93](#) (méthode basée sur la concentration) laisse envisager cette possibilité. Si tel est bien le cas, alors il sera difficile de généraliser une méthode de traitement de données en Sp-ICP-MS, ce qui limiterait considérablement l'utilisation de cette technique. C'est pourquoi il est nécessaire de poursuivre les études sur le TE, afin de mieux comprendre le comportement des NPs, l'influence sur la justesse du résultat et d'adapter le traitement de données en conséquence et en toute connaissance.

V.2.11 Bilan

Cette première partie a présenté les différentes optimisations de la méthode Sp-ICP-MS qui ont été réalisées. Pour caractériser les particules de TiO₂ contenues dans des échantillons alimentaires, les paramètres analytiques utilisés sont décrits dans le [Tableau 27](#).

Tableau 27 : Liste des paramètres optimisés pour la méthode Sp-ICP-MS

Optimisation	Paramètre retenu
Temps d'acquisition	10 ms
Critère calcul seuil bruit de fond-particule	Au : 6xET TiO ₂ : 4xET
Type de flacon	Polypropylène sans lavage
Mode d'introduction de l'échantillon	Aspiration libre
Mode d'analyse	STDS
Milieu de dispersion	HNO ₃ 0,1% v/v
Isotope de Ti analysé	⁴⁹ Ti, ⁴⁸ Ti
Mode de calcul du TE	Méthode basée sur la concentration des particules

V.3 Analyse d'échantillons alimentaires

V.3.1 Choix des denrées alimentaires

La première étude parue concernant l'analyse des NPs de TiO₂ dans les aliments a été réalisée par [Weir et al. \(2012\)](#). Cette étude s'est focalisée sur l'analyse de produits du marché américain comprenant de nombreux produits de confiserie (chewing-gum, chocolats), une crème de noix de coco et une crème de café ([Figure 96](#)).

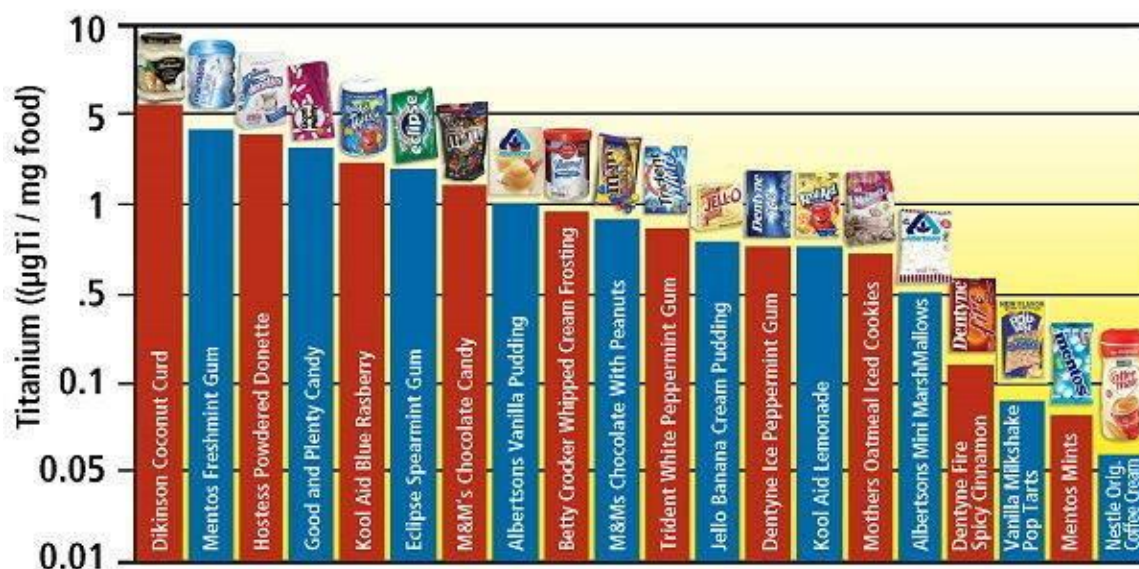


Figure 96 : Concentration de titane (forme non précisée) dans les aliments analysés par [Weir et al. \(2012\)](#) – (figure provenant de Tg 5 Stelle (média italien))

La grande majorité des produits analysés par [Weir et al. \(2012\)](#) ne se trouve pas sur le marché français. Malgré l'absence de base de données officielle sur les denrées alimentaires contenant du E171, il existe des bases de données mises en place par différentes associations de consommateurs. C'est le cas d'« Open Food Facts » ([Open Food Facts](#)) qui met à disposition une base de données en accès libre qui répertorie les ingrédients de produits alimentaires, dont le E171. L'association « Agir pour l'Environnement » ([Agir pour l'Environnement](#)) propose aussi une liste de produits contenant potentiellement des nanoparticules, dont l'additif E171 mais aussi E172 et E551. Par conséquent, le choix des aliments analysés s'est appuyé sur ces deux bases de données. Cependant, suite à la parution d'études sur la toxicité des NPs de TiO₂ ([Bettini et al., 2017](#)), ainsi qu'à des communications d'associations de consommateurs ([VeilleNano, 2010](#)), certains produits se sont vus retirés du marché durant ces travaux de thèse. Les aliments choisis et achetés dans plusieurs supermarchés français en 2018 sont donc présentés dans le [Tableau 28](#). Nous avons sélectionné une dizaine d'échantillons parmi ceux analysés par [Weir et al. \(2012\)](#) comme les chewing-gums, dragées et chocolats. Les autres

échantillons n'ont jamais été analysés mais sont susceptibles d'en contenir (selon [Agir pour l'Environnement](#)). Enfin, un échantillon a été sélectionné après avoir eu connaissance que le E171 ait été retiré de ce produit, afin de le vérifier.

Tableau 28 : Liste des produits alimentaires retenus pour l'analyse des NPs de TiO₂ par Sp-ICP-MS

Code	Produit	E171 indiqué sur l'étiquette	Mention [nano] présente	Justification du choix
E1	 Chewing-gum , menthe verte - Freudent	Oui	Non	Matrices déjà analysées (Tableau 5)
E2	 Chocolat , m&m's Peanut, m&m's	Oui	Non	
E3	 Chewing-gum , Hollywood MAX, Fraise-citron - Hollywood	Oui	Non	
E4	 Dragée , Skittles Original, Skittles	Oui	Non	
E5	 Dessert glacé , Création citron agrumes - Lenôtre	Oui	Non	Produits suspectés de contenir des NPs de TiO ₂ d'après la base de données Agir pour l'Environnement
E6	 Décoration , Disque de gâteau comestible - Dekora	Oui	Non	
E7	 Décoration , Crayon pâtissier décoratif goût vanille - Vahiné	Oui	Non	
E8	 Gâteau , Napolitain signature chocolat poire - LU	Oui	Non	
E9	 Dessert glacé , Assortiment de mignardises – Marque repère	Oui	Non	Produit dont le E171 a été retiré et confirmé sur l'étiquette
E10	 Gâteau , Assortiment de doonys - Auchan	Oui	Non	
E11	 Garniture , Garniture pour bouchées à la reine – Petitjean	Non	Non	

V.3.2 Protocole d'extraction des NPs de TiO₂ des échantillons alimentaires

Il existe plusieurs protocoles d'extraction développés pour extraire des NPs de TiO₂ contenues dans des matrices alimentaires. La plupart sont basés sur des extractions enzymatique (Loeschner et al., 2018), acide (Peters et al., 2014b) ou par solvant et centrifugation (Chen et al., 2013). Cette étape peut s'avérer complexe car le rendement de l'extraction doit être répétable quelle que soit la matrice, tout en préservant la forme et la taille des NPs.

Malgré tout, nous avons décidé de tester en première intention une approche simple et pragmatique, basée sur le début du protocole de Chen et al. (2013) qui consiste à diluer une fraction d'aliment dans de l'eau sans étape de centrifugation. Alors que Chen et al. (2013) effectuent ensuite plusieurs lavages du culot, qui contient plus de 95% des particules, par centrifugations successives avec plusieurs solvants (eau, acétone, éthanol) afin d'éliminer les autres additifs alimentaires comme l'aspartame, le maltitol et le xylitol. Le protocole testé est détaillé dans la Figure 97.

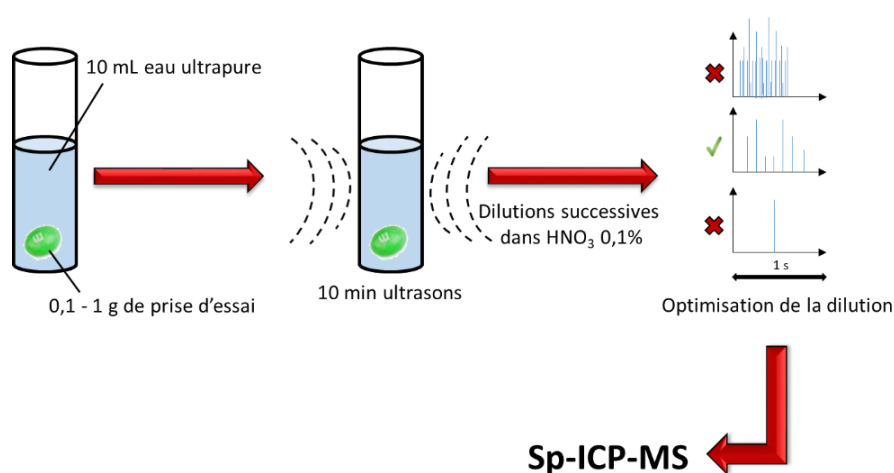


Figure 97 : Protocole d'extraction des NPs de TiO₂ testé sur des aliments

La fraction d'échantillon prélevée varie suivant le type d'échantillon. Pour les échantillons de E1 à E4, une unité complète est utilisée ; tandis que pour les échantillons E5, E8, E9 et E10, une fraction non représentative de la totalité de l'échantillon a été prélevée pour l'extraction. Pour les échantillons restants, E6, E7 et E11, une prise d'essai entre 0,1 et 1 g a été réalisée. Le Tableau 29 résume les fractions prélevées pour chaque échantillon.

Tableau 29 : Fraction du produit alimentaire prélevée pour l'analyse des NPs de TiO₂ par Sp-ICP-MS

Code		Produit	Fraction prélevée	Représentativité de l'aliment entier
E1		Chewing-gum , menthe verte - Freedent	Un chewing-gum	Oui
E2		Chocolat , m&m's Peanut, m&m's	Un m&m's	Oui
E3		Chewing-gum , Hollywood MAX, Fraise-citron - Hollywood	Un chewing-gum	Oui
E4		Dragée , Skittles Original, Skittles	Un Skittles	Oui
E5		Dessert glacé , Création citron agrumes - Lenôte	Ecritures sur la plaquette en chocolat	Non
E6		Décoration , Disque de gâteau comestible - Dekora	Plusieurs morceaux du disque	Oui
E7		Décoration , Crayon pâtissier décoratif gout vanille - Vahiné	Pâte	Oui
E8		Gâteau , Napolitain signature chocolat poire - LU	Ecriture sur le chocolat	Non
E9		Dessert glacé , Assortiment de mignardises – Marque repère	Dorures sur le chocolat	Non
E10		Gâteau , Assortiment de doonys - Auchan	Glaçage	Non
E11		Garniture , Garniture pour bouchées à la reine – Petitjean	Sauce et garniture	Oui

Les ultrasons ont été utilisés pour accélérer l'extraction des particules. Seul E2 est passé moins de 10 min aux ultrasons (3 min) pour éviter que le chocolat ne fonde et ne se mélange à la solution. Les dilutions ont été faites dans l'acide nitrique à 0,1% (v/v) et adaptées en fonction de la concentration en particules. En effet, comme expliqué dans le [paragraphe II.9.3](#), la concentration en particules nécessite d'être optimisée afin de minimiser la détection de coïncidence. Pour ce faire, tous les échantillons sont dilués dans un premier temps à un facteur 100 000 en réalisant deux dilutions successives d'un facteur 100 (100 µL prélevés et dilués dans 10 mL de HNO₃ 0,1%). La solution est une première fois analysée puis, suivant la concentration en particules calculée, la dilution de l'échantillon est adaptée pour obtenir une concentration en particules comprise entre 25 000 et 100 000 particules/mL pour correspondre à un taux de signaux recommandé par [Montaño et al., \(2014\)](#) et [Huynh et al., \(2016\)](#). Finalement, Les facteurs de dilution peuvent varier entre 1 500 et 500 000 suivant les échantillons.

Aucune étape de filtration n'a été effectuée, considérant que le facteur de dilution était suffisamment important pour éviter la présence de résidus solides dans la solution finale.

V.3.3 Échantillons alimentaires

V.3.3.1 Méthode

Tous les échantillons ont été préparés en triplicata comme indiqué dans le [paragraphe V.3.2](#) et le protocole d'analyse par Sp-ICP-MS a été appliqué comme le décrit le [paragraphe V.2.2.2](#). Chaque triplicata d'extraction a été analysé en double, ce qui fait un total de 6 mesures par produit alimentaire. Les isotopes analysés sont le ⁴⁸Ti, le plus abondant naturellement et le ⁴⁹Ti, qui est le moins interféré.

V.3.3.2 Résultats et discussion

Pour chaque réplique, le nombre de particules détectées allait de 600 à 1 600 particules, ce qui correspond bien à la concentration en particules dans la solution (25 000-100 000 particules/mL) avec un TE ≈ 2%. Ainsi, chaque paramètre obtenu est issu d'une analyse de 3 600 particules minimum (600 x 6 répétitions). Les [Tableaux 30 et 31](#) résument toutes les données obtenues concernant les différents produits alimentaires analysés avec les isotopes ⁴⁸Ti et ⁴⁹Ti, en se basant sur les deux méthodes de calcul du TE. Pour les échantillons E5, E8, E9 et E10, une fraction spécifique a été prélevée pour l'extraction (ex : écritures à la surface pour le gâteau Napolitain (E8) ou glaçage pour le gâteau doonys (E10)). Ainsi, les concentrations particulières mesurées ne sont pas représentatives de l'aliment dans sa globalité. C'est pourquoi il est indiqué NR pour ces échantillons.

Tableau 30 : Résultats obtenus sur différents produits alimentaires avec un TE calculé via la méthode basée sur la masse des particules

	TE de la méthode basée sur la masse des particules																					
Echantillon	1 - 		2 - 		3 - 		4 - 		5 - 		6 - 		7 - 		8 - 		9 - 		10 - 		11 - 	
Isotopes	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti
Diamètre moyen (nm)	180 ± 3	176 ± 4	146 ± 3	127 ± 4	157 ± 6	147 ± 5	185 ± 5	167 ± 5	157 ± 2	139 ± 3	247 ± 12	231 ± 8	198 ± 6	195 ± 4	169 ± 5	158 ± 7	142 ± 4	130 ± 4	115 ± 5	101 ± 4	ND	ND
Diamètre le plus fréquent (nm)	139 ± 5	136 ± 3	106 ± 2	92 ± 2	111 ± 3	105 ± 2	140 ± 6	121 ± 5	118 ± 2	102 ± 1	210 ± 19	191 ± 17	155 ± 6	158 ± 4	125 ± 5	115 ± 5	109 ± 2	99 ± 3	93 ± 4	80 ± 4	ND	ND
Fraction nanoparticulaire (%)	19 ± 2	17 ± 2	32 ± 3	45 ± 2	29 ± 3	32 ± 2	15 ± 3	25 ± 3	20 ± 3	35 ± 2	9 ± 2	15 ± 2	11 ± 2	12 ± 1	20 ± 3	26 ± 3	28 ± 2	37 ± 3	49 ± 5	58 ± 4	ND	ND
Concentration nanoparticulaire (x10 ⁹ NPs/g)	16 ± 2	19 ± 2	12 ± 1	18 ± 1	7 ± 1	8 ± 1	0,033 ± 0,005	0,056 ± 0,007	NR	NR	10 ± 1	16 ± 1	20 ± 2	21 ± 4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	ND	ND
LDt (nm)	54 ± 1	39 ± 1	61 ± 3	38 ± 1	53 ± 1	44 ± 1	68 ± 3	44 ± 2	65 ± 2	39 ± 1	68 ± 1	47 ± 1	57 ± 1	37 ± 1	58 ± 1	41 ± 4	58 ± 1	36 ± 1	54 ± 3	33 ± 2	ND	ND

Tableau 31 : Résultats obtenus sur différents produits alimentaires avec un TE calculé via la méthode basée sur la concentration des particules

	TE de la méthode basée sur la concentration des particules																					
Echantillon	1 - 	2 - 	3 - 	4 - 	5 - 	6 - 	7 - 	8 - 	9 - 	10 - 	11 - 											
Isotopes	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti
Diamètre moyen (nm)	152 ± 2	148 ± 3	115 ± 2	100 ± 3	144 ± 4	133 ± 5	151 ± 4	137 ± 4	133 ± 2	120 ± 2	203 ± 10	186 ± 6	169 ± 5	167 ± 3	134 ± 4	126 ± 5	128 ± 3	118 ± 4	101 ± 2	84 ± 2	ND	ND
Diamètre le plus fréquent (nm)	115 ± 3	113 ± 2	92 ± 2	76 ± 2	104 ± 2	98 ± 2	113 ± 2	102 ± 3	104 ± 1	92 ± 2	165 ± 17	148 ± 12	127 ± 4	127 ± 3	103 ± 3	96 ± 3	102 ± 2	93 ± 2	87 ± 2	65 ± 3	ND	ND
Fraction nanoparticulaire (%)	25 ± 2	27 ± 2	49 ± 3	59 ± 2	34 ± 3	38 ± 2	33 ± 2	44 ± 3	33 ± 2	44 ± 2	15 ± 2	22 ± 3	17 ± 2	18 ± 2	33 ± 4	39 ± 3	35 ± 2	44 ± 3	58 ± 4	68 ± 3	ND	ND
Concentration nanoparticulaire (x10 ⁹ NPs/g)	45 ± 2	44 ± 4	39 ± 2	49 ± 1	10 ± 1	12 ± 1	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,02	NR	NR	29 ± 2	46 ± 3	49 ± 6	49 ± 9	NR	NR	NR	NR	NR	NR	ND	ND
LDt (nm)	46 ± 1	33 ± 1	48 ± 3	29 ± 1	55 ± 1	36 ± 0,3	52 ± 1	33 ± 1	52 ± 1	33 ± 1	56 ± 1	36 ± 1	49 ± 1	32 ± 1	46 ± 1	32 ± 2	53 ± 1	33 ± 1	47 ± 1	27 ± 0,1	ND	ND

ND : Non détecté

NR : Non représentatif

Pour tous les aliments, excepté l'échantillon E11 (garniture), des nanoparticules de TiO₂ ont bien été identifiées malgré l'absence de la mention [nano] sur l'étiquetage. Dans l'échantillon E11, les analyses ont bien confirmé qu'il n'y a plus de présence de particules de TiO₂ dans ce produit, et donc que le E171 a bien été retiré.

V.3.3.2.1 Influence de l'isotope analysé

Selon les résultats présentés dans les [Tableaux 30 et 31](#), on observe que le diamètre moyen et le diamètre le plus fréquent sont toujours égaux ou supérieurs pour l'isotope ⁴⁹Ti comparés aux résultats obtenus avec l'isotope ⁴⁸Ti. En effet, l'isotope ⁴⁹Ti étant moins abondant, moins de petites particules sont détectées qu'avec l'isotope ⁴⁸Ti, et on observe donc systématiquement une LDt plus élevée qu'avec l'isotope ⁴⁸Ti, ce qui entraîne une augmentation du diamètre moyen et du diamètre le plus fréquent. En ce qui concerne la concentration nanoparticulaire, c'est aussi le cas, puisque plus de NPs sont détectées avec le ⁴⁸Ti qu'avec le ⁴⁹Ti. Pour les échantillons E1, E7 et E8, les résultats sont similaires avec l'analyse des deux isotopes. Cela s'explique par le fait que la grande majorité des particules possèdent une taille supérieure à la LDt du ⁴⁹Ti. Ainsi, toutes les particules sont détectées aussi bien avec le ⁴⁹Ti que le ⁴⁸Ti. Cela se confirme en analysant les distributions en taille ([Figure 99](#)), où la forme de distribution est similaire pour les deux isotopes. Par conséquent, les résultats obtenus avec l'isotope ⁴⁸Ti sont utilisés pour les autres exploitations de résultats.

V.3.3.2.2 Comparaison diamètre moyen – diamètre le plus fréquent

Dans les [Tableaux 30 et 31](#), le diamètre moyen est également significativement supérieur au diamètre le plus fréquent car les distributions en taille ne sont pas symétriques, mais semblent être de type log-normale ([Figure 99](#)). Ce type de distribution est aussi observé dans d'autres études ([Chen et al., 2013 ; Song et al., 2015 ; de la Calle et al., 2018a](#)). Cela indique que le diamètre moyen n'est pas systématiquement le paramètre le plus représentatif de la distribution en taille dans le cadre de l'analyse du E171. Il est intéressant de noter que cinq échantillons (E2, E3, E5, E8 et E9) présentent un diamètre moyen > 100 nm, tandis que leur diamètre le plus fréquent est < 100 nm. Cela met en avant l'importance de bien caractériser ces matériaux avant toute évaluation des risques.

V.3.3.2.3 Impact du choix du TE

En comparant le [Tableau 30](#) et le [Tableau 31](#), les résultats sont significativement différents. En effet, les écarts concernant les diamètres moyens, les diamètres les plus fréquents et les fractions

nanoparticulaires, varient respectivement entre 9 et 21%, 7 et 22% et 14 et 35%. Ces écarts mettent en avant le fait que le choix du mode de calcul du TE a un impact significatif sur le résultat en Sp-ICP-MS dans notre cas. La Figure 98 représente les écarts observés pour les diamètres moyens en fonction des écarts des deux types de TE mesurés pour chaque analyse.

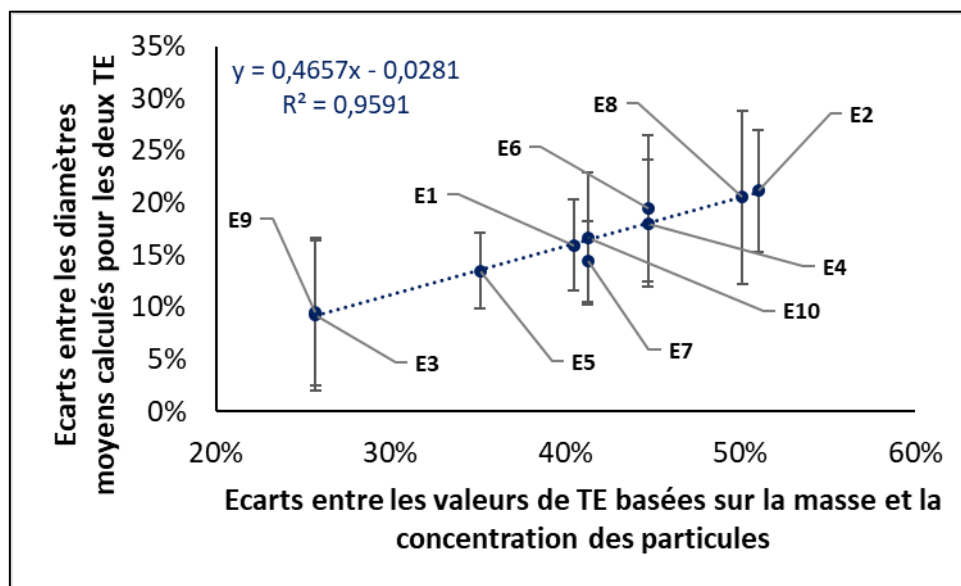


Figure 98 : Ecart des diamètres obtenus en fonction des écarts entre les valeurs de TE mesurées via les deux méthodes (masse et concentration)

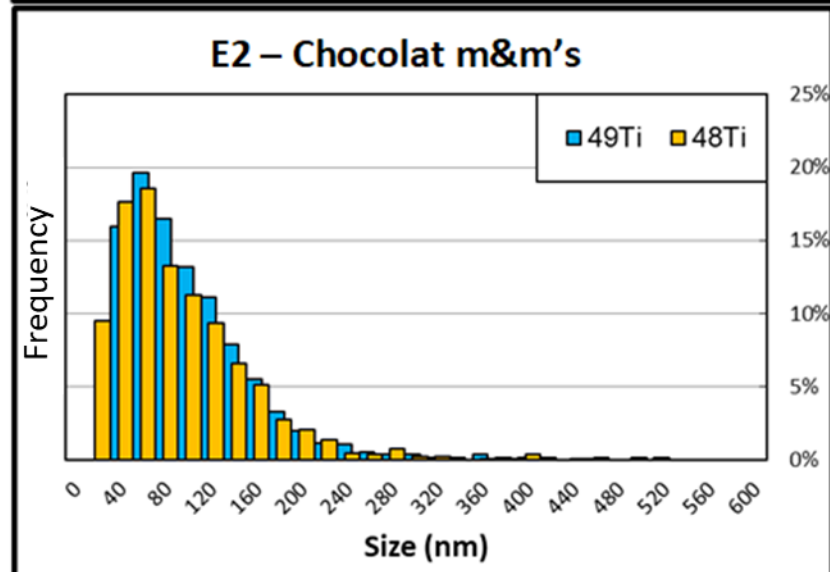
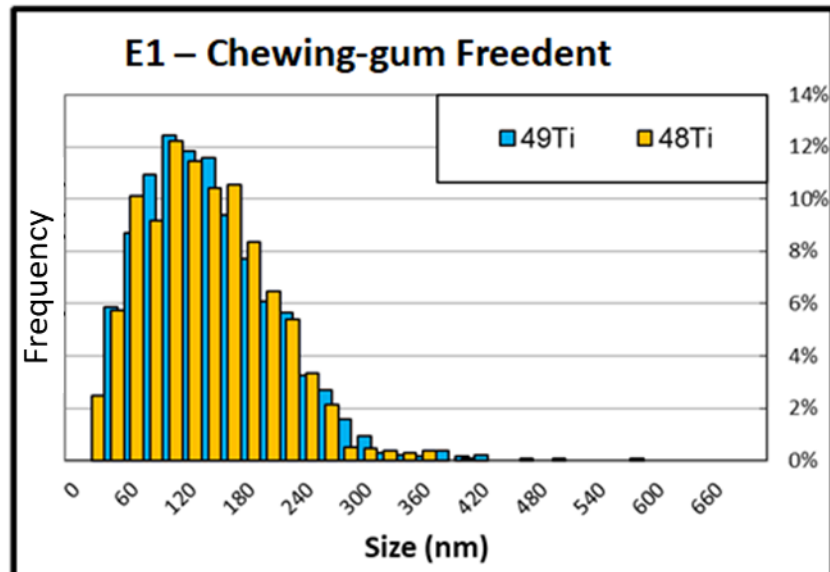
Dans cette figure, les écarts des diamètres obtenus avec chaque TE sont calculés pour tous les échantillons (ordonnées). Cet écart est comparé en fonction de l'écart calculé entre les TE de la méthode basée sur la masse et la concentration des particules, le jour d'analyse de chaque échantillon (abscisse). Cette corrélation confirmerait qu'il y a bien une influence statistiquement significative du TE sur l'estimation du diamètre des NPs. Selon ces résultats, les différences entre les TE calculés auront un impact d'un facteur $\approx 0,5$ sur le diamètre moyen mesuré d'après le coefficient de la pente, ce qui équivaut à plusieurs dizaines de nm dans notre étude. En prenant l'exemple de l'échantillon E2, l'écart entre les deux valeurs de TE représente $\approx 50\%$. Par conséquent, l'écart observé sur le diamètre moyen sera de $\approx 25\%$ ce qui représente ≈ 25 nm d'écart en fonction de la valeur de TE utilisée.

Toutefois, comme il a été expliqué dans le [paragraphe V.2.10](#), les valeurs obtenues avec le TE calculé par la méthode basée sur la concentration, sont préférées pour les NPs de TiO₂. Par conséquent, ce sont les valeurs obtenues avec cette méthode qui seront utilisées pour l'exploitation des résultats ([Tableau 31](#)).

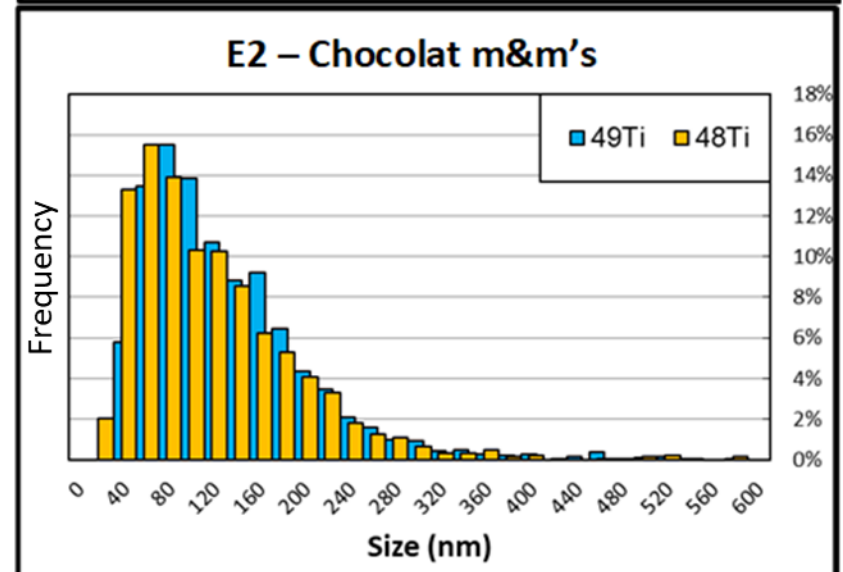
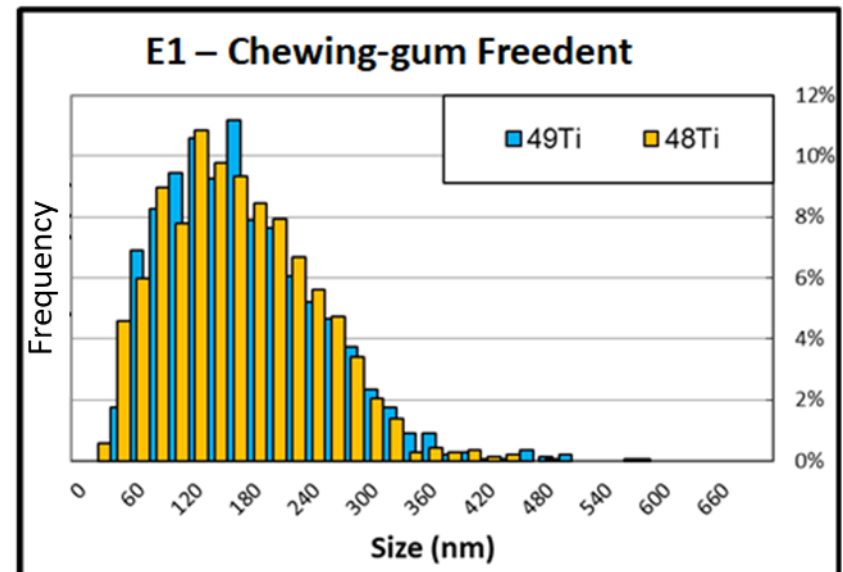
V.3.3.2.4 *Comparaison avec la littérature*

Concernant les chewing-gums (échantillons E1 et E3), les diamètres moyens sont respectivement de 148 nm contre 133 nm et donc relativement proches. Ces valeurs sont cohérentes avec celles trouvées dans la littérature sur ce même type de matrice (Faust *et al.*, 2016 ; Dufey *et al.*, 2018). C'est aussi le cas pour le diamètre le plus récurrent (Chen *et al.*, 2013 ; Candás-Zapico *et al.*, 2018). Pour le chocolat (échantillon E2), les diamètres sont comparables à ceux obtenus par de la Calle *et al.* (2018a) qui observent également un décalage entre le diamètre moyen et le diamètre le plus récurrent, du fait d'une distribution en taille non symétrique. En général, les valeurs de diamètre moyen varient entre 86 et 184 nm (Tableau 31), ce qui est cohérent avec la littérature (Tableau 5). Au niveau des fractions nanoparticulaires, elles sont comprises entre 19% et 68% dans l'additif, ce qui confirme la variabilité des tailles des particules de TiO₂ (Tableau 5). Les plus faibles fractions nanoparticulaires sont retrouvées dans les décorations alimentaires (E6 et E7), avec une valeur de 15 à 17%. En revanche, ce sont les échantillons les plus concentrés en nanoparticules car l'additif est l'un des principaux ingrédients de l'aliment. Enfin, concernant les concentrations en nanoparticules (< 100 nm), la dragée (E4) est le produit qui contient le moins de nanoparticules (120 millions par gramme). Pour les chewing-gums (E1 et E3), le nombre de particules par unité a aussi pu être déterminé, respectivement 250 ± 20 et 700 ± 40 milliards de particules/g. Ces valeurs sont comparables avec celles trouvées par Candás-Zapico *et al.* (2018) qui ont aussi analysé le TiO₂ contenu dans des chewing-gums par Sp-ICP-MS. En revanche, ces concentrations sont nettement inférieures à celles trouvées par Dufey *et al.* (2018). Etant donné que le rendement d'extraction n'a pas été vérifié (l'objectif n'étant pas de tout extraire mais d'extraire une partie significative de NPs présentes dans les échantillons avant de les diluer), il est possible que les concentrations mesurées soient sous-estimées.

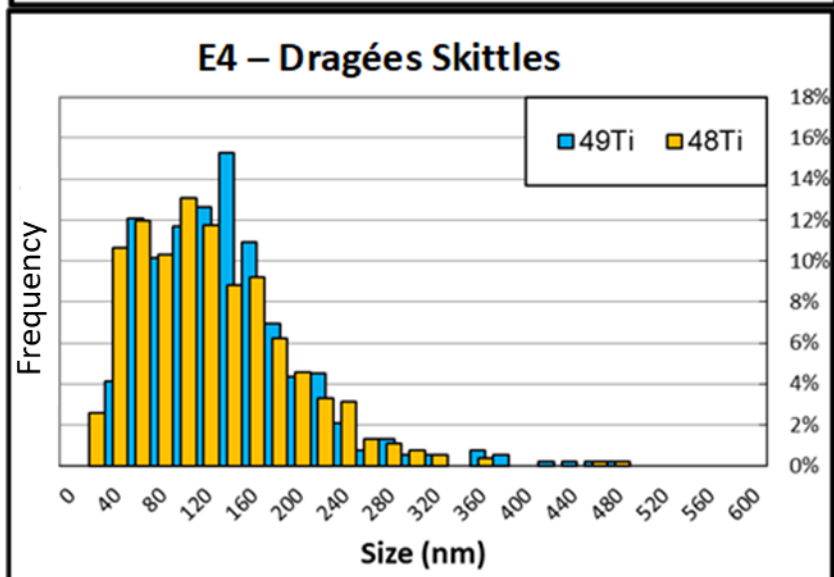
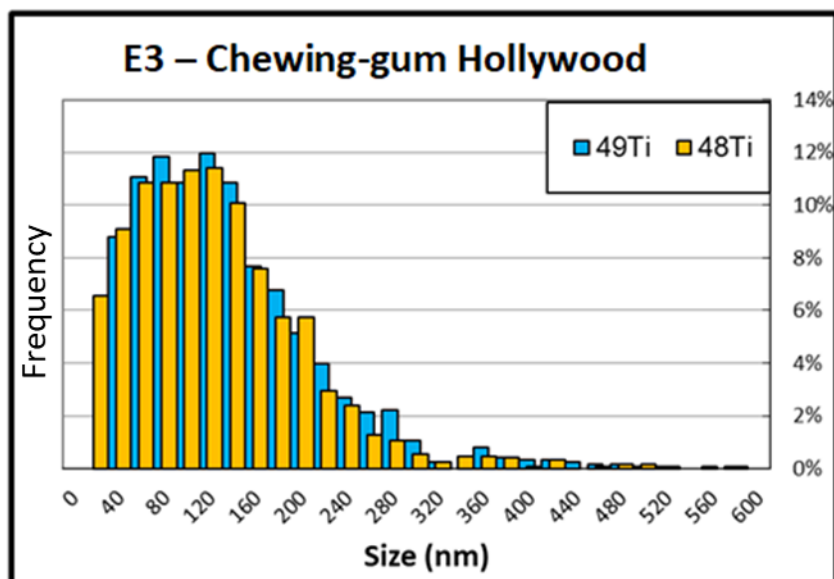
Efficacité de transport (Concentration en particules)



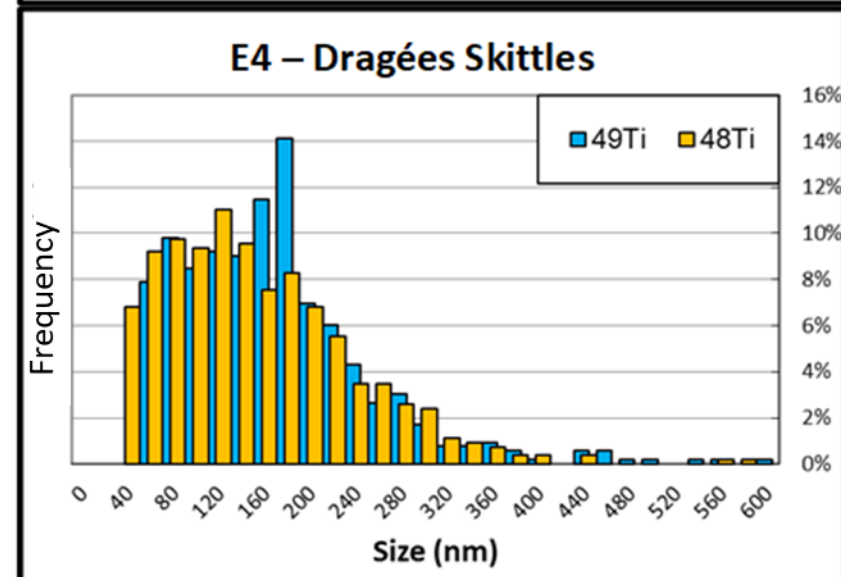
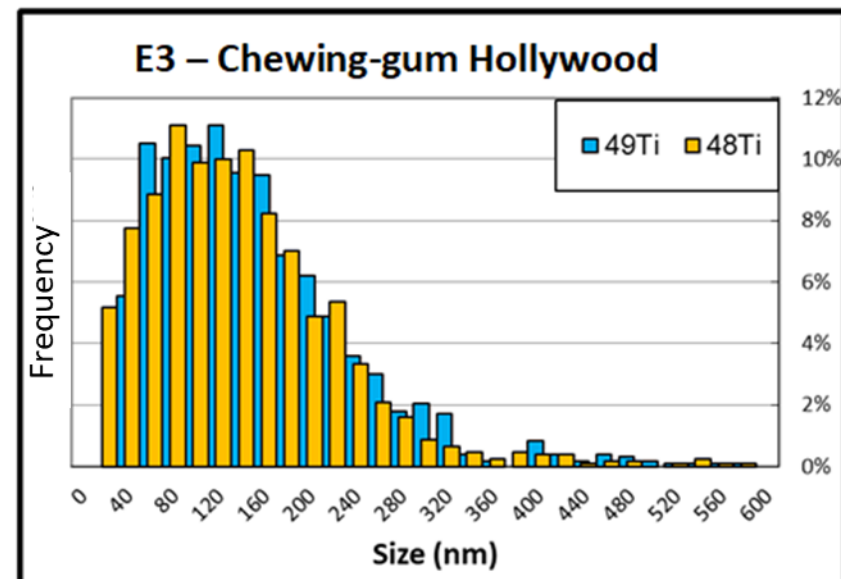
Efficacité de transport (Masse des particules)



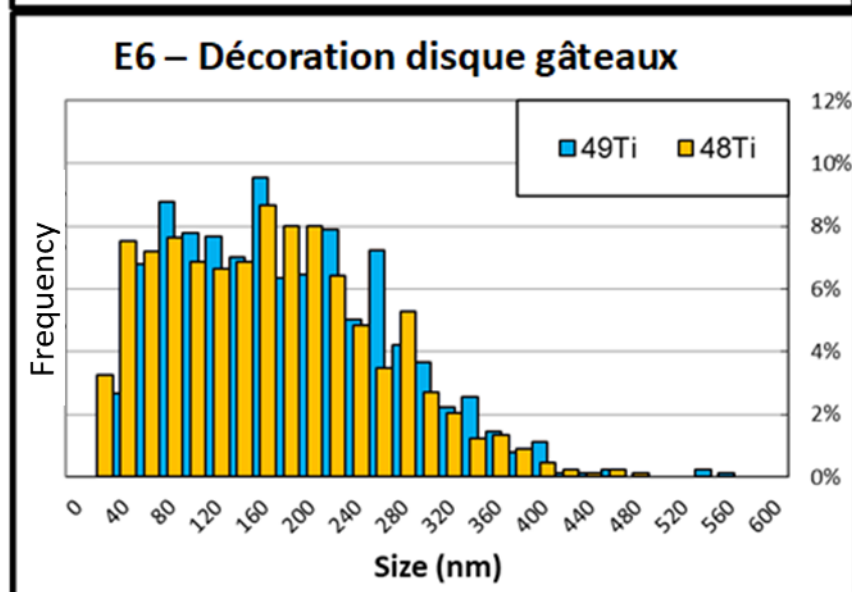
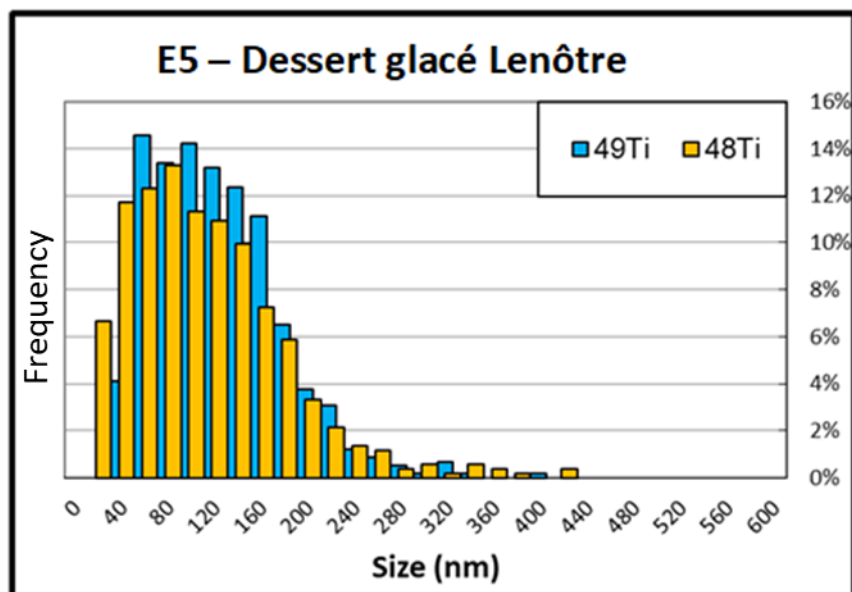
Efficacité de transport (Concentration en particules)



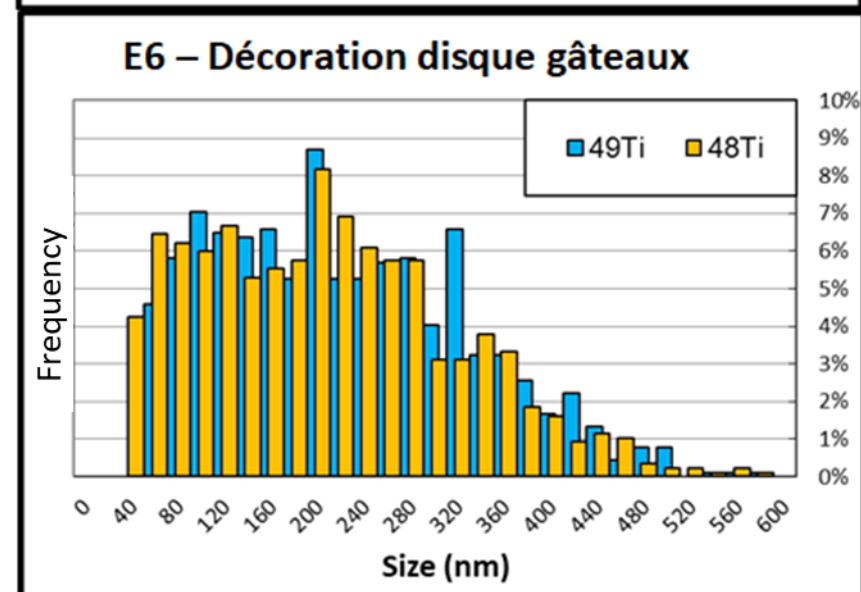
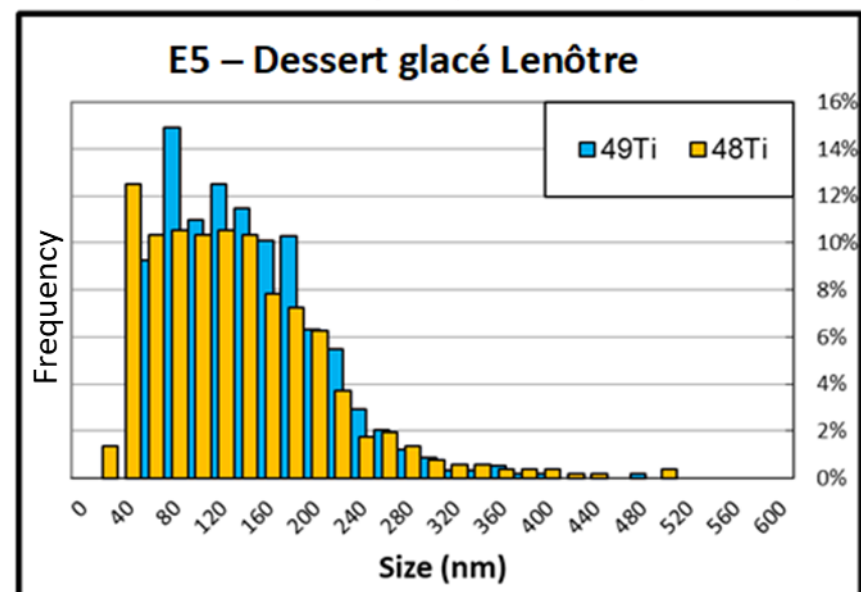
Efficacité de transport (Masse des particules)



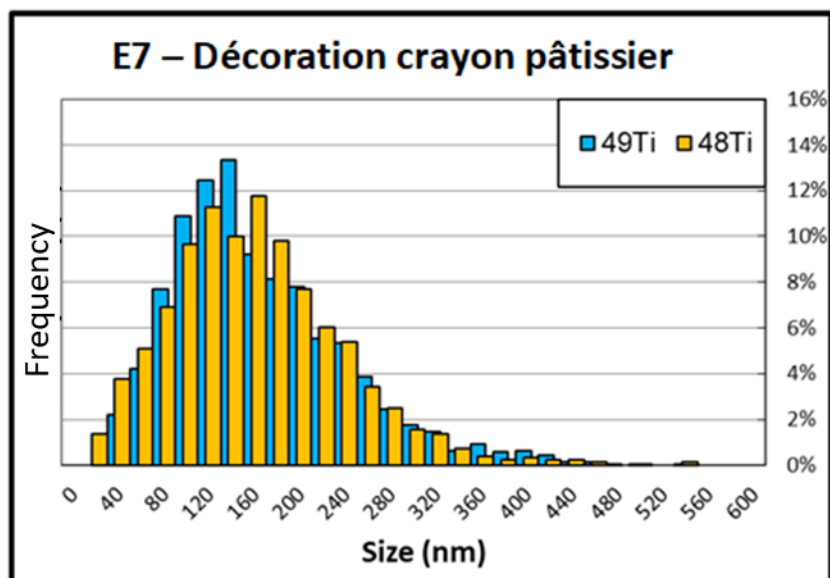
Efficacité de transport (Concentration en particules)



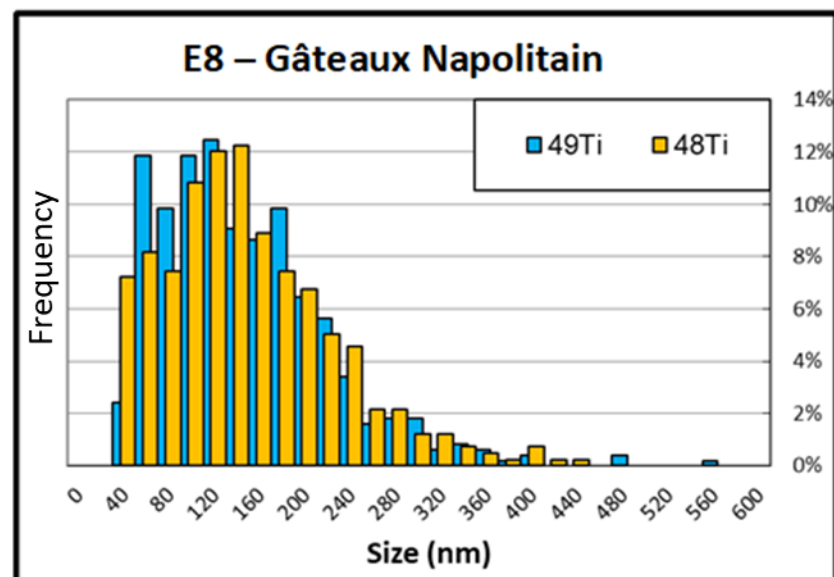
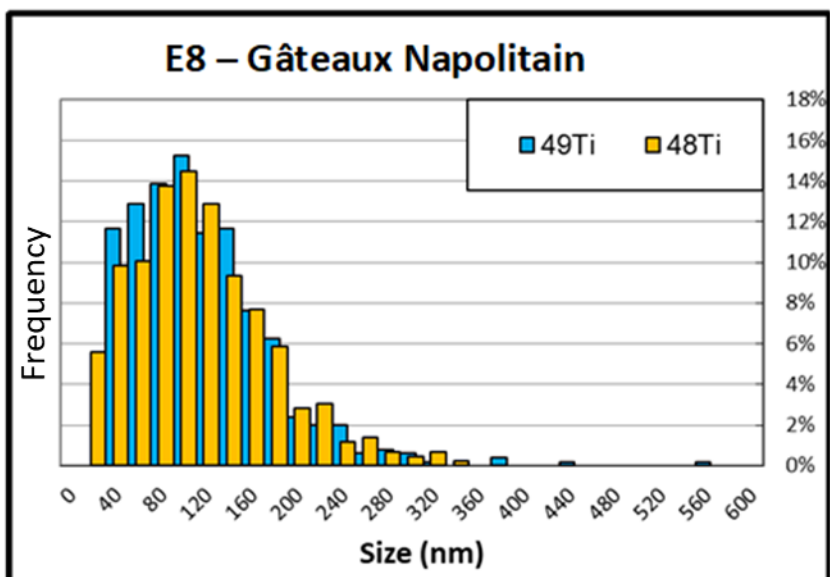
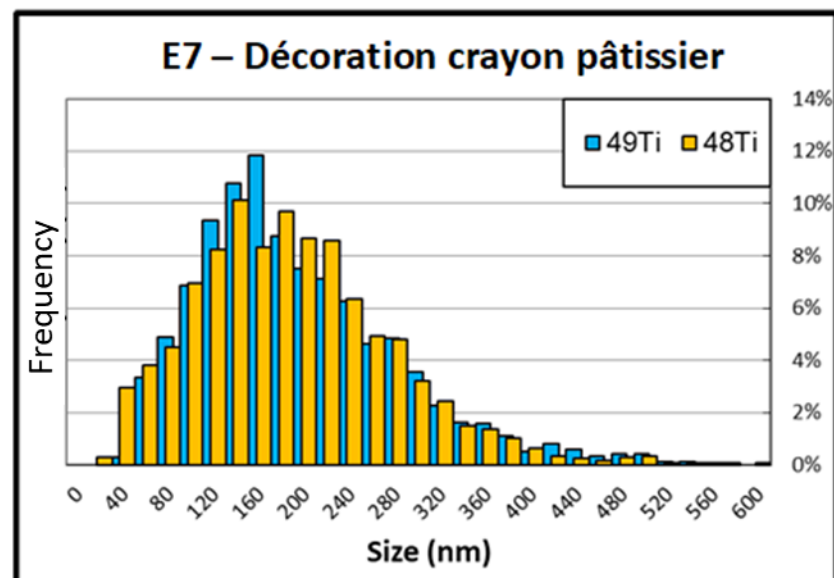
Efficacité de transport (Masse des particules)



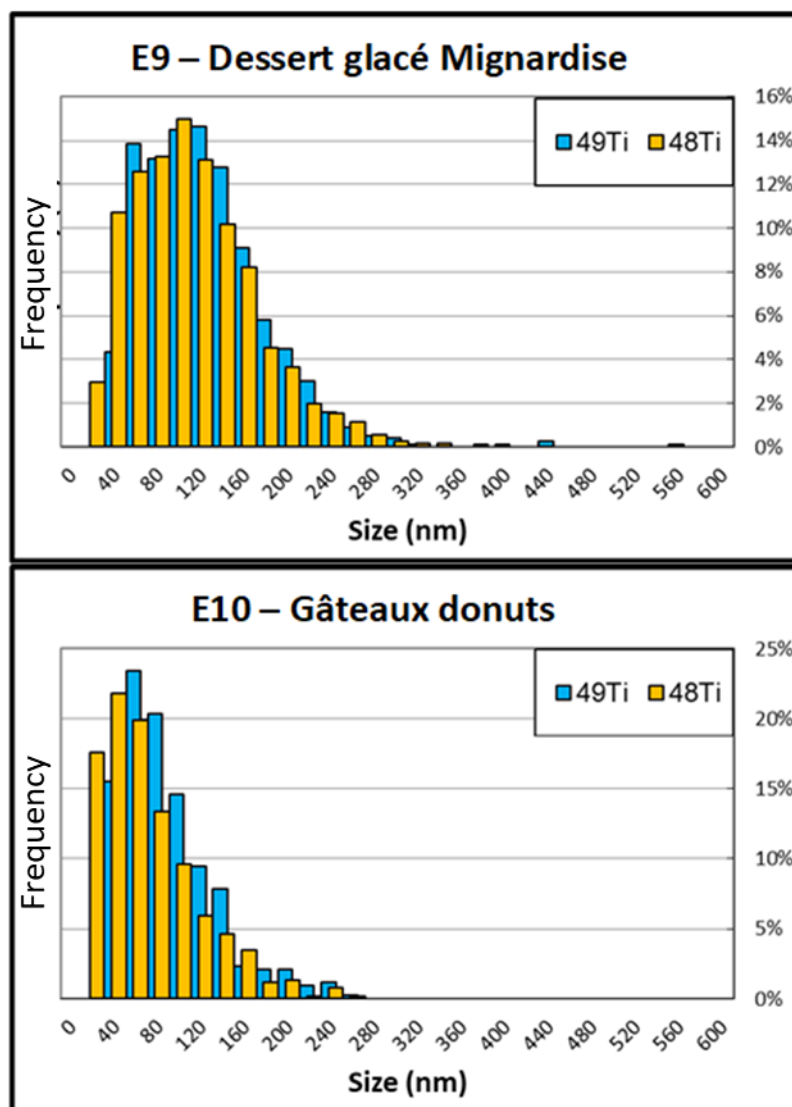
Efficacité de transport (Concentration en particules)



Efficacité de transport (Masse des particules)



Efficacité de transport (Concentration en particules)



Efficacité de transport (Masse des particules)

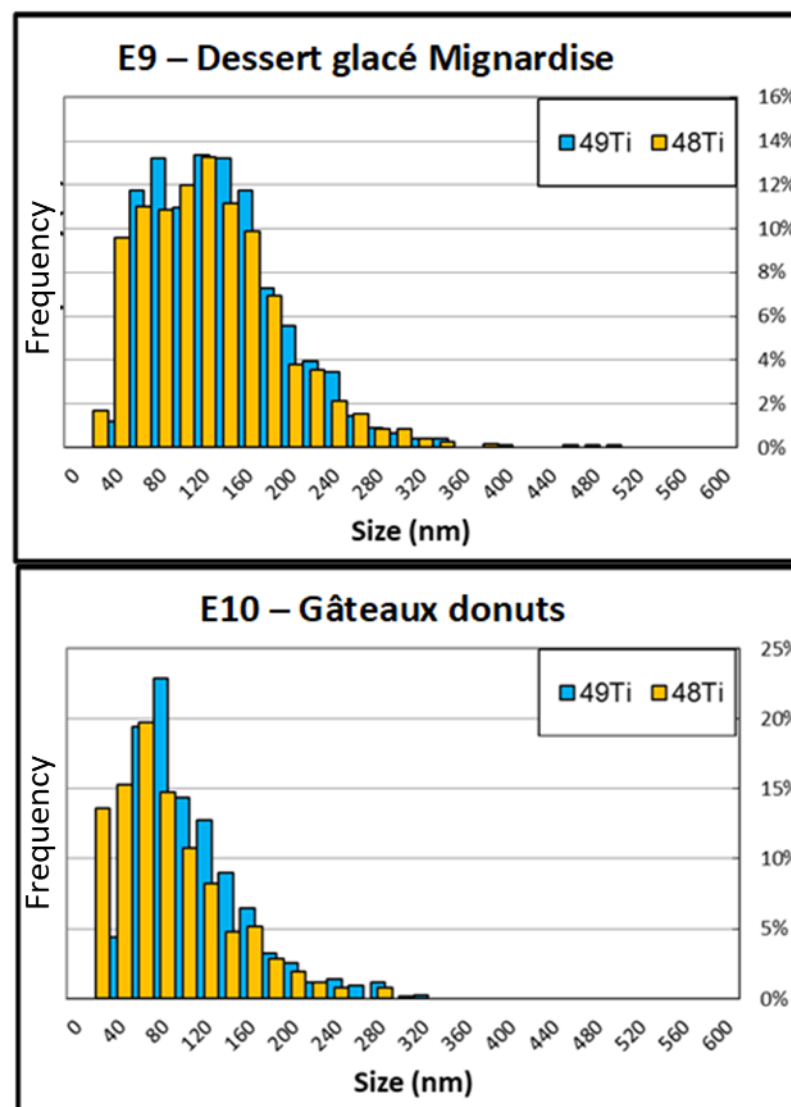


Figure 99 : Distribution en taille des particules des échantillons alimentaires déterminée par la méthode Sp-ICP-MS

En analysant les distributions en taille ([Figure 99](#)), il est possible de voir les décalages vers les particules de diamètre supérieur lorsque le TE de la méthode basée sur la masse des particules notamment avec les échantillons E7, E8 et E9.

Il est aussi possible de visualiser facilement la LDt pour les échantillons E2 et E10. En effet, pour ces échantillons, la partie gauche de la distribution semble incomplète car il n'est pas possible de voir les particules de taille inférieure à la LDt. A l'inverse, les distributions des échantillons E1, E3 et E7 semblent « complètes » pour les deux isotopes, et cela se confirme avec les données du [Tableau 31](#) qui montrent des résultats similaires entre les deux isotopes ⁴⁸Ti et ⁴⁹Ti. Sachant que les chewing-gums peuvent contenir une quantité significative de calcium ([Lorenzetti et al., 2017](#) ; [Candás-Zapico et al., 2018](#)), il est appréciable de voir que l'analyse sur l'isotope ⁴⁸Ti n'a pas été impactée. Le facteur de dilution était probablement suffisamment important ($1-5.10^5$) pour réduire l'impact du calcium ionique potentiellement présent.

De façon générale, la forme de la distribution est de type log-normale et renforce l'idée d'utiliser le diamètre le plus fréquent plutôt que le diamètre moyen pour exprimer une taille représentative des NPs du E171.

V.3.3.3 Conclusion

Le protocole d'extraction basé sur une simple extraction à l'eau, suivi d'ultrasons et de plusieurs dilutions successives, testé dans cette étude, s'est avéré efficient pour extraire les NPs de TiO₂ présentes dans les aliments. De plus, les résultats obtenus sur plusieurs échantillons alimentaires sont cohérents avec la littérature. La variation des résultats met en avant la variabilité des lots de E171 pouvant être utilisés dans l'agroalimentaire et confirme les observations de certaines études ([Chen et al., 2013](#) ; [Yang et al., 2014](#)). Il reste toutefois à éprouver ce protocole sur des matrices plus complexes, susceptibles de contenir aussi du E171. La méthode d'analyse optimisée sur un ICP-MS ICapQ permet d'atteindre une limite de détection moyenne de 31 ± 2 nm en utilisant l'isotope ⁴⁸Ti, qui est l'isotope le plus adapté pour ce type d'analyse, si la concentration d'espèce ionique n'est pas significative. Cette LDt permet généralement d'obtenir des distributions en taille représentatives ([Figure 99](#)). Certains additifs ont des fractions nanoparticulaires élevées, comme ceux utilisés pour le gâteau doonys (E10) (68%). La méthode de calcul du TE retenue a aussi une influence qui peut s'avérer significative sur les résultats.

V.4 Bilan

Ce dernier chapitre vient conclure les volets concernant la méthode Sp-ICP-MS. Une optimisation de plusieurs paramètres de la méthode Sp-ICP-MS a été effectuée et a notamment permis d'identifier le TE comme l'un des plus critiques. Les NPs ont été dispersées dans des flacons en polypropylène contenant du HNO₃ 0,1% (v/v). Les conditions d'analyse retenues sont l'introduction de l'échantillon par aspiration libre, un Dt de 10 ms et une détermination du TE basée sur la concentration des particules. Nous avons porté beaucoup d'attention à ce dernier paramètre car une corrélation avec le diamètre des NPs a été mise en évidence.

Enfin, la méthode Sp-ICP-MS a pu être appliquée avec succès à l'analyse de plusieurs échantillons alimentaires. Sur les onze produits, dix contiennent des NPs de TiO₂. La fraction nanoparticulaire varie de 18 à 68% mettant en avant la variabilité des lots de E171 utilisés. Il a aussi été montré que le choix du mode de calcul du TE pouvait avoir un impact significatif sur les résultats. En effet les résultats peuvent différer jusqu'à 21% pour les diamètres moyens, 22% pour les diamètres les plus fréquents et 40% pour la fraction nanoparticulaire.

C'est pourquoi, en termes de perspectives, il est nécessaire de poursuivre les études sur le TE en utilisant par exemple de nouveaux matériaux de référence nanoparticulaires, comme l'argent dont des MRC sont commercialisés. Il pourrait également être possible de travailler à différentes concentrations en particules ou de faire des mélanges de populations de taille de NPs. Aussi, l'aspiration libre a montré une amélioration des résultats concernant le seuil bruit de fond-particule. Il pourrait alors être intéressant de mener des travaux supplémentaires sur la comparaison avec la pompe péristaltique en utilisant différentes matrices, afin de confirmer cette amélioration de LDt avec l'aspiration libre. Enfin, pour diminuer la LDt, il pourrait être aussi envisagé de comparer les résultats d'analyses obtenus dans ces travaux avec des résultats issus de mesures utilisant un Dt plus faible (100-500 μ s) avec la feuille de calcul interne développée. Cela permettrait d'obtenir une distribution en taille plus complète, comme pour les échantillons E2 et E10 dont la distribution en taille est limitée par la LDt.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Ce travail a été mis en place pour répondre au besoin de caractériser les NPs dans des milieux complexes, dans le cadre de la réglementation européenne ([Parlement européen, 2009, 2011, 2012](#) ; [Commission européenne, 2011](#)) et de la législation française, qui oblige la déclaration d'usage de ces substances ([R-Nano, 2013](#)). Ce projet s'est déroulé au sein du L2N du CEA-Grenoble et du LSAL de l'Anses Maisons-Alfort, tous deux partenaires du projet ANR Equipex NanoID. Les travaux ont porté sur l'optimisation de deux méthodes, à savoir : le fractionnement flux-force par flux asymétrique couplé à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (AF4-ICP-MS) et la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode « Single particle » (Sp-ICP-MS). Ces méthodes qui se développent depuis peu, ont été choisies pour leur avantage à pouvoir analyser une fraction élevée de NPs dans des échantillons liquides.

Concernant la méthode AF4-ICP-MS, une première caractérisation d'un nanomatériau de référence (NM-102) a été effectuée dans le but de vérifier les paramètres physico-chimiques de cet échantillon. Les résultats concernant la phase cristalline et la masse volumique ont confirmé sa similarité avec les NPs de TiO₂ retrouvées dans les aliments, mais avec une distribution en taille plus fine.

Une étude des charges de surface des NPs de TiO₂ et des membranes AF4 a ensuite été réalisée afin d'anticiper les interactions électrostatiques pouvant avoir lieu dans le système AF4. Ces travaux ont permis de dresser une base de données concernant le potentiel zêta des NPs et membranes en fonction de la force ionique, du pH et de la présence de tensioactif dans l'éluant. Parmi ces données, il a été montré que la présence de sel (NaNO₃) modifie significativement les charges de surface de la membrane, tandis que les tensioactifs SDS et CTAC permettent d'obtenir un potentiel zêta stable, sur une large gamme de pH. Cette base de données a permis de sélectionner plusieurs conditions d'éluant d'intérêt pour procéder aux analyses AF4-ICP-MS.

Ces essais ont mis en avant le fait que favoriser les attractions électrostatiques entraîne une diminution du taux de récupération des NPs de TiO₂. Elles ont aussi montré que la nature chimique du tensioactif utilisé a une influence significative sur le taux de récupération et les diamètres mesurés. Pour les conditions d'éluant avec le CTAC ou sans tensioactif, la dispersion des particules n'est pas satisfaisante, ce qui peut entraîner un biais sur la mesure du diamètre. Par conséquent, ces deux conditions ont été écartées pour les analyses AF4-ICP-MS. À l'inverse, l'usage du SDS, Triton X-100 et FL-70 s'avère pertinent puisque les mesures du diamètre du NM-102 avec ces tensioactifs révèlent une faible agglomération des particules. De plus, le FL-70 et le Triton X-100 permettent d'obtenir les meilleurs taux de récupération de NPs de TiO₂. Toutefois, la présence d'agglomérats a été démontrée, ce qui nécessite de poursuivre les optimisations concernant la préparation d'échantillon.

En résumé, ces travaux se présentent comme la base d'une étude d'optimisation de la méthode AF4-ICP-MS et met en avant la difficulté d'obtenir une distribution en taille pertinente, suite à la présence

d'agglomérats. Ils ont également fait l'objet d'une publication dans le journal *Food Analytical Methods* et l'article est actuellement en cours de révision ([Annexe C](#)).

Concernant la partie sur la méthode Sp-ICP-MS, un premier axe de travail était orienté sur l'optimisation du traitement de données Sp-ICP-MS, ce qui a permis de développer une feuille de calcul interne, apportant des améliorations majeures par rapport aux traitements existants (Feuille du RIKILT et logiciel dédié à l'analyse Sp-ICP-MS). Cette feuille de calcul interne permet notamment d'évaluer plus de paramètres de caractérisation et d'obtenir une meilleure justesse sur le diamètre des particules du NM-100. Elle a ainsi été utilisée pour le deuxième axe de travail, qui consistait à optimiser la méthode Sp-ICP-MS avant de l'appliquer sur des échantillons alimentaires, susceptibles de contenir des NPs de TiO₂.

Les optimisations réalisées ont conduit à retenir : (i) des paramètres portant sur la préparation d'échantillon, tels que l'usage de flacons en polypropylène et d'acide nitrique à 0,1% (v/v) pour disperser les NPs ; (ii) des paramètres analytiques comme l'introduction de l'échantillon par aspiration libre, un temps d'acquisition de 10 ms en mode STDS avec le suivi de l'isotope ⁴⁹Ti ou ⁴⁸Ti suivant la matrice analysée ; (iii) des paramètres concernant le traitement de données, à savoir l'utilisation de la méthode basée sur la concentration des particules pour calculer le TE et l'utilisation du paramètre 5xET et 4xET pour calculer le seuil bruit de fond-particule des NPs d'Au et de TiO₂ respectivement. Parmi toutes ces optimisations réalisées, les résultats de l'étude du choix du mode de calcul du TE a montré l'importance de ce paramètre et semble avoir mis en avant une corrélation entre le TE et la taille des NPs. L'étude du mode d'introduction de l'échantillon par aspiration libre a aussi présenté des résultats très intéressants sur l'amélioration de LDt.

Ces optimisations ont finalement permis d'analyser des matrices alimentaires contenant du E171, dont la présence de NPs a été confirmée malgré l'absence de la mention « [nano] » sur les étiquettes. La fraction nanoparticulaire a pu être déterminée (18-68%) tout comme le diamètre moyen (84-186 nm) et le diamètre le plus fréquent (65-148 nm). La mesure de ces deux derniers paramètres a d'ailleurs démontré qu'ils étaient significativement différents, ce qui peut avoir son importance dans un monde où la réglementation et l'encadrement des nanomatériaux ne cesse d'évoluer. Enfin, une LDt comprise entre 27 et 36 nm a été obtenue pour les différents échantillons alimentaires, ce qui est satisfaisant pour la plupart des analyses de TiO₂ alimentaire.

En termes de perspectives, les premiers travaux sur la méthode AF4-ICP-MS n'ont pas pu aboutir à une analyse satisfaisante des NPs de TiO_2 . C'est pourquoi, il serait très intéressant de poursuivre les optimisations de cette méthode. Plusieurs axes ont déjà été proposés, comme l'optimisation des flux primaire et croisé, adaptés à l'utilisation du FL-70, SDS ou Triton X-100. Cela devrait permettre d'améliorer la séparation des particules et d'augmenter le taux de récupération pour chaque condition d'éluant. Il serait également très intéressant de varier les concentrations en tensioactif comme l'ont fait [Correia et al. \(2018\)](#). Il a été émis l'hypothèse que l'EDTA, présent dans le FL-70, est capable d'interagir avec les NPs de TiO_2 . Cela pourrait être confirmé en utilisant l'EDTA seul, afin d'évaluer si l'impact sur les NPs est identique. Son utilisation serait privilégiée par rapport au FL-70, car ce dernier contribue à l'augmentation de la force ionique. Une autre possibilité serait de disperser les particules dans une solution de tensioactif, telle que le SDS et d'utiliser le FL-70 ou le triton X-100 comme éluant. Ceci afin d'évaluer si la complémentarité de plusieurs tensioactifs est envisageable. Il est aussi nécessaire d'étudier différents types de NPs, comme des particules de TiO_2 alimentaires (E171) ou des particules de TiO_2 utilisées dans des cosmétiques ou des peintures. Cela faciliterait la validation de la méthode AF4-ICP-MS. Le problème est qu'il n'existe pas de Matériau de Référence Certifié (MRC) de TiO_2 , ce qui complique le développement de cette méthode.

Le défi analytique de l'AF4-ICP-MS reste d'obtenir une dispersion satisfaisante des particules pour ne pas générer de biais sur la taille mesurée. Dans notre cas, il est aisé de juger le taux d'agglomération, puisque le diamètre des NPs est connu. Or, dans le cas d'un échantillon inconnu, il devient alors difficile de juger si les tailles proviennent d'agglomérats ou de plus grosses particules. Un autre inconvénient s'ajoute au fait que toutes les NPs de TiO_2 utilisées dans les produits de consommation peuvent présenter une chimie de surface différente ([Jovanović et al., 2016](#) ; [Correia et al., 2018](#)) et ainsi avoir différents comportements dans un système AF4.

Concernant la méthode Sp-ICP-MS et le développement de la feuille de calcul interne, celle-ci a permis d'obtenir des résultats satisfaisants concernant la fraction nanoparticulaire et le diamètre du NM-100. Dans ces travaux, les analyses ont toujours été effectuées avec des Dt de 10 ms. Il serait alors intéressant d'évaluer les résultats qu'elle fournit avec des Dt de 100 μs , qui sont recommandés actuellement pour améliorer la LDt. Il faudrait donc également comparer les résultats avec ceux obtenus avec un logiciel dédié aux analyses Sp-ICP-MS, capable de traiter des données issues d'un Dt de 100 μs .

A propos de l'optimisation de la méthode Sp-ICP-MS, des résultats obtenus ont soulevé certaines interrogations. C'est le cas du calcul du TE, dont les méthodes proposées dans littérature ([Pace et al., 2011](#)) s'avèrent présenter des différences significatives allant jusqu'à 55%, ce qui peut entraîner un écart de 25% sur le diamètre moyen calculé. Avec le modèle d'ICP-MS utilisé dans ces travaux, il a été

montré que le TE basé sur la concentration des particules est corrélé avec le diamètre de celles-ci, ce qui semble également être le cas dans une autre étude ([Geertsens et al., 2018](#)). Si ces résultats s'avèrent pertinents avec d'autres ICP-MS, alors ils pourraient remettre en question certains aspects du traitement de données en Sp-ICP-MS. C'est pourquoi de nouvelles investigations méritent d'être poursuivies en utilisant d'autres appareils/nébuliseurs, ainsi que d'autres types de NPs, comme les NPs d'Ag qui sont largement commercialisées et bien caractérisées. Un autre résultat notable est la diminution du seuil bruit de fond-particule, avec l'introduction de l'échantillon par aspiration libre. Une autre étude a également mis en avant son avantage pour l'analyse en Sp-ICP-MS pour des NPs de cuivre ([Venkatesan et al., 2018b](#)). Cela mériterait donc d'étudier son efficacité sur différents types de NPs. Enfin, la méthode Sp-ICP-MS pourrait être appliquée à d'autres types d'échantillons, tels que des cosmétiques ou des médicaments. Avec les quantités élevées de NPs relarguées dans l'environnement ([Keller and Lazareva, 2014](#)), des analyses d'eau ou de sol dans des zones sensibles pourraient être effectuées, comme l'ont fait certaines études récentes ([Peters et al., 2018](#) ; [Venkatesan et al., 2018a](#)).

Après avoir travaillé sur la méthode AF4-ICP-MS et Sp-ICP-MS, les principaux avantages et inconvénients identifiés sont présentés dans le [Tableau 32](#).

Tableau 32 : Comparaison des avantages et inconvénients des méthodes AF4-ICP-MS et Sp-ICP-MS

Méthodes	AF4-ICP-MS	Sp-ICP-MS
Avantages	• Information sur la taille et la composition • Analyse multi-élémentaire • Limite de détection en taille • Population statistique détectée	• Information sur la taille et la composition • Temps d'analyse • Population statistique détectée • Pas de séparation nécessaire
Inconvénients	• Sensible aux agglomérats • Séparation sensible à la chimie de surface des particules qui modifient la séparation des particules • Préparation d'échantillon • Taux de récupération	• Mono-élémentaire • Hypothèse sur la forme, l'efficacité d'ionisation et de transport • Limite de détection en taille pour certains éléments (Lee et al. 2014)

Ces deux méthodes permettent d'obtenir des informations sur la taille et la composition chimique des particules, de la même façon que la microscopie électronique. En plus d'avoir des temps d'analyse plus courts que cette dernière, ces méthodes permettent de détecter rapidement un grand nombre de particules. Par conséquent, ces techniques confirment qu'elles peuvent être une alternative/complément à la microscopie électronique. Avec les travaux de cette thèse, la méthode

Sp-ICP-MS s'est distinguée pour avoir abouti à l'analyse de NPs de TiO_2 dans des échantillons alimentaires, contrairement à l'AF4-ICP-MS. Cette dernière s'est confrontée à son principal inconvénient, qui est la présence d'agglomérats en solution. De plus, bien que l'éluant puisse être optimisé pour un certain type de TiO_2 , cela peut ne pas convenir à un autre type de TiO_2 qui présente une chimie/charge de surface différente (Rubio et al., 2019). De plus, même si l'AF4-ICP-MS possède certains avantages par rapport à la Sp-ICP-MS, tels que l'analyse multi-élémentaire ou une meilleure LDt, ces lacunes semblent pouvoir être comblées dans les prochaines années. En effet, des études d'analyse multi-élémentaire ont déjà été proposées avec la Spectrométrie de Masse en temps de vol (Sp-TOF-MS) (Praetorius et al., 2017 ; Hendriks et al., 2018). Concernant la LDt, l'utilisation d'un triple quadripôle (Sp-ICP-QQQ-MS) a déjà démontré des améliorations de celle-ci (Bolea-Fernandez et al., 2017 ; Tharaud et al., 2017 ; Candás-Zapico et al., 2018). Toutefois, certains éléments restent un challenge analytique, c'est le cas du dioxyde de silice (SiO_2) ou des NPs organiques (Rubio et al., 2019). C'est pourquoi l'AF4-ICP-MS reste une méthode pertinente pour ces types d'analytes, tandis que la Sp-ICP-MS semble pouvoir évoluer et devenir une méthode de référence sur la plupart des NPs inorganiques pour les laboratoires d'analyse et de contrôle.

ANNEXES

ANNEXES.....	Error! Bookmark not defined.
Annexe A : Théorie des différentes méthodes de caractérisation des NPs ou membrane.	194
Annexe B : Figures et tableaux complémentaires du Chapitre III	207
Annexe C : Publication “Characterisation of TiO ₂ nanoparticles in food additives by Asymmetric flow field flow fractionation -coupled to Inductively coupled plasma-mass spectrometry – a pilot study”	210
Annexe D	247

Annexe A : Théorie des différentes méthodes de caractérisation des NPs ou membrane.

Pycnométrie

Le pycnomètre est constitué de deux cellules calibrées de volumes identiques. L'une des deux cellules est destinée à recevoir l'échantillon sous forme solide (poudre ou solide entier), tandis que l'autre sert de référence. Lors de la première étape, après avoir déposé l'échantillon dans la cellule, la vanne entre les deux cellules est fermée et chaque cellule est chargée en gaz de façon identique. Etant donné que la cellule contenant l'échantillon possède un volume de gaz plus faible (dû à la présence d'un volume d'échantillon), sa pression est alors supérieure à celle de la cellule d'expansion. La deuxième étape consiste alors à ouvrir la vanne entre les deux cellules de façon que le gaz se répande dans tout le système. La nouvelle pression à l'équilibre est mesurée et permet ainsi de déterminer le volume que représente l'échantillon (Équation A1).

Équation A1

$$V_{ECH} = V_{CELL} - \frac{V_{EXP}}{\frac{P_{CELL} - P_{EXP}}{P_2 - P_{EXP}} - 1}$$

avec :

V_{ECH} : volume de l'échantillon (cm³)

V_{CELL} : volume de la cellule contenant l'échantillon (cm³)

V_{EXP} : volume de la cellule d'expansion (cm³)

P_{CELL} : pression mesurée dans la cellule contenant l'échantillon (bar)

P_{EXP} : pression mesurée dans la cellule d'expansion (bar)

P_2 : pression à l'équilibre dans le système après ouverture de la vanne (bar)

Ainsi, la masse volumique des particules de TiO₂ peut être déterminée puisque la masse d'échantillon déposé dans la cellule est connue (Équation A2).

Équation A2

$$\rho_{\text{échantillon}} = \frac{m_{\text{échantillon}}}{V_{ECH}}$$

avec :

$m_{\text{échantillon}}$: masse de l'échantillon déposé dans la cellule (g)

Méthode Brunauer Emmett et Teller (BET)

La théorie BET est une extension de la théorie de Langmuir ([Langmuir, 1918](#)) pour les adsorptions multicouches. Cette nouvelle méthode repose sur plusieurs hypothèses :

- L'adsorption est physique et donc régie par les forces de van der Waals.
- Le nombre de couches adsorbées tend vers l'infini quand la pression d'équilibre tend vers la pression de vapeur saturante.
- La physisorption de la première couche est régie selon le modèle de Langmuir. Il s'agit donc de sites énergétiquement identiques et sans interactions latérales entre molécules adsorbées.
- Les molécules adsorbées forment une couche qui constitue alors des sites d'adsorption pour les molécules de la couche suivante.
- L'énergie d'adsorption des couches, au-delà de la première, est supposée égale à l'énergie de liquéfaction du gaz.

Avec ces hypothèses, et à partir des relations d'équilibres condensation-évaporation pour chacune des couches, la relation BET peut être établie à partir de l'[Équation A3](#) :

Équation A3

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{P}{P_0} \left(\frac{C - 1}{V_m C} \right)$$

avec :

P : pression à l'équilibre (bar)

P₀ : pression de vapeur saturante du gaz (bar)

V : volume adsorbé à la pression d'équilibre par gramme de solide (cm³/g)

V_m : volume total adsorbé de la monocouche par gramme de solide (cm³/g)

C : constante BET calculée par l'[Équation A4](#).

Équation A4

$$C = e^{\left(\frac{E_1 - E_L}{RT}\right)}$$

avec :

E₁ : énergie d'adsorption de la première couche (kJ/mol)

E_L : énergie de liquéfaction de l'adsorbat (kJ/mol)

R : constante des gaz parfaits (8,314 J/(mol.K))

T : température (K)

L'isotherme est construite à partir de mesures successives de quantité adsorbées et de pressions d'équilibre (Figure A1).

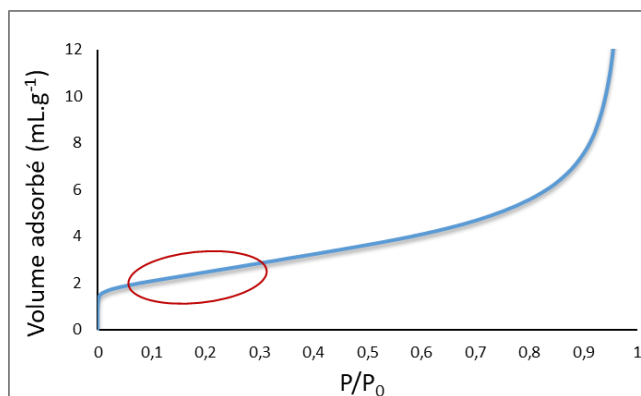


Figure A1 : Exemple d'une isotherme d'adsorption expérimentale d'azote avec un additif E171. Le cercle rouge délimite la gamme de P/P_0 où la relation BET s'applique

En général, la relation BET s'applique pour des valeurs de P/P_0 comprises entre 0,05 et 0,35. Pour des valeurs de $P/P_0 < 0,05$, l'hétérogénéité de la surface intervient et le remplissage des micropores peut avoir lieu tandis qu'à des valeurs de $P/P_0 > 0,35$, des phénomènes de condensation capillaire peuvent se produire, ce qui met en jeu d'autres modèles (Hamandi, 2017). Dans l'intervalle linéaire où la relation s'applique, le volume total adsorbé de gaz en monocouche (V_m) peut être déterminé grâce à la régression linéaire (Équation A5).

Équation A5

$$V_m = \frac{1}{(a + b)}$$

avec :

a : pente

b : ordonnée à l'origine

La surface spécifique peut alors être déterminée en utilisant V_m en utilisant l'Équation A6.

Équation A6

$$S_{BET} = \frac{N \times A \times V_m \times 10^{-20}}{V_{MG} \times m}$$

avec :

S_{BET} : Surface spécifique du matériau (m^2/g)

N : Nombre d'Avogadro ($6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

A : Aire occupée par une molécule d'adsorbat ($16,2 \text{ \AA}^2$ pour N_2)

V_{MG} : Volume molaire du gaz ($22414 \text{ cm}^3/\text{mol}$ pour N_2)

m : masse du matériau caractérisé (g)

Diffraction des Rayons-X

Lorsqu'un faisceau de rayon-X entre en contact avec la matière, et plus précisément avec le nuage électronique d'un atome, un phénomène de diffusion se produit. Cela consiste en un changement de direction d'un photon à la suite d'une collision avec un électron d'une orbitale atomique qui peut impliquer ou non un changement d'énergie. L'avantage d'utiliser des rayons-X pour ce type d'étude, est que leurs longueurs d'onde sont du même ordre de grandeur que les distances interatomiques. Lorsque les rayons-X atteignent les plans réticulaires de la structure cristalline, soit les rayons-X sont diffusés soit ils poursuivent jusqu'au plan réticulaire suivant. Lorsque les rayons diffusés sont en phase (interférence constructive), suivant la direction, le flux de photons sera plus ou moins important et ces variations forment le spectre de diffraction des rayons X ([Figure A2](#)).

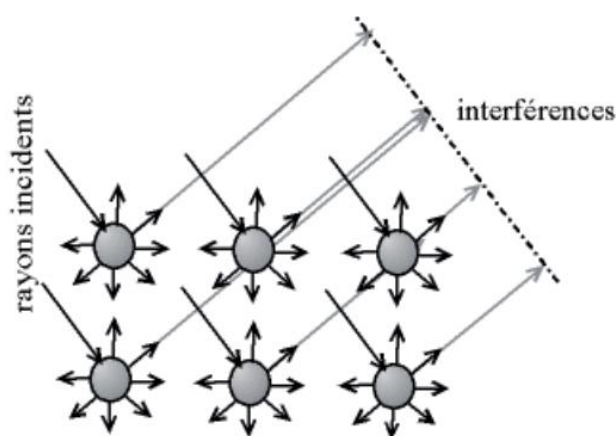


Figure A2 : Schéma du principe de la méthode DRX avec la représentation d'interférences des ondes diffusées

Les directions dans lesquelles les interférences sont constructives peuvent être déterminées grâce à la loi de Bragg ([Équation A7](#)).

Équation A7

$$n\lambda = 2d\sin(\theta)$$

avec :

n : ordre de la diffraction (nombre entier)

λ : longueur d'onde des rayons X

d : distance séparant deux plans réticulaires de la même famille $\{h,k,l\}$

θ : angle d'incidence des rayons X

Avec un diffractomètre, la longueur d'onde est préalablement fixée et l'angle de détection est connu, ce qui permet de déterminer les distances séparant les plans réticulaires. De plus, étant donné qu'un matériau peut contenir plusieurs familles de plan, un large balayage angulaire est effectué ([Figure 21](#)).

Microscopie électronique

Les microscopes électroniques utilisent des lentilles électromagnétiques pour contrôler le faisceau d'électrons, comme les lentilles de verre en microscopie optique pour focaliser la lumière.

Dans le cas du MEB, le faisceau d'électrons est concentré sur l'échantillon qui va produire, après impact, différents types d'interactions comme des électrons rétrodiffusés, des électrons secondaires et des rayons X. Chaque interaction peut être mesurée à l'aide de détecteurs spécifiques. Les électrons rétrodiffusés permettent d'obtenir une image qui dépend de la composition chimique de l'échantillon, car plus le numéro atomique de l'atome de l'échantillon est élevé, plus le signal sera intense et l'image claire. Concernant les électrons secondaires, ils sont produits suite à la collision entre les faisceaux d'électrons et les électrons des atomes de l'échantillon. Leur détection fournit une information sur la topographie de l'échantillon. Enfin, les rayons-X permettent d'obtenir des informations concernant la composition chimique des matériaux étudiés grâce à la technique de spectroscopie X par dispersion d'énergie (EDS) qui est souvent couplée aux microscopes électroniques ([Egerton, 2011](#)). Le schéma des deux types de microscope électronique est présenté dans la ([Figure A3](#)).

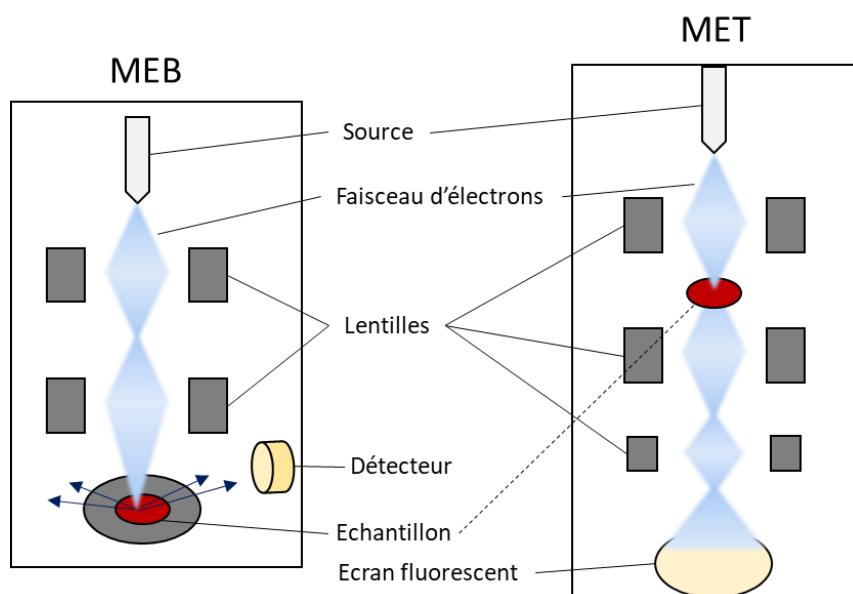


Figure A3 : Schéma simplifié du MEB et du MET

Dans le cas du MET, l'échantillon est traversé par le faisceau d'électrons, ce dernier est ensuite transmis jusqu'à un écran fluorescent qui transforme l'image électronique en image optique.

L'interaction entre les électrons et la matière de l'échantillon produit les mêmes types d'interactions qu'avec le MEB. L'échantillon doit être suffisamment fin pour que le faisceau puisse être transmis, il y a un travail de préparation d'échantillon plus conséquent dans ce cas. L'image est obtenue à partir d'électrons diffusés. Les MET peuvent également être couplés avec la technique spectroscopie X à dispersion d'énergie (EDS) pour avoir des informations sur la composition des échantillons.

Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)

La technique DLS consiste à envoyer un faisceau de lumière sur des particules en suspension et à mesurer la lumière diffuse qui en résulte. Lorsque les particules sont de tailles inférieures au dixième de la longueur d'onde du faisceau incident ([Figure A4A](#)), la lumière diffuse conserve la même énergie (diffusion élastique) et ne dépend pas de l'angle du faisceau incident. Ce phénomène s'appelle « diffusion de Rayleigh » ([Fan et al., 2014](#) ; [Bhattacharjee, 2016](#)). Quand les particules possèdent des tailles plus élevées ([Figure A4B-C](#)), la diffusion devient dépendante de l'angle du faisceau incident et une fraction de l'énergie n'est pas conservée, c'est la diffusion de Mie ([Hergert and Wriedt, 2012](#) ; [Bhattacharjee, 2016](#)). Les NPs seront principalement concernées par la diffusion de Rayleigh, tandis que les particules > 100 nm seront concernées par la diffusion de Mie.

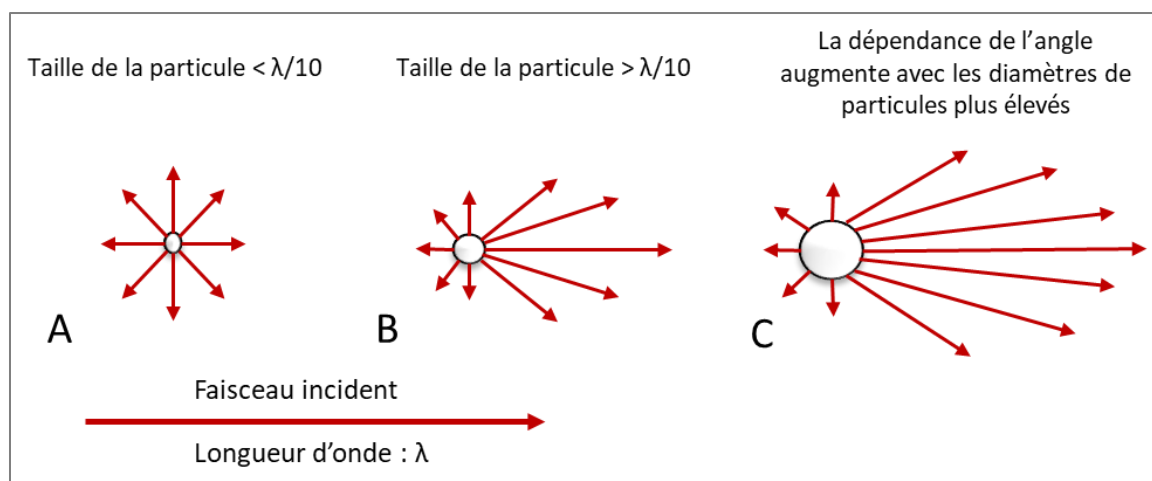


Figure A4 : Influence de la taille d'une particule sur la diffusion de la lumière

Suite au mouvement brownien des particules, la lumière diffusée varie et la technique DLS permet de mesurer cette variation. Un processus mathématique appelé fonction d'autocorrélation permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des particules à partir de ces variations. La fonction d'autocorrélation permet de corréler le signal en temps réel par rapport au signal initial (Figure A5).

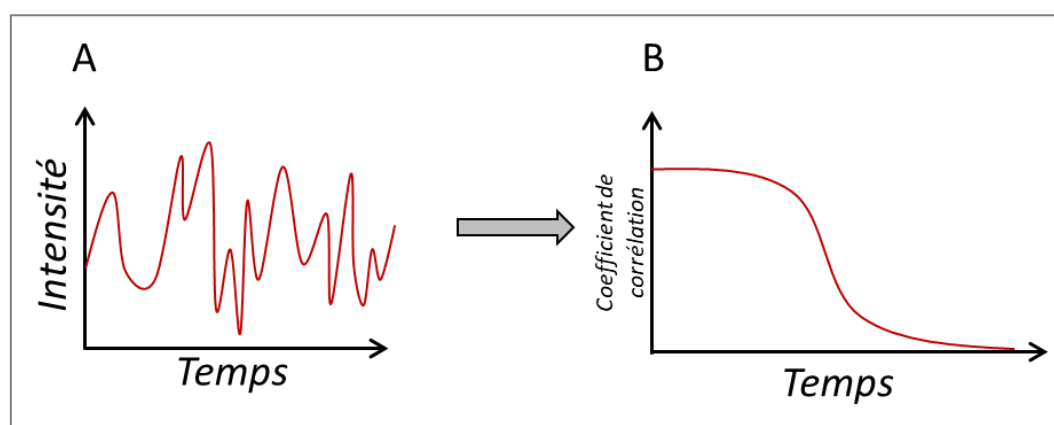


Figure A5 : (A) Fluctuation de l'intensité de la lumière diffuse au cours du temps et (B) la fonction d'autocorrélation générée

Cette fonction d'autocorrélation expérimentale est ensuite vérifiée par la fonction d'autocorrélation théorique détaillée dans l'Équation A8.

Équation A8

$$G(\tau) = 1 + b \times e^{-2D_c q^2 \tau}$$

avec :

$G(\tau)$: fonction d'autocorrélation

b : constante dépendante de l'instrument et des réglages optiques

D_c : coefficient de diffusion

τ : temps

q : variable qui dépend d'autres paramètres ([Équation A9](#))

Équation A9

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda \times \sin \frac{\theta}{2}}$$

avec :

n_0 : indice de réfraction du milieu

λ : longueur d'onde dans le vide

θ : angle de diffusion

La fonction d'autocorrélation va ensuite permettre de calculer le coefficient de diffusion des particules à partir de l'[Équation A8](#). Ce paramètre permet finalement de calculer le rayon hydrodynamique (R_h) d'une particule en appliquant l'[Équation A10](#) dérivée de l'équation Stokes-Einstein.

Équation A10

$$R_h = \frac{k_B \times T}{6\pi \times \eta \times D_c}$$

avec :

R_h : rayon hydrodynamique

k_B : constante de Boltzmann

T : température

η : viscosité

Dans le cas d'une distribution avec deux populations de particules de tailles différentes, plusieurs approximations permettent ensuite d'obtenir des pourcentages relatifs en intensité, volume et nombre comme le montre les équations suivantes ([Équation A11-A12-A13](#)).

Équation A11

$$\%Intensité = \frac{100 N_A \times a^6}{N_A \times a^6 + N_B \times b^6}$$

Équation A12

$$\%Volume = \frac{100 N_A \times a^3}{N_A \times a^3 + N_B \times b^3}$$

Équation A13

$$\%Nombre = \frac{100 N_A}{N_A + N_B}$$

Électrophorèse laser doppler

Les cellules utilisées pour la DLS peuvent être équipées d'électrodes, ce qui permet d'appliquer un champ électrique à la dispersion contenant des NPs. Les particules chargées vont alors se déplacer vers une électrode possédant une charge inverse à la leur. La longueur d'onde du faisceau diffusé sera décalée par rapport à la longueur d'onde du laser incident puisque les particules sont en mouvement (effet doppler). Ce décalage de longueur d'onde est alors mesuré pour déterminer la vitesse des particules. Cette vitesse permet ensuite de calculer la mobilité électrophorétique de la particule en appliquant l'Équation A14.

Équation A14

$$\mu_e = \frac{V}{E}$$

avec :

μ_e : mobilité électrophorétique

V : vitesse de la particule

E : intensité du champ électrique

La mobilité électrophorétique permet ensuite de calculer le potentiel zêta en utilisant la loi de Henry (Équation A15).

Équation A15

$$\zeta = \frac{3\eta \times \mu_e}{2 \times \varepsilon_r \times \varepsilon_0 \times f(Ka)}$$

avec :

ε_r : constante diélectrique

ε_0 : constante diélectrique du vide

ζ : potentiel zêta

f(Ka) : fonction de Henry

η : viscosité

Analyseur électrocinétique

Dans l'eau, les surfaces solides chargées électriquement (comme les NPs ou les membranes) forment une double couche électrique. C'est donc le même modèle présenté dans le [paragraphe II.7](#). La [Figure A6](#) permet de visualiser, à l'échelle d'une membrane, le modèle de la double couche électrique.

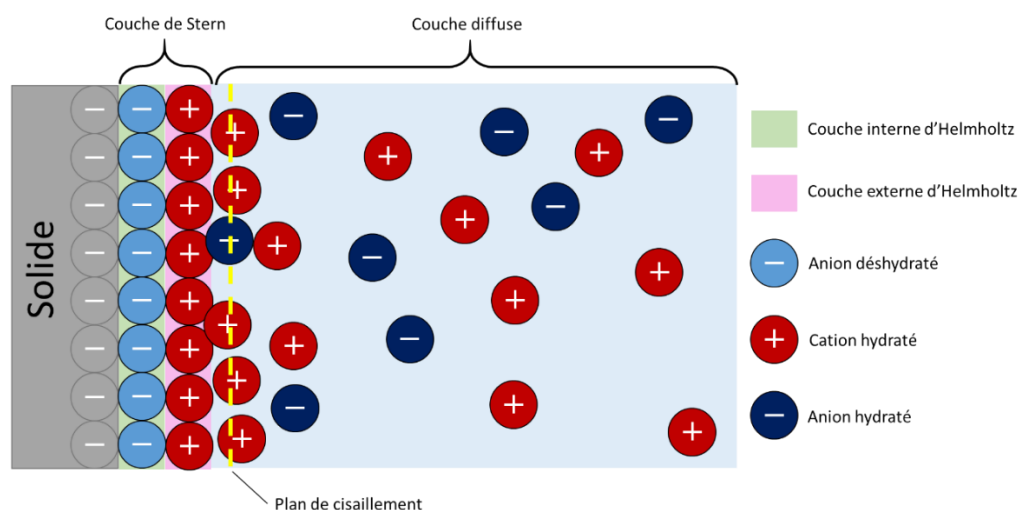


Figure A6 : Modèle de la double couche électrique

Lorsque le solide ou le liquide est en mouvement, un plan de cisaillement sépare la couche de Stern de la couche diffuse. Il représente la frontière entre la fraction du « nuage de charge » qui restera fixée au solide et la fraction qui se décrochera lors de la mise en mouvement de l'une des interfaces.

Le potentiel zêta des membranes est mesuré grâce à un effet électrocinétique qui résulte de la combinaison d'une force mécanique et d'une force électrique. Ces deux forces vont provoquer le mouvement d'une interface (liquide ou solide) par rapport à l'autre. Cet effet électrocinétique peut se traduire par un potentiel d'écoulement qui peut être généré par un flux tangentiel d'un liquide par rapport à une surface solide, ce qui entraîne une séparation des charges et par conséquent, une différence de potentiel ([Luxbacher, 2014](#))([Figure A7](#)).

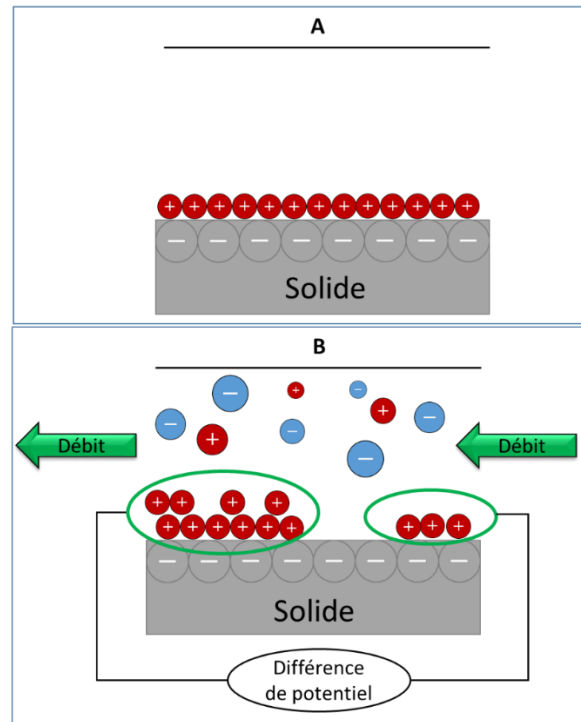


Figure A7 : Représentation de l'interface d'un solide (A) lorsque aucune force mécanique n'est appliquée et (B) lorsque la création d'une différence de potentiel est générée à la surface du solide par application du flux tangentiel

Cette différence de charge nette correspond au potentiel d'écoulement qui peut être mesuré grâce à des électrodes placées aux extrémités de la section. Le calcul du potentiel zêta peut se réaliser puisqu'il est corrélé au potentiel d'écoulement grâce à l'approche d'Helmoltz et Smoluchowski (Équation A16)(Luxbacher, 2014).

Équation A16

$$\zeta = \frac{dU_{str}}{d\Delta_p} \times \frac{\eta}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \times \frac{L}{A} \times \frac{1}{R}$$

avec :

ζ : potentiel zêta

dU_{str} : potentiel d'écoulement

$d\Delta_p$: perte de charge

η : viscosité

ε : permittivité diélectrique de la solution

ε_0 : permittivité diélectrique du vide

L : longueur de la section

A : section transversale

R : résistance électrique dans le canal

Annexe B : Figures et tableaux complémentaires du Chapitre III

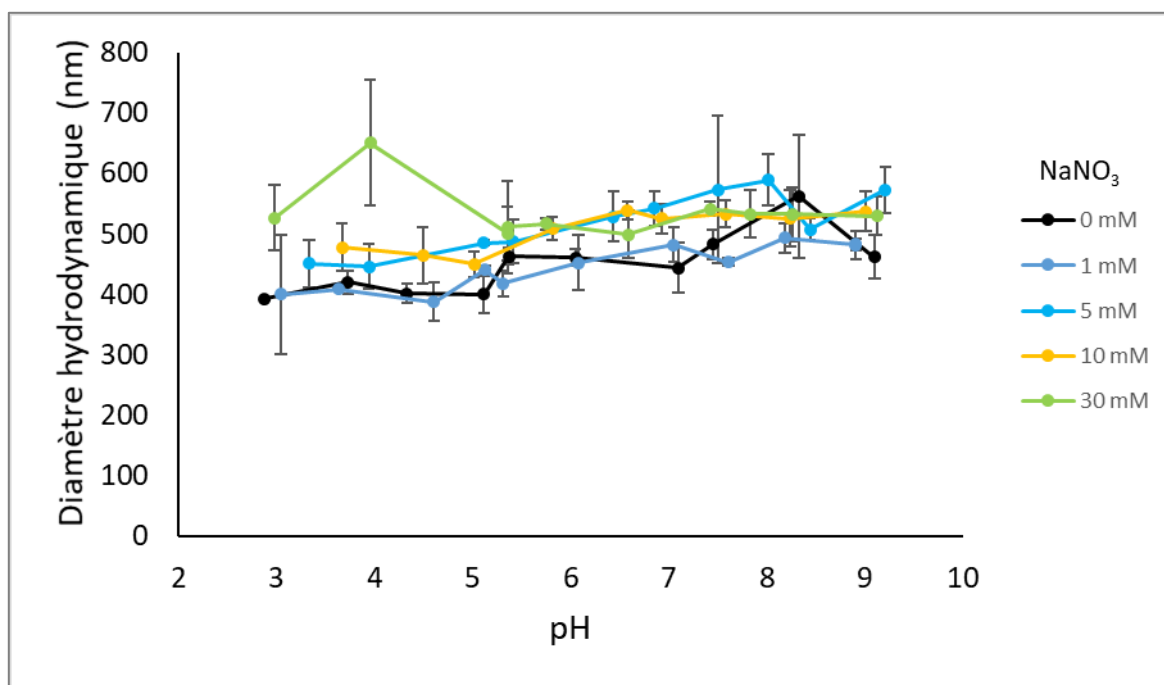


Figure B1 : Diamètre hydrodynamique des NPs de TiO₂ NPs en fonction du pH et pour différentes concentrations en NaNO₃

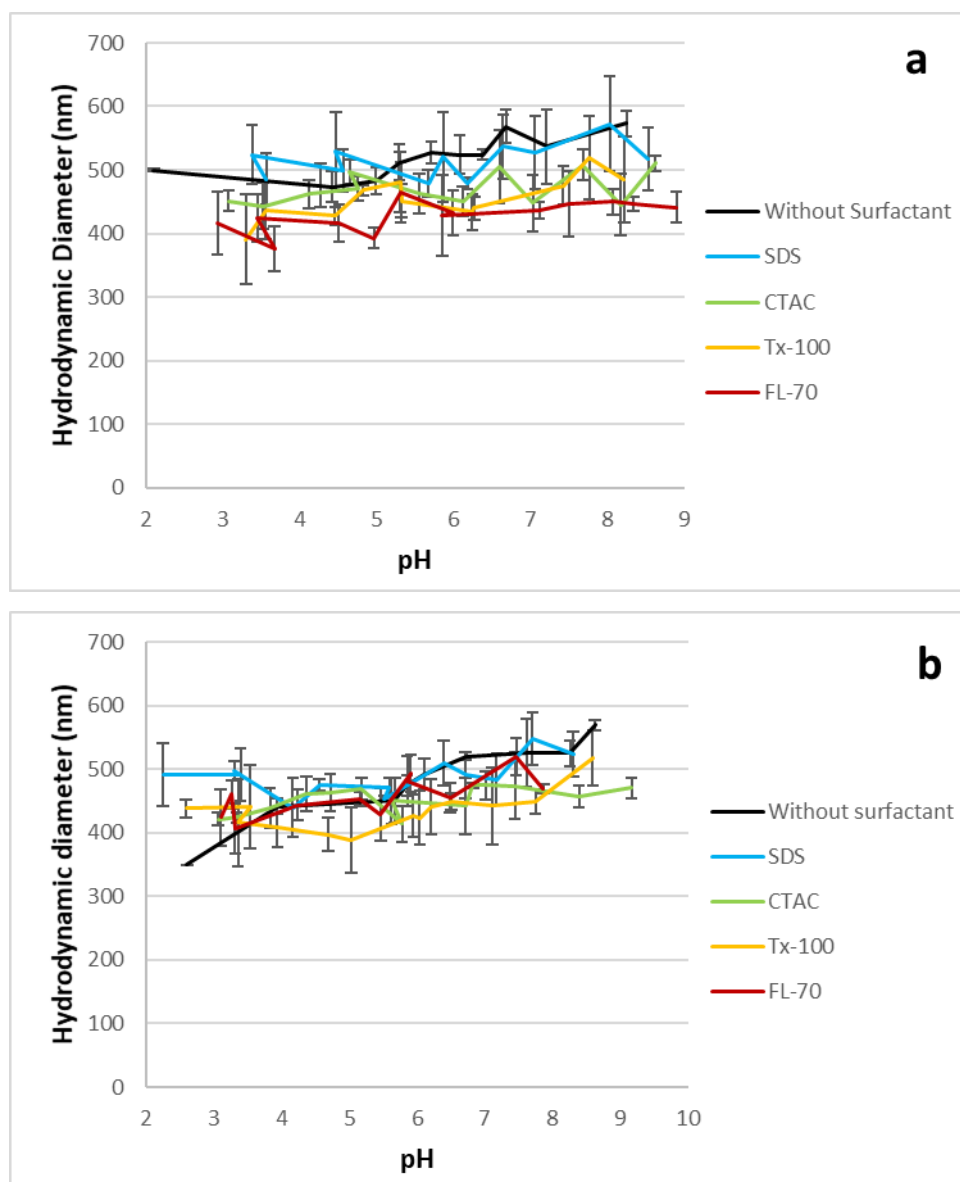


Figure B2 : Diamètre hydrodynamique des NPs de TiO_2 NPs pour différentes conditions d'éluant en fonction du pH avec ajout de NaNO_3 à (a) 0 mM and (b) 10 mM

Tableau B1 : Paramètres analytiques de l'ICP-MS Agilent 7700x

Paramètres du plasma	
RF Power	1450 W
Plasma gaz flow (Ar)	15 L.min ⁻¹
Cônes	Platine
Paramètres d'acquisition	
Mode d'acquisition	Spectrum (pour l'étalonnage) TRA (pour l'analyse AF4-ICP-MS)
Isotope analysé	47
Temps d'acquisition	500 ms
Temps d'analyse	3 min (étalonnage) / 10 min (sans rétention) / 45-60 min (avec rétention)
Nombre de réplica	3

Annexe C : Publication “Characterisation of TiO₂ nanoparticles in food additives by Asymmetric flow field flow fractionation -coupled to Inductively coupled plasma-mass spectrometry – a pilot study”

Characterisation of TiO₂ nanoparticles in food additives by Asymmetric flow field flow fractionation - coupled to Inductively coupled plasma-mass spectrometry – a pilot study (Food Analytical Methods)

Lucas Givelet^{a,b}, Delphine Truffier-Boutry^{a*}, Sylvie Motellier^a, Petru Jitaru^b, Vincent Bartolomei^a, Laurent Noël^c, Thierry Guérin^b, Jean-François Damlencourt^a

^a Université Grenoble Alpes, CEA, Laboratoire en Nanosécurité et Nanocaractérisation, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

^b Université de Paris-Est, Anses, Anses, Laboratory for Food Safety, F-94701 Maisons-Alfort, France

^c The French Directorate General for Food, Ministry of Agriculture, Agro-16 Food and Forestry, Paris, France

Corresponding author: +33 4 38 78 08 81 – E-mail address: delphine.boutry@cea.fr

Abstract:

This study aims at the optimisation of a novel analytical approach for the characterisation of TiO₂ nanoparticles (NPs) in food additives by Asymmetric Flow Field Flow Fractionation (AF4) in tandem with Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). For this purpose, the influence of pH, ionic strength and of various surfactants on the Zeta Potential (ZP) of both NPs and the AF4 membrane was assessed. Results show that the ionic strength has a considerable influence on the membrane ZP and consequently on the NPs recovery from the AF4 membrane during their separation. Therefore, ZP of the membrane can be controlled by varying the ionic strength of the analysed NPs suspension to obtain the same electrostatic charge as the NPs and hence minimizing their adsorption on the membrane. It was also confirmed that the nature of the surfactant affects mostly NPs dispersion quality than on the recovery rate. Among the surfactant investigated, ultrapure water and FL-70 provided the lowest measured gyration diameter despite the presence of aggregates. Additional parameters such as the use of different phases for the NPs dispersion and eluent composition could be taken into consideration for future experiments.

Keywords: AF4-ICP-MS, TiO₂ nanoparticles, AF4 membrane, zeta potential, optimum surfactant

1. Introduction

Nanotechnology is a fast growing innovative field with very promising applications in various fields, including food industry. The European Commission defined a nanomaterial as “a natural, incidental or manufactured material containing particles that may be unbounded, agglomerated or aggregated and where 50% or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 - 100 nm” (European Commission 2011).

Nanoparticles (NPs) are employed in many fields such as construction (Truffier-Bourty et al. 2017), automotive (Chin et al. 2018), cosmetics (Mitrano et al. 2015) and food industry. In the latter case, the presence of NPs should to be indicated on the products' label regardless their fraction (The European Parliament and the Council of the European Union 2011).

The mostly used NPs in food industry are silver (Ag), silicon dioxide (SiO₂) and titanium dioxide (TiO₂). It is worth noting that NPs of TiO₂ can be produced in three different crystallographic forms, such as *anatase*, *rutile* and *brookite*; in food industry, the *anatase* form of TiO₂ is mostly used as part of an additive known as E171 (Yang et al. 2014, Jovanović et al. 2016). This additive was initially not considered a truly nanomaterial because it contains TiO₂ particles predominantly at micrometric scale. However, recent studies showed that E171 may also contain a non-negligible fraction ($\cong 10\text{-}50\%$) of TiO₂ in form of NPs (Weir et al. 2012, Chen et al. 2013, Peters et al. 2014, Yang et al. 2014, Faust et al. 2016).

This is of particular concern because TiO₂ is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a possible human carcinogen when inhaled (IARC, 2010). A recent study reports a possible link between the ingestion of TiO₂ NPs and the progression of carcinogenesis of the colon (Bettini et al. 2017). Nevertheless, there is limited information in terms of comprehensive TiO₂ NPs toxicity when ingested. This is most likely because of the analytical challenges in the accurate characterisation of these NPs in complex matrices such as foodstuff or biological samples.

Currently, electronic microscopy (EM) is the most widely used method for NPs size determination (Chen et al. 2013, Faust et al. 2016, Dufou et al. 2017). Nevertheless, this approach is relatively expensive, time consuming and non-quantitative. The main alternatives to EM are those being capable of measuring a very large number of particles in the aliquot being analysed, such as Asymmetric Flow Field-Flow-Fractionation (AF4) (Peters et al. 2014). In this method, particles are separated according to their hydrodynamic radius by a semi-permeable membrane localized in a channel, this membrane creates a flow perpendicular to the elution flow. The separation

mechanism takes place when an equilibrium is obtained between the field forces due to the cross flow and the diffusion forces. The elution is driven by the resulting equilibrium position of the particles in the parabolic flow profile of the liquid carrier: the resulting fractogram shows a population size distribution where small particles having high diffusion coefficients were eluted first while larger particles, accumulated on the semi-permeable membrane, were eluted last.

AF4 was firstly reported by [Wahlund and Giggings \(1987\)](#) for (bio) macromolecules analysis but it has also become a powerful technique for the characterisation of nanoparticles due to its quantitative features. The conventional (non selective) detection techniques for AF4 such as multi angle light scattering (MALS) were coupled in recent years with ICP-MS for the characterization of metal based NPs also allowing accurate characterization of their chemical composition ([Kammer et al. 2011](#)).

Although the AF4-ICP-MS coupling is very promising for the qualitative and quantitative characterisation of NPs in various matrices, its main bottleneck arises from the separation step as particles agglomeration in the liquid sample solution may lead to particles losses on the AF4 membrane. Additionally, NPs agglomeration leads to variation of the NPs retention time that ultimately impacts the accurate identification of NPs by AF4 ([Contado and Pagoni 2008](#), [Nischwitz and Goenaga-Infante 2012](#), [Peters et al. 2014](#)). Interaction and/or permeation of NPs with the AF4 membrane may also occur leading to low recovery yields as it was shown by previous studies dealing with AF4 separation of various types of NPs ([Manh Thang et al. 2001](#), [Ulrich et al. 2012](#), [Loeschner et al. 2013](#), [Contado 2017](#)).

[Saenmuangchin and Siripinyanond \(2018\)](#) results show that water as carrier liquid provides a better recovery of gold NPs covered with different type of coating (polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone...) compared to surfactant-based carriers. With silica NPs, [Kato et al. \(2018\)](#) have shown by AF4 analysis that the use of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) allowed to separate 50 and 100 nm NPs. [Ulrich et al. \(2012\)](#) highlighted the impact of electrostatic interactions between particles and the membrane as a function of Ag NPs coating (polyvinyl alcohol, citrate). Regarding TiO₂ NPs, [López-Heras et al. \(2014\)](#) used a Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) as carrier liquid to improve the NPs separation. The addition of surfactants such as SDS can increase the electrostatic repulsions between the membrane and TiO₂ NPs and / or can stabilize the dispersion by steric effects with the organic chains of the surfactant ([Dubascoux et al. 2008](#)). The role of electrostatic interactions on the AF4 elution was confirmed by [Bendixen et al. \(2014\)](#) who studied the interactions occurring between TiO₂ NPs and various AF4 membranes such as based polyethersulfone (PES), regenerated cellulose (RC) and polyvinylidene fluoride (PVDF). The ZP of these membranes was always negative in the conditions of the study but depended on the type of the membrane.

The same authors showed that membrane ZP was dependent on the surfactant type and that the eluent chemical composition had also an impact on the membrane surface charge. It appeared that sodium hexametaphosphate was the most appropriate surfactant for the stabilisation of TiO₂ NPs due to the high negative charges of the membrane and the particle ZPs, hence assuring efficient NPs dispersion as well as repulsion between NPs and the membrane (Bendixen *et al.* 2014). It should therefore be noted that experimental parameters such as the pH, the ionic strength and the presence of surfactants may have an important role in achieving an efficient separation of NPs.

This study focuses on the optimisation of a novel analytical approach based on AF4-ICP-MS for the qualitative and quantitative characterisation of TiO₂ NPs (*anatase* form) as part of E171 food additive. In this respect, a reference sample containing TiO₂ NPs (NM-102) previously characterised within the framework of the Nanogenotox project (Jensen *et al.* 2011) and the Joint Research Centre (JRC) (Rasmussen *et al.* 2014) was used for method optimisation. The influence of the electrostatic interactions between TiO₂ NPs and the AF4 membrane as well as NPs agglomeration state was assessed. For this purpose, ZP of NPs and of the AF4 membranes were measured while using different elution conditions to determine the state of their surface charge and hence to determine the optimum AF4 separation conditions to apply for the further characterisation of TiO₂ NPs in the E171 food additive.

2. Material and Methods

2.1 Reagents and samples

Titanium dioxide (TiO₂) used in this work is a reference nanomaterial (NM-102, anatase) that was firstly comprehensively characterized by the JRC (Rasmussen *et al.* 2014); it has a primary particle size of 21 ± 10 nm. A stock suspension of NM-102 at a level of 1.0 g L^{-1} was prepared in ultra-pure water and then stored at room temperature in the dark. All solutions and suspensions used for this study were prepared in clear glass vials with solid caps and PolyTetraFluoroEthylene (PTFE) liners from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). All dilutions of the stock suspension were carried out by using ultrapure water produced by a Direct-Q system from Millipore. HNO₃ (Suprapur quality, 65 wt %), NaOH (Suprapur quality, 30 wt %) and NaNO₃ (>99.5 %) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (≥ 99 %), Hexadecyltrimethylammonium chloride (CTAC) (≥ 98 %), Triton X-100 (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) and FL-70 (Fisher Scientific, Hampton, USA) were used as surfactants.

The composition of FL-70 is provided in the [Table A1](#). In all cases, solutions of surfactants at 50% of their critical micellar concentration (CMC) were prepared (see [Table A2](#)).

NM-102 stock suspension (1 g.L⁻¹) was sonicated during 15 min in an ultrasonic bath before use. All suspensions obtained by NM-102 dilution were analysed within 30 min after their preparation and were sonicated 30 s just before the analysis.

2.2. Instrumentation

The density of the materials analysed in this study was determined by helium Pycnometry with an Accupyc 1330 pycnometer (Micromeritics Ltd, Hertfordshire, England).

A Brunauer, Emmett and Teller (BET) method ([Brunauer et al. 1938](#)) was used to determine the specific surface of TiO₂ NPs.

A Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Worcs, UK) was used to determine ZP with the laser doppler electrophoresis method (ELS) and the hydrodynamic diameter of the NPs with the dynamic light scattering (DLS). This device is equipped with an autotitration system allowing ZP measurement with pH variation.

Transmission electron microscopy (TEM) (Tecnai Osiris, Thermo Fisher Scientific, Eindhoven, The Netherlands) coupled with an energy dispersive X-ray dpectrometry (EDS) was employed in this study for the measurement of size distribution of the nanoparticular fraction of the samples.

ZP of the AF4 membrane was measured by means of a SurPASS electrokinetic analyser (Anton Paar GmbH, Austria) using the streaming potential approach. It consists of measuring the potential difference between the extremities of the membrane resulted after ions displacement at the interface of the solid surface (membrane) by applying a flow along the membrane.

An HPLC system (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) modified with a flow controller (Eclipse, Wyatt Technology, Goleta, USA) was used for the AF4-ICP-MS measurements. The AF4 module comprises a separation channel (Wyatt Technology, Santa Barbara, USA) of 275 mm length and 50 mm width. This channel contains a semi-permeable membrane made of regenerated cellulose (RC) with a porosity of 10 kDa (Superon, Dernbach, Germany) and a spacer of 350 µm. This system was coupled on-line simultaneously to two detectors, a multi angle light scattering (MALS, scattered light signal recorded at an angle of 90°) (Dawn Heleos II, Wyatt Technology) for NPs size measurement and an ICP-MS (7700x type from Agilent Technologies, Santa Clara, USA) for the determination of NPs chemical composition (detection of ⁴⁷Ti isotope).

2.3. Analytical procedures

2.3.1. Characterization of TiO₂ nanoparticles

2.3.1.1) Crystallographic structure

The crystallographic structure of TiO₂ NPs was assessed by X-Ray diffractometry (XRD) using a Bruker-advance diffractometer in geometry θ -2 θ , equipped with a Cu-K α source and a LynxEye linear detector. θ -2 θ patterns were achieved in order to identify the different crystallographic phases and precisely to measure their lattice parameters.

2.3.1.2) Specific surface

For the determination of the specific surface, NM-102 samples were firstly degassed at 150 °C overnight. Next, nitrogen adsorption/desorption measurements were performed at 77.3 K using a high performance gas and vapour adsorption instrument (Belsorp Max, Bel Japan). Collected isotherm points for surface area determination are between 0.05 and 0.30 relative pressure (P/P₀).

2.3.1.3) Density

For density measurements, powder of NM-102 was weighed and then deposited into a calibrated cell. The volume was measured after 24 hours equilibration. The samples were stabilized at a rate of 0.005 psi min⁻¹ at room temperature (22 ± 1 °C). With the density value and the specific surface, particles diameter was calculated based on the volume specific surface Area (VSSA) by using Eq. (1) which is applicable only for a sphere model of the NPs.

$$\text{VSSA size (nm)} = 6000/(\rho \cdot a_{\text{BET}}) \quad (1)$$

Where ρ is the density (g.cm⁻³) and a_{BET} is the specific surface (m².g⁻¹).

2.3.1.4) Microscopic measurements

For TEM measurements, the samples were prepared by simple drying of a drop of the sonicated suspension on a carbon film grid. This analytical system owns four EDS detectors giving a solid angle close to 1 steradian. Analyses were carried out in STEM mode (scanning transmission electron microscopy) using the High angle annular dark field (HAADF) detector at a high voltage of 200 kV with a probe current of 0.4 nA. The probe size was approximately 5 angstrom. Cryo-preparation was carried out using a Vitrobot plunger in liquid ethane. After sonication, a drop of the suspension was deposited on a C-FLAT carbon grid and frozen at a temperature of -180°C. Observations were made using a single tilt Gatan cryo holder working at liquid nitrogen temperature (-

180°C). Images were recorded using low-dose mode at 200 kV (dose reduced to 10 e⁻.Å.s⁻¹) with a Gatan BM-Ultrascan camera equipped with a biological scintillator.

2.3.2. Determination of zeta potential and hydrodynamic diameter of NPs

Two other parameters investigated in this study are the influence of the ionic strength and the presence of surfactants during A4F analysis. For this, a TiO₂ suspension at a concentration of 10 mg L⁻¹ was used. Before each measurement, the pH was adjusted to 9 by using a solution of NaOH and the samples were sonicated during 30 s. An aliquot of 12 mL of this suspension was used for further measurements of ZP by titration with a solution of HNO₃ at 0.14 mol L⁻¹ (this system allows a pH variation from 9 to 3). ZP and the hydrodynamic diameter were measured in triplicate at each pH value and the average was used for further calculations. The Smoluchowski model was used for the calculation of the hydrodynamic diameter, according to Stockes-Einstein equation (Eq. (2)):

$$D = (k_b \cdot T) / (6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r) \quad (2)$$

Where D is the diffusion coefficient, η is the solution's viscosity, r is the hydrodynamic radius of the particles, T is the temperature, and k_b is the Boltzmann constant.

The hydrodynamic diameter (in nm) is calculated based on the number model. For the assessment of the ionic strength influence on NPs separation by AF4, four suspensions of TiO₂ NPs at 10 mg L⁻¹ were prepared at five levels of NaNO₃: 0, 1.0, 5.0, 10 and 30 × 10⁻³ mol L⁻¹. Four surfactants were also tested, as following: SDS (anionic), CTAC (cationic), Triton X-100 (non-ionic) and FL-70 (anionic + other compounds). Each experiment was carried out in triplicate.

2.3.3. Determination of the Zeta Potential of AF4 membranes

The membrane studied here was made of regenerated cellulose (RC) having 10 kDa cut-off; the side of the membrane which is in contact with the NPs during the AF4-ICP-MS analysis was used for this purpose. ZP was measured in different conditions related to pH, ionic strength and the type of surfactant. The ionic strength was varied by adding different amounts of NaNO₃ solution in the NM-102 suspensions to reach 0, 1, 5, 10 and 30 × 10⁻³ mol L⁻¹. The influence of various types of surfactants on NPs recovery from the AF4 membrane, namely SDS, CTAC, Triton X-100 and FL-70, was also assessed. The pH influence on ZP was determined by titration of the NM-102 suspension with HNO₃ solution at 0.14 M; for this purpose, the pH was varied from 9 to 3.

2.3.4. Determination of NPs recovery and agglomeration rates by AF4-ICP-MS

Each measurement was carried out using a new membrane (RC, 10 kDa) which was previously conditioned in ultrapure water during 24 h. Additionally, the focus step was assessed each time a new membrane was used by using blue dextran (courtesy of Wyatt Technology) and the percentage of focus flow was adjusted to obtain the same starting position for the injected sample (the procedure is detailed in [appendix A](#)). After that, the water was replaced by the selected eluent and the system was equilibrated for a period of 48 to 72 h. During this period, several analyses of NM-102 suspension at 10 mg L⁻¹ were carried out in order to passivate the membrane ([Benincasa and Giddings, 1992](#)).

Quantification of TiO₂ in the AF4-ICP-MS fraction was carried out by means of external calibration approach. For this purpose, a calibration curve (10-50 µg/L range) in terms of total Ti was obtained by direct injection of NM-102 suspension into the ICP-MS in Time Resolved Analysis (TRA) mode (3 min acquisition time). AF4 was then coupled to MALS and ICP-MS detectors and three analyses of NM-102 (10 mg L⁻¹) were carried out without focus step and cross flow ([Table A3](#)). Further, three analyses of NM-102 (10 mg L⁻¹) were carried out by using both focus step and cross flow ([Table A3](#)). The optimum parameters of the AF4-ICP-MS analytical system are provided in [Table A4](#).

2.3.5 Recovery determination

In most studies, the recovery is calculated based on the ratio of peak area obtained with and without focus step and cross flow, assuming that without retention (absence of cross flow and focus step), the recovery is 100%. In this study, the NPs recovery is calculated for each condition in order to obtain more relevant results.

The first step in recovery determination consists in performing a calibration curve by injections of NM-102 suspensions in a range of 0-50 µg.L⁻¹ directly into the ICP-MS in the Time Resolved Analysis mode during 3 minutes.

The second step is the analysis of NM-102 by AF4-ICP-MS without the focus step and cross flow (CF) based on the AF4 program provided in [Table A3](#). The raw data are then converted into concentrations by using the linear regression. The new calibration curve is integrated and the peak area is then converted into mass unity (µg) by multiplying it by the flow rate of the ICP-MS sample introduction system (in L.s⁻¹) (Eq. (3)).

$$m_{\text{experimental, no CF}} = A \text{ (without CF and focus step)} * Q \quad (3)$$

Where $m_{\text{experimental, no CF}}$ is the mass of detected Ti, A is the peak area (without CF and focus step), and Q is the sample introduction flow rate.

Next, the theoretical analyte mass injected into the AF4 was calculated according to Eq. (4):

$$m_{\text{theoretical}} = [\text{TiO}_2] * V_{\text{inject}} \quad (4)$$

Where $m_{\text{theoretical}}$ is the theoretical mass of injected Ti, and V_{inject} is the injection volume.

Finally, a first recovery tacking into account the possible TiO_2 loss during injections in the channel without focus step and cross flow was calculated based on Eq. (5):

$$\text{Recovery (without CF and focus step)} = m_{\text{experimental, no CF}} / m_{\text{theoretical}} \quad (5)$$

After these two steps, three analyses of TiO_2 suspensions were realized using the separation method with focus step and cross flow (see the AF4 program in Table A3). The same approach was applied to calculate the peak area. The recovery factors were obtained by calculating the ratio between the peak area without focus step and cross flow and the one of NPs TiO_2 with focus step and cross flow (Eq. (6)):

$$\text{Recovery (with CF and focus step)} = \text{Recovery (without CF and focus step)} * (A_{\text{(with CF and focus step)}} / A_{\text{(without CF and focus step)}}) \quad (6)$$

where $A_{\text{(with CF and focus step)}}$ is the peak area obtained with the cross flow and the focus step

All the presented recoveries are averages of three replicates.

2.3.6 Data treatment

The root mean square (rms) diameter was evaluated based on the AF4 elution profile of the particle population by fitting the angular dependence of the scattered intensity variation using Berry and Zimm model.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of TiO_2 nanoparticles of the NM-102 material

NM-102 material was firstly analysed by XRD in order to assess its crystallographic structure (*anatase* in this case). (See FigA1). The density ($\rho = 3.94 \pm 0.23 \text{ g.cm}^{-3}$) was measured by pycnometry while the specific surface ($a_{\text{BET}} = 79.1 \pm 0.8 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) was measured by BET. It is worth noting that the value of the latter parameter is similar with other reported values (Krystek et al. 2014).

TiO_2 (nano)particles diameter in the NM-102 material calculated based on eqn. (2) was $19.3 \pm 1.4 \text{ nm}$, which is in agreement with the data obtained by TEM (see Fig1) and other studies (Jensen et al. 2011, Rasmussen et al. 2014).

EDS analysis confirmed also the chemical nature of the NM-102 material but assessed also the presence of a very thin layer of silicon around TiO_2 NPs, which most probably originates from the glass vials used for the preparation

(and storage) of the suspensions. Silica may also arise from the manufacturing process of primary mineral for TiO_2 (*ilmenite*) which is known to contain traces of this element (Gázquez *et al.* 2014).

3.2. Assessment of NPs zeta potential

The ionic strength and the presence of surfactant may affect the ZP values of the NPs. This last parameter and the AF4 membrane ZP are expected to impact the separation and / or the NPs recovery rate (Ulrich *et al.* 2012, Bendixen *et al.* 2014). Indeed, if particles and membrane have surface charge with opposite signs, an electrostatic attraction is promoted and induces an adsorption effect of the particles on the membrane. The data in terms of ZP of NPs present in the NM-102 material are shown in Fig2A. It is interesting to note that no isoelectric point (IEP) was observed when varying suspensions pH at different ionic strength (Fig2A). Actually, ZP remained negative throughout the whole pH range, which is in agreement with Freyre-fonseca *et al.* (2016). In their case, IEP at $\text{pH} < 2$ was obtained only for suspensions of TiO_2 NPs (from Sigma Aldrich) and E171 in water. Nevertheless, Dufou *et al.* (2017) obtained IEP at $\text{pH} \cong 4$ for several E171 samples. This difference may be explained by the presence of silica on the surface of the NPs, taking into account that IEP of silica is between pH of 2 and 4 (Lin *et al.* 2002, Teleki *et al.* 2008, Chen *et al.* 2010).

Fig2B shows the average size of TiO_2 agglomerates for each ionic strength conditions. Regarding the hydrodynamic diameter assessment, one population of agglomerates is observed for all the NaNO_3 concentrations and do not change with the pH variation (see FigsA2a-b). The size varies between 450 and 520 nm for all conditions and it is unexpected to not observe significant difference with pH variation. It may be due to the technical limit of the DLS when samples are polydisperse. For all measurements, the polydispersity index (PDI) is > 0.57 hence confirming the relatively wide range of size of the particles. Simultaneous tandem techniques such as AF4-MALS and AF4-ICP-MS are therefore necessary to analyse this type of samples.

As the ionic strength influences the ZP, suspensions containing different surfactants were analysed at two different ionic forces, namely corresponding to 0 and 10 mM of NaNO_3 . As can be seen in Figs3A-B, the differences in ZP are very small for the two ionic strengths conditions studied here. Conversely, a strong variation of TiO_2 NPs ZP was noticed when using different types of surfactant. It is interesting to note that ZP of the NPs is negative on the entire pH range investigated here (3 to 9) for the anionic surfactant such as SDS, whereas it is thoroughly positive in the presence of a cationic surfactant (CTAC). For Triton X-100 and FL-70, IEP is reached at $\text{pH} \cong 3.5$. Therefore, SDS seems to be the most appropriate surfactant because it provides higher absolute values of ZP hence leading to efficient NPs stabilization.

Concerning the hydrodynamic diameter, no variation is observed in the presence of various surfactants, with agglomerates size ranging from 400 and 600 nm. Consequently, the presence of surfactants does not seem to improve the dispersion state.

3.3 Zeta potential of the membrane

The impact the ionic strength on the AF4 membrane (RC type) was also assessed in this study. As can be seen in [Fig4](#), the ionic strength plays an important role and even can reverse the sign of the membrane surface charge. At 0 mM and 1 mM of NaNO_3 , ZP is <0 on the almost entire pH range, whereas for the ionic strength corresponding to NaNO_3 concentrations ≥ 5 mM, the membrane becomes positively charged and ZP is enhanced with the increase of the ionic strength. This is probably due to the Na^+ presence coming from the addition of NaNO_3 . These results are comparable with those obtained in other studies ([Bendixen et al. 2014](#), [Meisterjahn et al. 2016](#)). In turn, when no NaNO_3 is used, the pH shows a significant influence on the ZP, (see [Fig4](#)). This finding is probably the result of the protonation of the hydroxyl groups being present at the surface of the RC AF4 membrane. This effect can also be slightly observed for the elution using 1.0 mM of NaNO_3 . For the other conditions, pH does not significantly influence the ZP. This is probably due to the competition between Na^+ (from NaNO_3) and H_3O^+ ions on the ether and hydroxyl surface functions of the RC membrane, considering that Na^+ is significantly more concentrated than H_3O^+ for the pH range studied here.

As the ionic strength has a significant influence on the ZP, the effect of the different surfactants on the membrane was also studied at two different concentrations of NaNO_3 , namely at 0 mM and 10 mM, in order to achieve negative and positive ZP of the membrane, respectively ([Fig4](#)). When no NaNO_3 is used, ZP of the membrane remained highly positive with the CTAC whatever the pH value, contrary to the SDS for which ZP is always negative ([Fig5A](#)). Membrane ZP is less negative in the presence of SDS surfactant than without surfactant; this parameter seems to increase with the enhancement of the level of Na^+ originating from the SDS solution as it was seen for the ionic strength results when using NaNO_3 ([Fig4](#)). The same behaviour was observed for the FL-70 surfactant since it is a mixture containing several ions including Na^+ (see [Table A1](#)). At higher ionic strength (corresponding to 10 mM, see [Fig5B](#)), all ZP curves are in the positive range. All the conditions with surfactants provide higher ZP values compared to conditions without any surfactant. For SDS and FL-70 surfactants, this finding is probably due to Na^+ coming from the surfactant itself. This significant difference shows that the surfactant does not critically influence ZP as it was the case for the ionic strength (see [Table 1](#)).

Based on these results, seven AF4-ICP-MS experimental conditions were (Table 2) tested further in order to assess the effect of the ZP on NPs dispersion and also the adsorption onto the AF4 membrane.

Without the use of NaNO_3 , ZP of both particles and membrane is negative when using SDS but also without any surfactant, hence indicating the occurrence of electrostatic repulsions between the membrane and particles. When using NaNO_3 at 10 mM, ZPs of the particles remain <0 with SDS and without surfactant, but the ZPs of the membrane is >0 , hence leading to an electrostatic attraction. CTAC, Triton X-100 and FL-70 lead to electrostatic repulsion since the ZPs of the particles and of the membrane have the same signs. They were therefore selected for further experiments to compare different kinds of surfactant. These findings are therefore very useful to understand the correlation between the chemical nature of the AF4 eluent, the recovery yields and dispersion states of the NPs during AF4 measurements.

3.4 Determination of the NPs recovery and the agglomeration rates by AF4-ICP-MS

TiO_2 NPs (NM-102) were analysed by tandem AF4-MALS-ICP-MS based on the chosen conditions described previously (see also Table 2). The eluent pH values shown in Table 2 correspond to equilibrium states and they were directly measured after eluent preparation, except for the solution containing Triton X-100 for which the pH was adjusted by NaOH addition. The fractograms obtained in these conditions are shown in Figs6 - 7, respectively. It is interesting to highlight that MALS and ICP-MS based fractograms are very similar. Nevertheless, when using SDS surfactant, two populations were obtained by AF4-MALS (Fig6A) whereas only one peak was obtained by AF4-ICP-MS (Fig7A). This difference can be explained by the fact that the MALS detector is more sensitive to large particles and aggregates whereas the ICP-MS detects only the chemical nature composing the NPs, titanium element in this case. In the latter case (Fig7B-E), two different features are also observed. The first part of the fractogram (<24 min) is rather smooth whereas the second part (24-35 min) is characterized by a noisier signal corresponding to more dispersed sizes of particles. The second part of the fractogram corresponds to the elution times with a cross flow value set back to $0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Detected particles are likely aggregated, corresponding to those adsorbed onto the membrane and released erratically.

Regarding particles size measured by the MALS detector, Table 3 presents the most frequent gyration diameter and the gyration diameter obtained at 10% of the peak elevation. The eluent containing SDS surfactant resulted in a well-dispersed population (Fig6A) with the most frequent gyration diameter equal to 88 nm. This value, as well as the gyration diameter detected at 10% of the peak elevation (63 nm), are higher than the diameter reported by JRC (21 nm, TEM) (Rasmussen *et al.* 2014), which confirms that NPs aggregates are still present.

Fig6B-C show that NPs are aggregated without surfactant or with CTAC: their most frequent gyration diameters are respectively 420 and 224 nm. They are considerably higher than the one observed using SDS (88 nm) (Table 3). Consequently, these eluents are not suitable for TiO₂ analysis by AF4-ICP-MS, hence confirming that the choice of the surfactant type is more critical than the ZP value to obtain efficient particles dispersion. With FL-70 (Fig6D), the most frequent gyration diameter measured is 348nm, showing that NPs are aggregated. Nevertheless, a small fraction is well dispersed at the beginning of the peak with a gyration diameter of about 49 nm (Table 3). When the elution step is carried out with Triton X-100 (Fig6E), the gyration diameter obtained at 10% of the peak elevation was of about 39 nm (Table 3), in agreement with the data reported by JRC (Rasmussen et al. 2014), taking into account uncertainty. Consequently, an efficient dispersion was obtained in this case, despite the recurring presence of aggregates (272 nm).

The recovery yield of NPs for each analysis was assessed based on AF4-ICP-MS measurements. For this purpose, calibration of ICP-MS solely was carried out by using NM-102. Further, analysis of NM-102 NPs was carried out using the AF4-ICP-MS with or without cross flow and focus step (see Table A3).

For each elution condition, the recoveries were significantly lower when a focus step and a cross flow were applied (Fig8). These parameters influence both the mobility of particles near to the AF4 membrane and also increase the probability of their adsorption/permeation on the membrane lead to low recoveries yields. Five elution conditions allow obtaining the same signs of the ZP of the NPs and of the membrane while two others provide opposite signs (Table 2). The two conditions leading to opposite signs were obtained when NaNO₃ was added to water or SDS solution, hence changing the sign of the membrane ZP. The lowest recovery yields were obtained using these two conditions. NPs adsorption onto the AF4 membrane is enhanced by electrostatic attractions because the membrane and the NPs have opposite signs of their surface ZP. Dubascoux et al. (2008) reported a similar result with the use of a different salt (NH₄NO₃), when a decrease of NPs recovery was also noticed with the increase of the salt concentration.

Regarding the five other eluent conditions, for which the ZP of the membrane and of the particles have the same sign, the highest recovery is obtained when using FL-70 and Triton X-100 surfactant and the lowest with the SDS based eluent. As it was previously mentioned, FL-70 surfactant is a mixture of different compounds (Table A1) including ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) which may adsorb on TiO₂ particles surface (Kim and Choi 2010) which probably leads to the formation of a protective coating against adsorption on the AF4 membrane. These results are similar to those obtained by Meisterjahn et al. (2016) for gold NPs. Comparing this finding with the ZP of the membrane measured without the use of NaNO₃ (Table 2), elution with SDS provides the lowest

absolute ZP value (-19.1 mV) while the other conditions provide absolute ZP value of > 30 mV. In the case of SDS based elution, the membrane is probably insufficiently electrostatically charged and hence NPs repulsion is scarce. Therefore, low ionic strength allows to obtain high AF4 membrane ZP hence providing efficient electrostatic repulsion of NPs leading to satisfactory AF4 recovery yields.

4. Conclusion

This pilot study dealt with a comprehensive characterization of the nanoparticulate fraction of material (NM-102) containing TiO₂ nanoparticles (*anatase* form) that are commonly present in the E171 food additive. The peculiarity of TiO₂ NPs in *anatase* form is that their interactions with the AF4 membrane is more critical compared to other types of NPs. AF4 conditions were optimized by taking into account the effect of several physicochemical parameters such as ionic strength, type of surfactant and pH of the solutions/dispersions in order to achieve the most efficient electrostatic interactions between NPs and the membrane, which largely controls the accuracy of AF4-ICP-MS measurement. The ionic strength leads to an increase of the membrane ZP, most probably as the result of Na⁺ interaction with the cellulose membrane surface. In such conditions, membrane ZP becomes positive whereas the NPs are negatively charged hence leading to efficient adsorption of particles on the membrane. Nevertheless, the aggregation rate and recovery rate are more critically influenced by the chemical nature of the eluent than by NPs ZP. Interestingly, elution with a Triton X-100-based eluent provides the smallest gyration diameters observed at 10% of the peak elevation (39 nm). In addition, the use of carrier liquid with SDS allowed to detect the smallest population in diameter, 88 nm. These conditions seem to be the most efficient to disperse TiO₂ particles despite the fact that agglomerates can still be present. Nevertheless, the low recovery obtained may suggest an incomplete sample representativeness. Further investigation based on these two eluents are necessary for the assessment of the pH effect and of the surfactant concentration on the accuracy of AF4-ICP-MS measurement are necessary in order to improve the recovery and the dispersion of TiO₂ NPs. Moreover, it could also be interesting to use different solvents for the NPs dispersion and for the AF4 separation. Finally, the method can be applied to other types of NPs to confirm its reliability for a larger variety of materials containing (TiO₂) nanoparticles such as the E171 food additive.

Acknowledgment

We thank Nathalie Pélissier for the help with TEM and EDS measurements.

The AF4-ICP-MS equipment was funded by the French National Research Agency (Equipex project ANR-10-EQPX-39-01) NanoID.

References

- Bendixen N, Losert S, Adlhart C, et al (2014) Membrane-particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with titanium dioxide nanoparticles. *J Chromatogr A* 1334:92–100. doi: 10.1016/j.chroma.2014.01.066
- Benincasa MA, Giddings JC (1992) Separation and Molecular Weight Distribution of Anionic and Cationic Water-Soluble Polymers by Flow Field-Flow Fractionation. *Anal Chem* 64:790–798. doi: 10.1021/ac00031a016
- Bettini S, Boutet-Robinet E, Cartier C, et al (2017) Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci Rep* 7:40373. doi: 10.1038/srep40373
- Brunauer S, Emmett PH, Teller E (1938) Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J Am Chem Soc* 60:309–319. doi: 10.1021/ja01269a023
- Chen Q, Boothroyd C, Soutar AM, Zeng XT (2010) Sol-gel nanocoating on commercial TiO₂ nanopowder using ultrasound. *J Sol-Gel Sci Technol* 53:115–120. doi: 10.1007/s10971-009-2066-3
- Chen XX, Cheng B, Yang YX, et al (2013) Characterization and preliminary toxicity assay of nano-titanium dioxide additive in sugar-coated chewing gum. *Small* 9:1765–1774. doi: 10.1002/sml.201201506
- Chin KM, Sung Ting S, Ong HL, Omar M (2018) Surface functionalized nanocellulose as a veritable inclusionary material in contemporary bioinspired applications: A review. *J Appl Polym Sci* 135:. doi: 10.1002/app.46065
- Contado C (2017) Field flow fractionation techniques to explore the “nano-world.” *Anal and Bioanal Chem* 409:2501–2518. doi: 10.1007/s00216-017-0180-6
- Contado C, Pagnoni A (2008) TiO₂ in commercial sunscreen lotion: Flow field-flow fractionation and ICP-AES together for size analysis. *Anal Chem* 80:7594–7608. doi: 10.1021/ac8012626
- Dubascoux S, Von Der Kammer F, Le Hécho I, et al (2008) Optimisation of asymmetrical flow field flow fractionation for environmental nanoparticles separation. *J Chromatogr A* 1206:160–165. doi: 10.1016/j.chroma.2008.07.032
- Dudefoi W, Terrisse H, Richard-Plouet M, et al (2017) Criteria to define a more relevant reference sample of titanium dioxide in the context of food: a multiscale approach. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 34:653–665. doi: 10.1080/19440049.2017.1284346
- Faust JJ, Doudrick K, Yang Y, et al (2016) A facile method for separating and enriching nano and submicron particles from titanium dioxide found in food and pharmaceutical products. *PLoS One* 11:1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0164712
- Freyre-fonseca V, Téllez-medina DI, Medina-reyes EI, et al (2016) Morphological and Physicochemical Characterization of Agglomerates of Titanium Dioxide Nanoparticles in Cell Culture Media. *J Nanomater* 2016:. doi: 10.1155/2016/5937932
- Gázquez MJ, Bolívar JP, García-Tenorio R, Vaca F (2014) A Review of the Production Cycle of Titanium Dioxide Pigment. *Mater Sci Appl* 05:441–458. doi: 10.4236/msa.2014.57048
- IARC (2010) Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks to Humans* 93:1–413
- Jensen KA, Kembouche Y, Christiansen E, et al (2011) Final protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media
- Jovanović B, Bezirci G, Çağan AS, et al (2016) Food web effects of titanium dioxide nanoparticles in an outdoor

- freshwater mesocosm experiment. *Nanotoxicology* 10:902–912. doi: 10.3109/17435390.2016.1140242
- Kato H, Nakamura A, Banno H, Shimizu M, (2018) Separation of different-sized silica nanoparticles using asymmetric flow field-flow fractionation by control of the Debye length of the particles with the addition of electrolyte molecules. *Colloid Surf A* 538:678–685. doi: doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.11.067
- Kammer F von der, Legros S, Hofmann T, et al (2011) Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *TrAC - Trends Anal Chem* 30:425–436. doi: 10.1016/j.trac.2010.11.012
- Kim G, Choi W (2010) Charge-transfer surface complex of EDTA-TiO₂ and its effect on photocatalysis under visible light. *Appl Catal B Environ* 100:77–83. doi: 10.1016/j.apcatb.2010.07.014
- Krystek P, Tentschert J, Nia Y, et al (2014) Method development and inter-laboratory comparison about the determination of titanium from titanium dioxide nanoparticles in tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 3853–3861. doi: 10.1007/s00216-013-7580-z
- Lin YL, Wang TJ, Jin Y (2002) Surface characteristics of hydrous silica-coated TiO₂ particles. *Powder Technol* 123:194–198. doi: 10.1016/S0032-5910(01)00470-3
- Loeschner K, Navratilova J, Legros S, et al (2013) Optimization and evaluation of asymmetric flow field-flow fractionation of silver nanoparticles. *J Chromatogr A* 1272:116–125. doi: 10.1016/j.chroma.2012.11.053
- López-Heras I, Madrid Y, Cámara C (2014). Prospects and difficulties in TiO₂ nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field-flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 124:71–78. doi: 10.1016/j.talanta.2014.02.029
- Manh Thang N, Geckeis H, Kim J., Beck H. (2001) Application of the flow field flow fractionation (FFFF) to the characterization of aquatic humic colloids: evaluation and optimization of the method. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 181:289–301. doi: 10.1016/S0927-7757(00)00803-7
- Meisterjahn B, Wagner S, von der Kammer F, et al (2016) Silver and gold nanoparticle separation using asymmetrical flow-field flow fractionation: Influence of run conditions and of particle and membrane charges. *J Chromatogr A* 1440:150–159. doi: 10.1016/j.chroma.2016.02.059
- Mitrano DM, Motellier S, Clavaguera S, Nowack B (2015) Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products. *Environ Int* 77:132–147. doi: 10.1016/j.envint.2015.01.013
- Nischwitz V, Goenaga-Infante H (2012) Improved sample preparation and quality control for the characterisation of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using flow field flow fractionation on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* 27:1084–1092. doi: 10.1039/c2ja10387g
- Peters RJB, van Bommel G, Herrera-Rivera Z, et al (2014) Characterization of Titanium Dioxide Nanoparticles in Food Products: Analytical Methods To Define Nanoparticles. *J Agric Food Chem* 62:6285–6293. doi: 10.1021/jf5011885
- Rasmussen K, Mast J, Temmerman P-J De, et al (2014) Titanium Dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: Characterisation and Physico- Chemical Properties
- Saenmuangchin R, Siripinyanond A (2018) Flow field-flow fractionation for hydrodynamic diameter estimation of gold nanoparticles with various types of surface coatings. *Anal and Bioanal Chem* 410:6845–6859. doi: 10.1007/s00216-018-1284-3
- Teleki A, Akhtar MK, Pratsinis SE (2008) The quality of SiO₂-coatings on flame-made TiO₂-based nanoparticles.

- J Mater Chem 18:3547–3555. doi: 10.1039/b803039a
- The Council of the European Union (2011) Recommendation on the definition of a nanomaterial (2011/696/EU). In: Off. J. Eur. Union. https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomater-18102011_en.pdf. Accessed 22 Oct 2018
- The European Parliament and the Council of the European Union (2011) REGULATION (EU) No 1169/2011 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, an. In: Off. J. Eur. Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32011R1169>. Accessed 22 Oct 2018
- Truffier-Boutry D, Fiorentino B, Bartolomei V, et al (2017) Characterization of photocatalytic paints: A relationship between the photocatalytic properties-release of nanoparticles and volatile organic compounds. *Environ Sci Nano* 4:1998–2009. doi: 10.1039/c7en00467b
- Ulrich A, Losert S, Bendixen N, et al (2012) Critical aspects of sample handling for direct nanoparticle analysis and analytical challenges using asymmetric field flow fractionation in a multi-detector approach. *J Anal At Spectrom* 27:1120–1130. doi: 10.1039/c2ja30024a
- Wahlund KG, Giddings JC (1987) Properties of an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel Having One Permeable Wall. *Anal Chem* 59:1332–1339. doi: 10.1021/ac00136a016
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, et al (2012) Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci {&} Technol* 46:2242–2250. doi: 10.1021/es204168d
- Yang Y, Doudrick K, Bi X, et al (2014) Characterization of food-grade titanium dioxide: The presence of nanosized particles. *Environ Sci Technol* 48:6391–6400. doi: 10.1021/es500436x

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Compliance with Ethical Standards**Conflict of Interest**

Lucas Givelet declares that he has no conflict of interest. Delphine Truffier-Boutry declares that she has no conflict of interest. Sylvie Motellier declares that she has no conflict of interest. Petru Jitaru declares that he has no conflict of interest. Vincent Bartolomei declares that he has no conflict of interest. Laurent Noël declares that he has no conflict of interest. Thierry Guérin declares that he has no conflict of interest. Jean-François Damlencourt declares that he has no conflict of interest.

Ethical Approval

This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors. This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Figure caption

Figure 1: TEM-EDS characterization of TiO₂ NPs in the NM-102 material.

Figure 2: Zeta potential (a) and hydrodynamic diameter (b) of the NM-102 TiO₂ NPs function of pH with the variation of the ionic strength of the corresponding suspension.

Figure 3: Zeta potential of TiO₂ NPs in NM-102 as a function of pH with the addition of different surfactants in the suspension at 50% of their CMC and with NaNO₃ at (a) 0 mM and (b) 10 mM levels.

Figure 4: Zeta potential of AF4 membrane (RC 10 kDa) as a function of pH and ionic strength (expressed here in terms of NaNO₃ concentration)

Figure 5: Zeta potential of the AF4 membrane (RC 10 kDa) as a function of pH and the addition of different surfactants at 50% of their CMC with NaNO₃ at (a) 0 mM and (b) 10 mM levels.

Figure 6: MALS fractograms obtained for the analysis of NM-102 for different elution conditions: (A) SDS, (B) water, (C) CTAC, (D) FL-70, (E) Triton X-100

Figure 7: AF4-ICP-MS fractograms obtained for analysis of NM-102 for different elution conditions: (A) SDS, (B) water, (C) CTAC, (D) FL-70, (E) Triton X-100.

Figure 8: Recovery yields obtained for the analysis of TiO₂ NPs in NM-102 material by AF4-ICP-MS by using two elution approaches ([Table A3](#)). Repulsion = same ZP sign for the NPs and AF4 membrane. Attraction = opposite ZP sign for the NPs and AF4 membrane.

Table

Table 1: Synthesis of zeta potential signs as a function of eluent, pH and NaNO₃ concentration

Surfactant	Without Surfactant		SDS		CTAC		Triton X-100		FL-70	
NaNO ₃ Concentration	< 5 mM	> 5 mM	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM
Particles zeta potential							 IEP = 3,5	 IEP = 3,3	 IEP = 3,9	 IEP = 3,3
Membrane zeta potential	 IEP = 3,2						 IEP = 4		 IEP = 3,5	

Table 2: Zeta potential of TiO₂ NPs (NM-102) and AF4 membrane (RC10 kDa) obtained in different elution conditions

Elution condition	Zeta potential of particles (mV)	Zeta potential of the membrane (mV)
No surfactant pH = 5.5-6	- 39.7	- 49.0
SDS pH = 5.5-6	- 36.0	- 19.1
CTAC pH 5.5-6	+ 36.5	+ 36.0
Triton X-100 pH = 7.5	- 42.0	- 49.5
FL-70 pH = 9	- 40.5	- 32.2
Without surfactant + NaNO ₃ (10 mM) pH = 5.5-6	- 31.4	+ 4.8
SDS + NaNO ₃ (10 mM) pH = 5.5-6	- 38.5	+ 18.6

Table 3: The most frequent gyration diameter and the gyration diameter at 10% of the peak height according to the carrier liquid

Surfactant	Without surfactant	SDS	CTAC	Tx-100	FL-70
The most frequent gyration diameter (nm)	420	88	224	272	348
Equivalent gyration diameter at 10% of the peak height (nm)	143	63	196	39	49

Figure 1

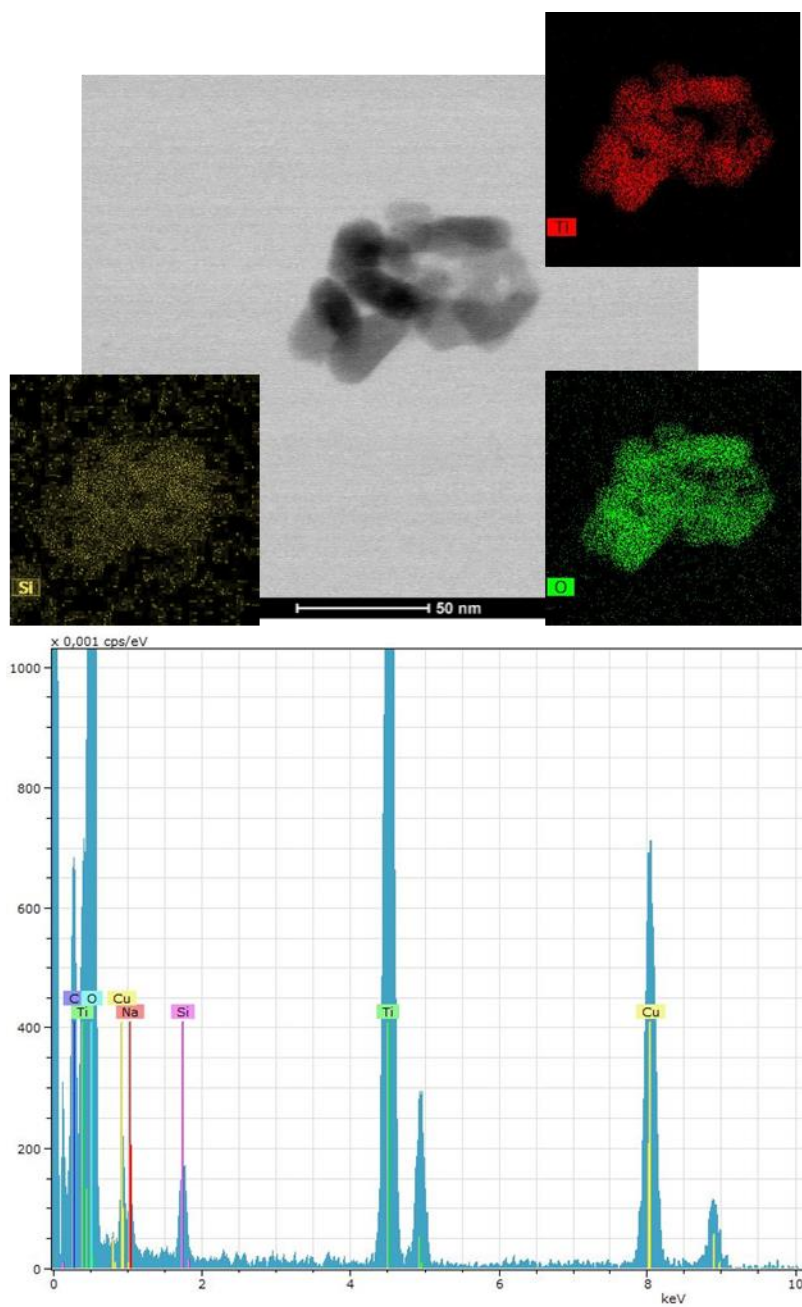


Figure 2

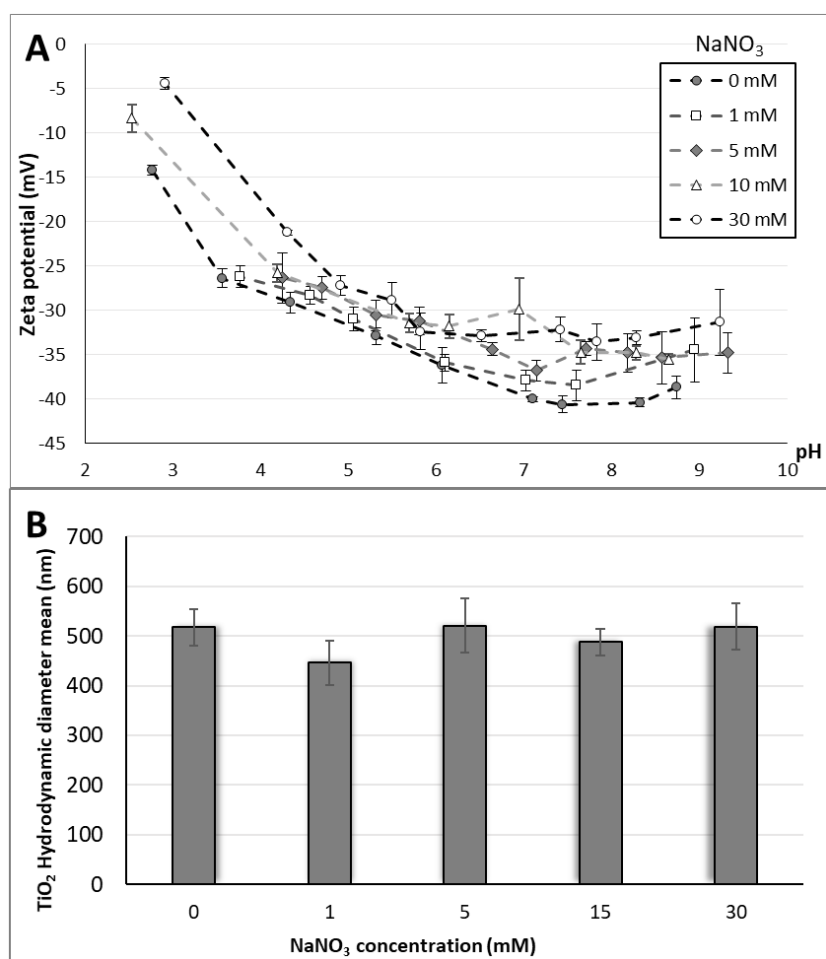


Figure 3

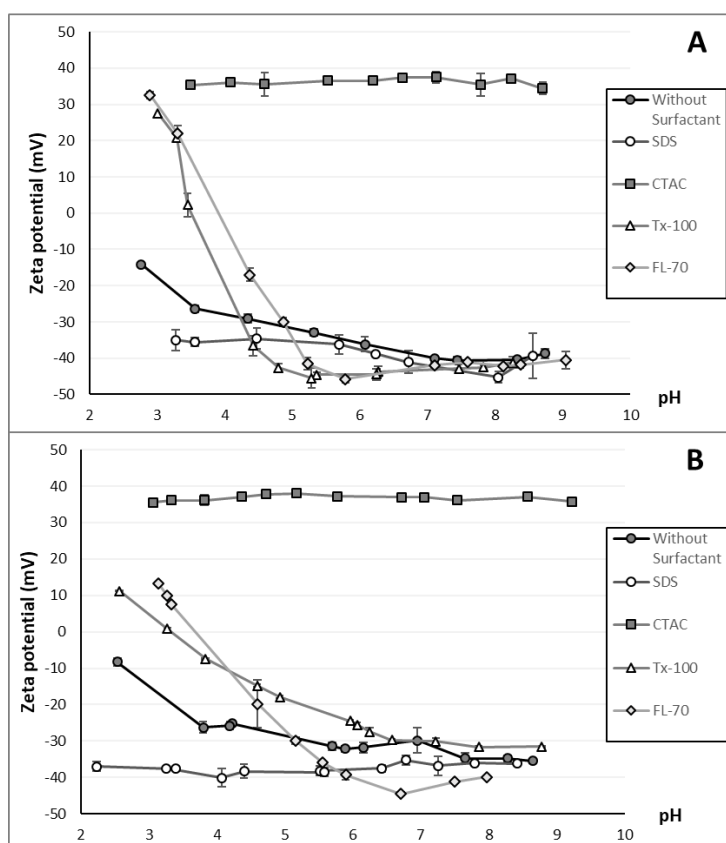


Figure 4

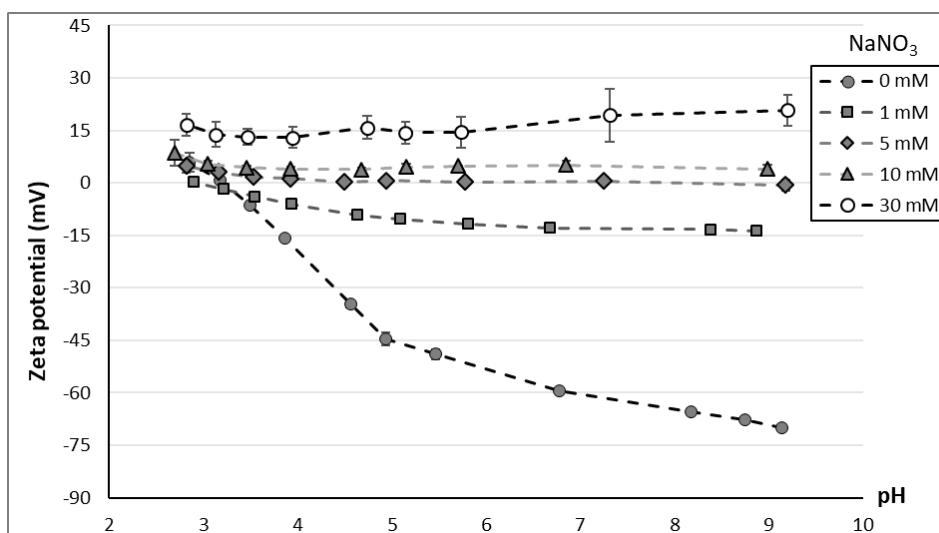


Figure 5

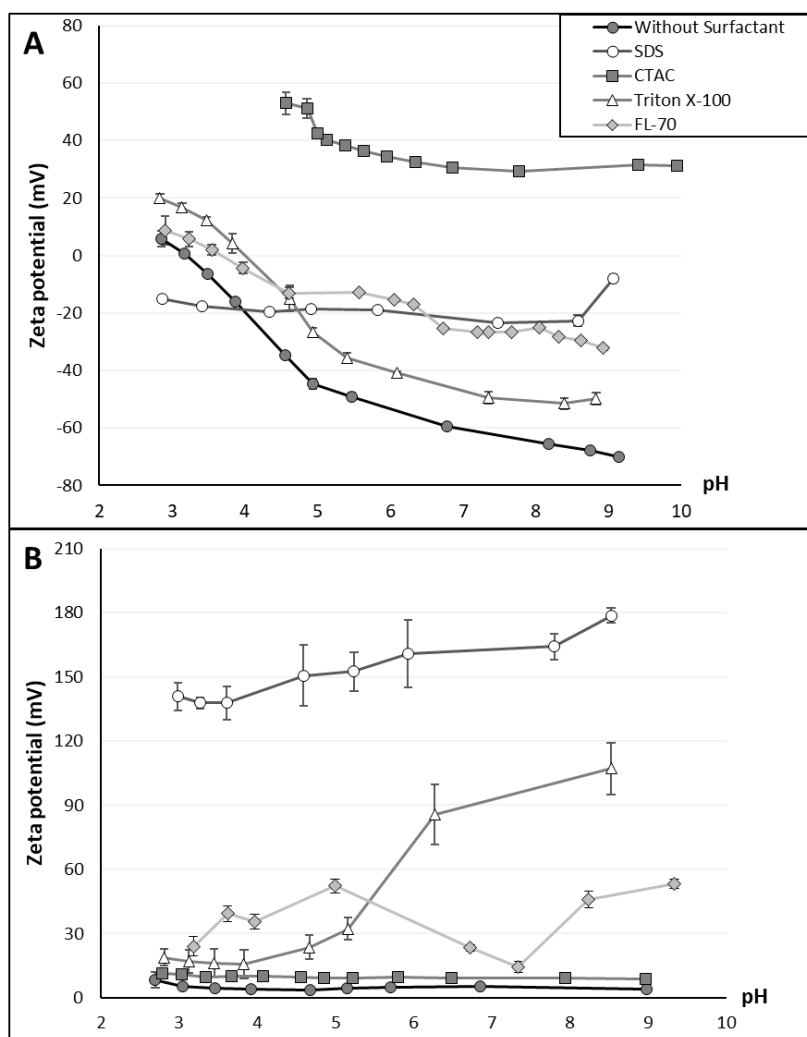


Figure 6

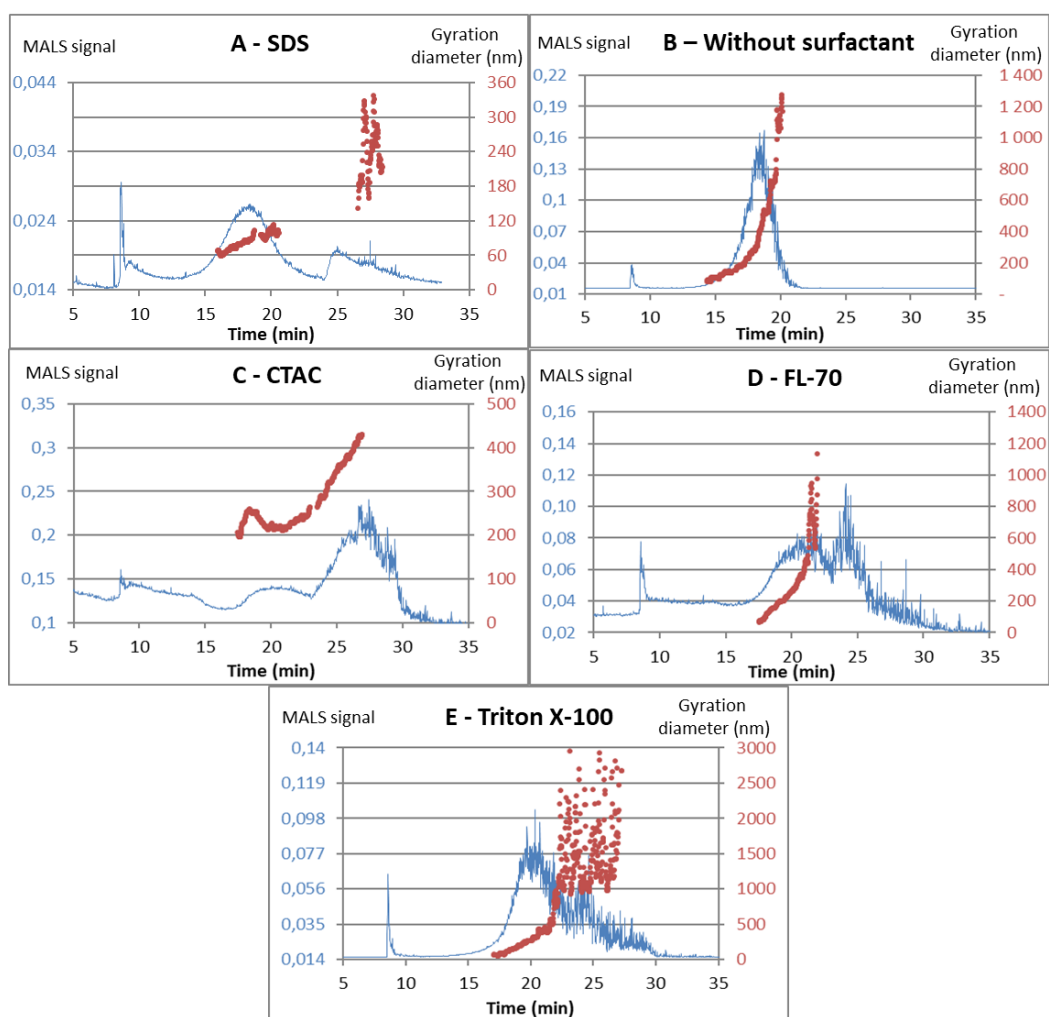


Figure 7

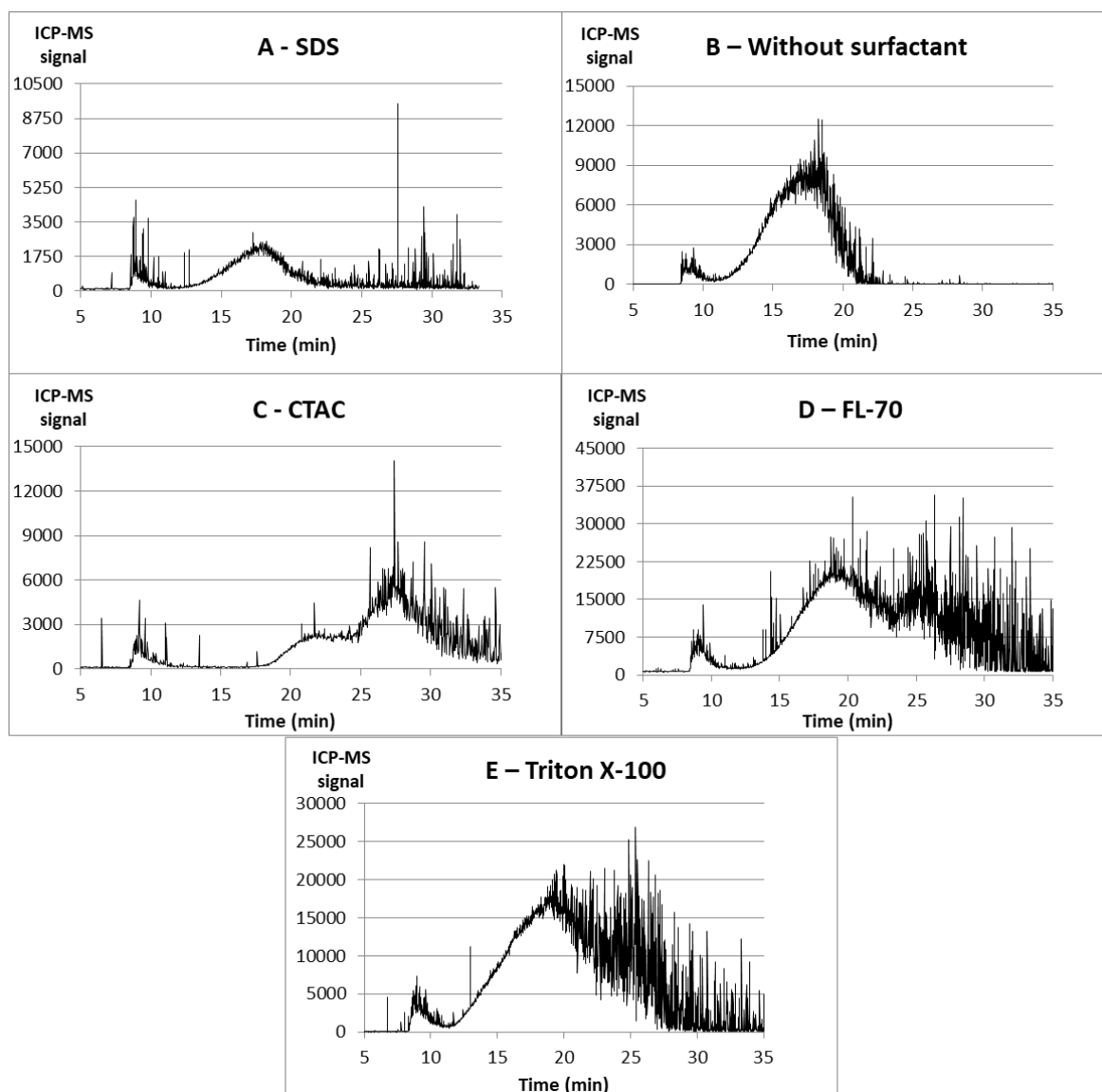
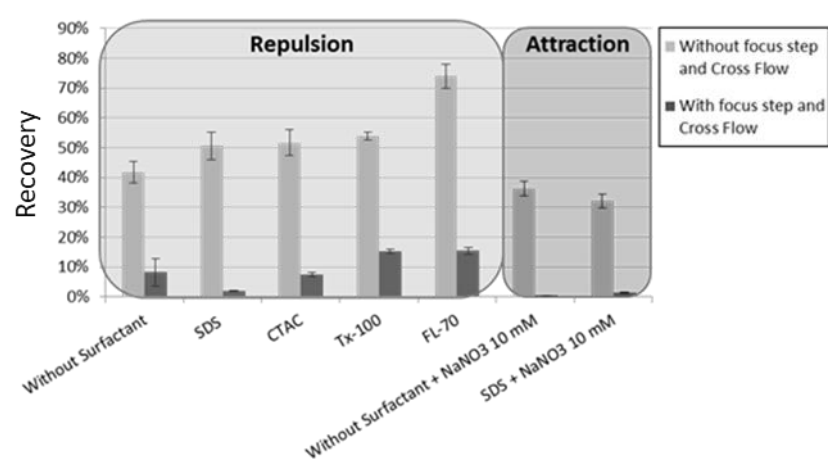


Figure 8



Appendix A: Supporting information

FL-70 composition

Table A1: List of FL-70 compounds

Fraction (%)	Compounds
88.8%	Water
3.8%	Triethanolamine oleate
2.7%	Sodium carbonate
1.8%	Alcohols, C12-14-secondary, ethoxylated
1.4%	Tetrasodium ethylenediaminetetraacetate
0.9%	Polyethylene glycol
0.5%	Sodium oleate
0.1%	Sodium bicarbonate

Surfactant critical micelle concentration (CMC)

Table A2: List of surfactants and their main parameters: CMC and equivalent mass percentage

Surfactants	CMC (mM)	% (mass/mass)
SDS	8.26 ^a	0.24
CTAC	1.52 ^a	0.05
Triton X-100	0.23 ^b	0.01
FL-70	-	0.175 ^a

^a measured by conductivity.

^b information provided by the producer

AF4 method**Table A3:** AF4 measurement program

AF4 program for control focus with blue dextran	Detector flow (mL.min ⁻¹)	1
	Injection flow (mL.min ⁻¹)	0.2
	Focus flow (L.min ⁻¹)	2
	Focus step time (min)	8
	Injection time (min)	1
	Elution	Constant cross flow 2 mL.min ⁻¹ during 2 min Then, constant cross flow 0.11 mL.min ⁻¹ during 5 min
AF4 program for NM-102 analysis without focus step and cross flow	Detector flow (mL.min ⁻¹)	1
	Injection flow (mL.min ⁻¹)	0.2
	Focus flow (L.min ⁻¹)	0
	Focus step time (min)	0
	Injection time (min)	3
	Elution	Constant cross flow 0 mL.min ⁻¹ during 30 min
AF4 program for NM-102 analysis with focus step and cross flow	Detector flow (mL.min ⁻¹)	1
	Injection flow (mL.min ⁻¹)	0.2
	Focus flow (L.min ⁻¹)	0.6
	Focus step time (min)	3
	Injection time (min)	3
	Elution	Constant cross flow 0.6 mL.min ⁻¹ during 3 min Then, linear cross flow decrease to 0.11 mL.min ⁻¹ for 5 min. Then, constant cross flow 0.11 mL.min ⁻¹ during 10 min Then constant cross flow 0 mL.min ⁻¹ during 30 min

ICP-MS parameters**Table A4:** List of ICP-MS settings

Plasma Parameters	
RF Power	1450 W
Plasma gaz flow (Ar)	15 L.min ⁻¹
Cones	Platine
Acquisition parameters	
Acquisition mode	Spectrum (For calibration) TRA (For AF4-ICP-MS analysis)
Analysed isotopes	47,
Dwell time	500 ms
Analysis time	3 min (calibration) / 10 min (without cross flow and focus step) / 45-60 min (with cross flow and focus step)
Replicates number	3

X-Ray diffractometry results

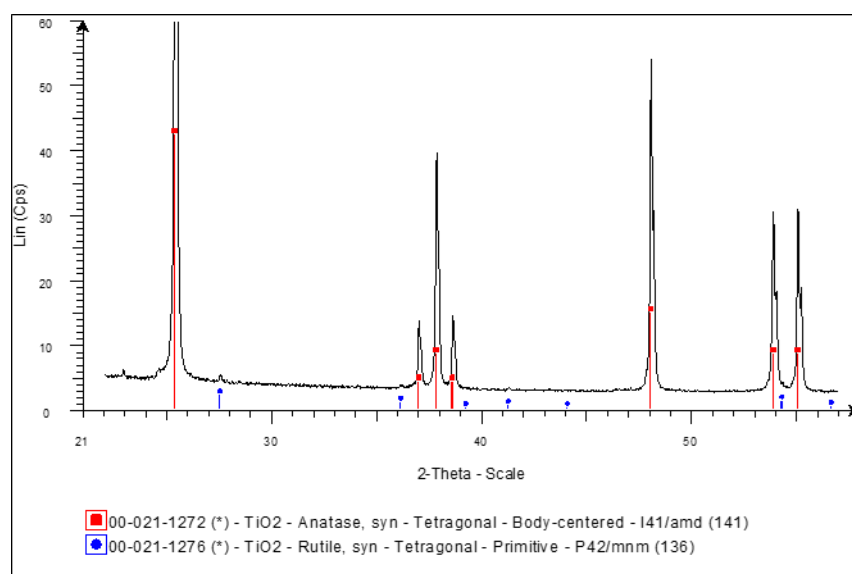


Figure A1: XRD signal of NM-102 with anatase (red) and rutile (blue) theoretical signal.

Dynamic light scattering data

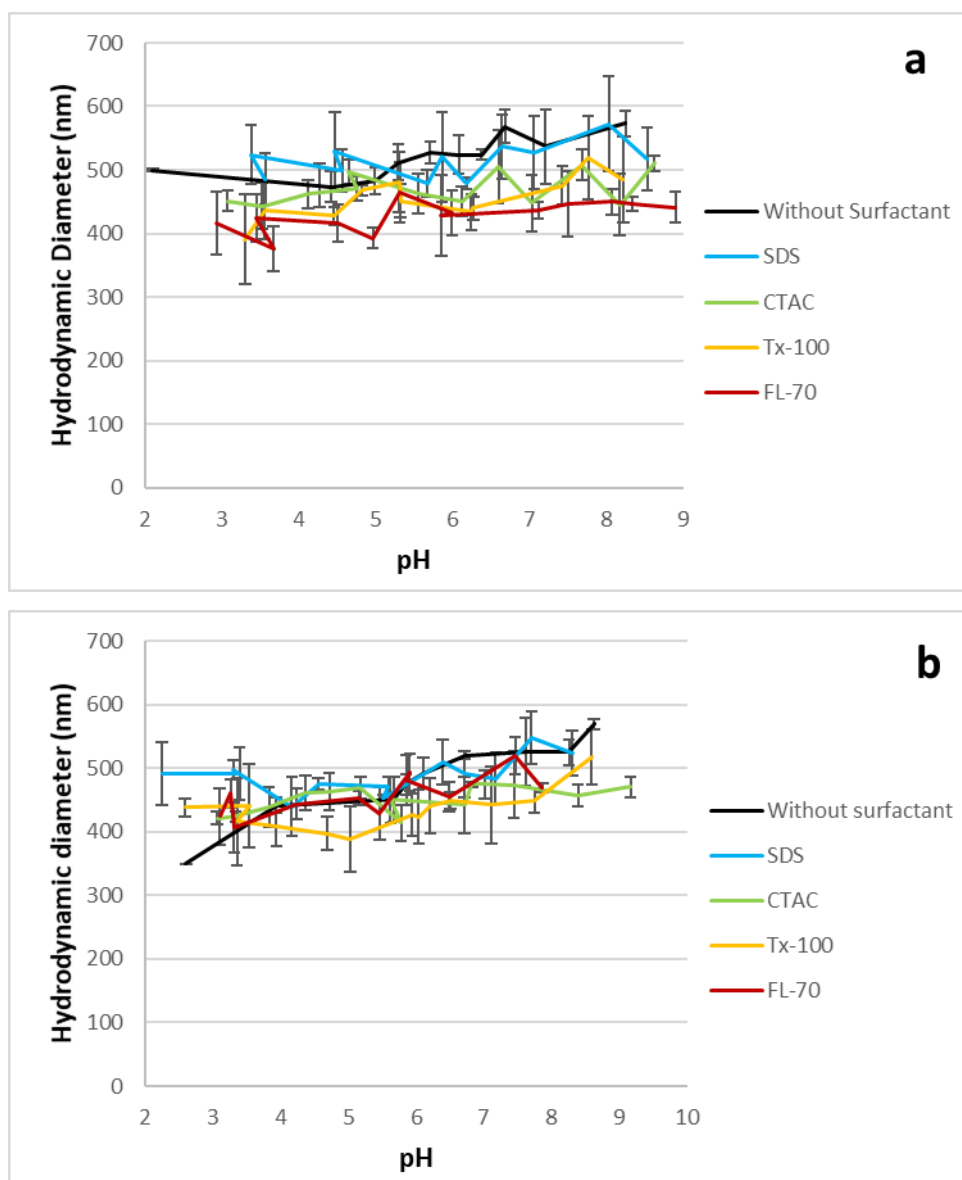


Figure A2: Hydrodynamic diameter of TiO₂ NPs in different eluent according to the pH with adding of NaNO₃ at (a) 0 mM and (b) 10 mM

Focus control

The aim of this work is to check that the injection of the analytes is uniform. To control the focus step after a membrane change, blue dextran (provided by Wyatt Technology) at 10 g.L^{-1} was injected with the AF4 program repertory in [Table A3](#). During the focus step, blue dextran formed a visible line near the injection area on membrane. To adjust the position of this line the focus percentage was modified between 15 and 30 %.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Compliance with Ethical Standards**Conflict of Interest**

Lucas Givelet declares that he has no conflict of interest. Delphine Truffier-Boutry declares that she has no conflict of interest. Sylvie Motellier declares that she has no conflict of interest. Petru Jitaru declares that he has no conflict of interest. Vincent Bartolomei declares that he has no conflict of interest. Laurent Noël declares that he has no conflict of interest. Thierry Guérin declares that he has no conflict of interest. Jean-François Damlencourt declares that he has no conflict of interest.

Ethical Approval

This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors. This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Annexe D

Tableau D1 : Table des valeurs $T_{théo}$ de student

TABLE of CRITICAL VALUES for STUDENT'S t DISTRIBUTIONS												
Column headings denote probabilities (α) above tabulated values.												
d.f.	0.40	0.25	0.10	0.05	0.04	0.025	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
1	0.325	1.000	3.078	6.314	7.916	12.706	15.894	31.821	63.656	127.321	318.289	636.578
2	0.289	0.816	1.886	2.920	3.320	4.303	4.849	6.965	9.925	14.089	22.328	31.600
3	0.277	0.765	1.638	2.353	2.605	3.182	3.482	4.541	5.841	7.453	10.214	12.924
4	0.271	0.741	1.533	2.132	2.333	2.776	2.999	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.267	0.727	1.476	2.015	2.191	2.571	2.757	3.365	4.032	4.773	5.894	6.869
6	0.265	0.718	1.440	1.943	2.104	2.447	2.612	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.263	0.711	1.415	1.895	2.046	2.365	2.517	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.262	0.706	1.397	1.860	2.004	2.306	2.449	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.261	0.703	1.383	1.833	1.973	2.262	2.398	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.260	0.700	1.372	1.812	1.948	2.228	2.359	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.260	0.697	1.363	1.796	1.928	2.201	2.328	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.259	0.695	1.356	1.782	1.912	2.179	2.303	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.259	0.694	1.350	1.771	1.899	2.160	2.282	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.258	0.692	1.345	1.761	1.887	2.145	2.264	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.258	0.691	1.341	1.753	1.878	2.131	2.249	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.258	0.690	1.337	1.746	1.869	2.120	2.235	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.257	0.689	1.333	1.740	1.862	2.110	2.224	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.257	0.688	1.330	1.734	1.855	2.101	2.214	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.257	0.688	1.328	1.729	1.850	2.093	2.205	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.257	0.687	1.325	1.725	1.844	2.086	2.197	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.257	0.686	1.323	1.721	1.840	2.080	2.189	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.256	0.686	1.321	1.717	1.835	2.074	2.183	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.256	0.685	1.319	1.714	1.832	2.069	2.177	2.500	2.807	3.104	3.485	3.768
24	0.256	0.685	1.318	1.711	1.828	2.064	2.172	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.256	0.684	1.316	1.708	1.825	2.060	2.167	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.256	0.684	1.315	1.706	1.822	2.056	2.162	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	0.256	0.684	1.314	1.703	1.819	2.052	2.158	2.473	2.771	3.057	3.421	3.689
28	0.256	0.683	1.313	1.701	1.817	2.048	2.154	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.256	0.683	1.311	1.699	1.814	2.045	2.150	2.462	2.756	3.038	3.396	3.660
30	0.256	0.683	1.310	1.697	1.812	2.042	2.147	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
31	0.256	0.682	1.309	1.696	1.810	2.040	2.144	2.453	2.744	3.022	3.375	3.633
32	0.255	0.682	1.309	1.694	1.808	2.037	2.141	2.449	2.738	3.015	3.365	3.622
33	0.255	0.682	1.308	1.692	1.806	2.035	2.138	2.445	2.733	3.008	3.356	3.611
34	0.255	0.682	1.307	1.691	1.805	2.032	2.136	2.441	2.728	3.002	3.348	3.601
35	0.255	0.682	1.306	1.690	1.803	2.030	2.133	2.438	2.724	2.996	3.340	3.591
36	0.255	0.681	1.306	1.688	1.802	2.028	2.131	2.434	2.719	2.990	3.333	3.582
37	0.255	0.681	1.305	1.687	1.800	2.026	2.129	2.431	2.715	2.985	3.326	3.574
38	0.255	0.681	1.304	1.686	1.799	2.024	2.127	2.429	2.712	2.980	3.319	3.566
39	0.255	0.681	1.304	1.685	1.798	2.023	2.125	2.426	2.708	2.976	3.313	3.558
40	0.255	0.681	1.303	1.684	1.796	2.021	2.123	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	0.254	0.679	1.296	1.671	1.781	2.000	2.099	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	0.254	0.678	1.292	1.664	1.773	1.990	2.088	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	0.254	0.677	1.290	1.660	1.769	1.984	2.081	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
120	0.254	0.677	1.289	1.658	1.766	1.980	2.076	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
140	0.254	0.676	1.288	1.656	1.763	1.977	2.073	2.353	2.611	2.852	3.149	3.361
160	0.254	0.676	1.287	1.654	1.762	1.975	2.071	2.350	2.607	2.847	3.142	3.352
180	0.254	0.676	1.286	1.653	1.761	1.973	2.069	2.347	2.603	2.842	3.136	3.345
200	0.254	0.676	1.286	1.653	1.760	1.972	2.067	2.345	2.601	2.838	3.131	3.340
250	0.254	0.675	1.285	1.651	1.758	1.969	2.065	2.341	2.596	2.832	3.123	3.330
inf	0.253	0.674	1.282	1.645	1.751	1.960	2.054	2.326	2.576	2.807	3.090	3.290

Tableau D2 : Paramètres des conditions analytiques journalières requises de l'ICP-MS iCapQ

Background	Background (masse 4,5)	< 2,0 cps
	Background (masse 220,7)	< 2,0 cps
Mode STDS	Taux double charges (%) $^{70}\text{Ba}^{++}/^{140}\text{Ba}^{+}$	< 0,03
	Taux oxydes (%) $\text{CeO}^{+}/\text{Ce}^{+}$ (156/140)	< 0,03
	$^7\text{Li}^{+}$	> 80000 cps
	Stabilité $^7\text{Li}^{+}$ (RSD %)	< 2%
	$^{59}\text{Co}^{+}$	> 200000 cps
	Stabilité $^{59}\text{Co}^{+}$ (RSD %)	< 2%
	$^{115}\text{In}^{+}$	> 400000 cps
	Stabilité $^{115}\text{In}^{+}$ (RSD %)	< 2%
	$^{238}\text{U}^{+}$	> 500000 cps
	Stabilité $^{238}\text{U}^{+}$ (RSD %)	< 2%
Mode KEDS	$^{59}\text{Co}^{+}/^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$	> 18
	$^{59}\text{Co}^{+}$	> 50 000 cps
	Stabilité $^{59}\text{Co}^{+}$ (RSD %)	< 3%
	$^{115}\text{In}^{+}$	> 50 000 cps
	Stabilité $^{115}\text{In}^{+}$ (RSD %)	< 3%
	$^{238}\text{U}^{+}$	> 160 000 cps
	Stabilité $^{238}\text{U}^{+}$ (RSD %)	< 3%
	Taux oxydes (%) $\text{CeO}^{+}/\text{Ce}^{+}$ (156/140)	< 0,02

BIBLIOGRAPHIE

- Abad-Álvaro I, Peña-Vázquez E, Bolea E, et al (2016) Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408(19) 5089–5097. doi: 10.1007/s00216-016-9515-y
- Abhinav K V, Rao R VK, Karthik PS, Singh SP (2015) Copper conductive inks: synthesis and utilization in flexible electronics. *RSC Advances* 5(79) 63985–64030. doi: 10.1039/C5RA08205F
- Addo Ntim S, Norris S, Scott K, et al (2018) Consumer use effects on nanoparticle release from commercially available ceramic cookware. *Food Control* 87 31–39. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.12.003
- afssa (2009) Nanotechnologies et nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale. <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP-Ra-NanoAlimentation.pdf>.
- Agir pour l'Environnement Mais où se cachent les nanoparticules ? <https://infonano.agirpourenvironnement.org/>. Accès : 1 Mai 2019
- Akhavan O (2009) Lasting antibacterial activities of Ag–TiO₂/Ag/a-TiO₂ nanocomposite thin film photocatalysts under solar light irradiation. *Journal of Colloid and Interface Science* 336(1) 117–124. doi: 10.1016/j.jcis.2009.03.018
- Al-Kattan A, Wichser A, Vonbank R, et al (2015) Characterization of materials released into water from paint containing nano-SiO₂. *Chemosphere* 119 1314–1321. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.005
- Aliberti P, Shrestha SK, Teuscher R, et al (2010) Study of silicon quantum dots in a SiO₂ matrix for energy selective contacts applications. *Solar Energy Materials and Solar Cells* 94(11) 1936–1941. doi: 10.1016/j.solmat.2010.06.024
- Alkilany AM, Thompson LB, Boulos SP, et al (2012) Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64(2) 190–199. doi: 10.1016/j.addr.2011.03.005
- Allen NS, Mahdjoub N, Vishnyakov V, et al (2018) The effect of crystalline phase (anatase, brookite and rutile) and size on the photocatalytic activity of calcined polymorphic titanium dioxide (TiO₂). *Polymer Degradation and Stability* 150 31–36. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.02.008
- Althues H, Henle J, Kaskel S (2007) Functional inorganic nanofillers for transparent polymers. *Chemical Society Reviews* 36(9) 1454. doi: 10.1039/b608177k

- Anses (2017) Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2017SA0020.pdf>.
- Anses (2019) Dioxyde de titane sous forme nanoparticulaire : l'Anses définit une Valeur Toxicologique de Référence (VTR) pour l'exposition chronique par inhalation. <https://www.anses.fr/fr/content/dioxyde-de-titane-sous-forme-nanoparticulaire-l-anses-definit-une-valeur-toxicologique-de>. Accès 1 Mai 2019
- Arnould A (2018) Caractérisation de nanoparticules en milieux complexes - Applications à des nanoparticules organiques et métalliques. Thèse de doctorat - Université Grenoble Alpes
- Assemblée Nationale (2018) Amendement N°2257. <http://www.assemblee-nationale.fr/dyn/15/amendements/0902/AN/2257>
- Athinarayanan J, Alshatwi AA, Periasamy VS, Al-Warthan AA (2015) Identification of Nanoscale Ingredients in Commercial Food Products and their Induction of Mitochondrially Mediated Cytotoxic Effects on Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Food Science* 80(2) N459–N464. doi: 10.1111/1750-3841.12760
- Athinarayanan J, Periasamy VS, Alsaif MA, et al (2014) Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells. *Cell Biology and Toxicology* 30(2) 89–100. doi: 10.1007/s10565-014-9271-8
- Auvinen J, Wirtanen L (2008) The influence of photocatalytic interior paints on indoor air quality. *Atmospheric Environment* 42(18) 4101–4112. doi: 10.1016/j.atmosenv.2008.01.031
- Aznar R, Barahona F, Geiss O, et al (2017) Quantification and size characterisation of silver nanoparticles in environmental aqueous samples and consumer products by single particle-ICPMS. *Talanta* 175 200–208. doi: 10.1016/j.talanta.2017.07.048
- Babaa M-R (2004) Contribution à l'étude de l'adsorption physique de gaz sur les nanotubes de carbone mono- et multiparois. Thèse de doctorat - Université Henri Poincaré
- Badalova K, Herbello-Hermelo P, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A (2019) Possibilities of single particle—ICP-MS for determining/characterizing titanium dioxide and silver nanoparticles in human urine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 54 55–61. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.04.003
- Bañobre-López M, Teijeiro A, Rivas J (2013) Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* 18(6) 397–400. doi: 10.1016/j.rpor.2013.09.011
- Baxter JB, Aydil ES (2006) Dye-sensitized solar cells based on semiconductor morphologies with ZnO nanowires. *Solar Energy Materials and Solar Cells* 90(5) 607–622. doi: 10.1016/j.solmat.2005.05.010
- Bellotti N, Romagnoli R, Quintero C, et al (2015) Nanoparticles as antifungal additives for indoor water

- borne paints. *Progress in Organic Coatings* 86 33–40. doi: 10.1016/j.porgcoat.2015.03.006
- Bendixen N, Losert S, Adlhart C, et al (2014) Membrane–particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Chromatography A* 1334 92–100. doi: 10.1016/j.chroma.2014.01.066
- Benincasa MA, Giddings JC (1992) Separation and Molecular Weight Distribution of Anionic and Cationic Water-Soluble Polymers by Flow Field-Flow Fractionation. *Analytical Chemistry* 64(7) 790–798. doi: 10.1021/ac00031a016
- Benn TM, Westerhoff P (2008) Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. *Environmental Science & Technology* 42(18) 7025–7026. doi: 10.1021/es801501j
- Bettini S, Boutet-Robinet E, Cartier C, et al (2017) Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Scientific Reports* 7(1) 40373. doi: 10.1038/srep40373
- Bhatkhande DS, Pangarkar VG, Beenackers AACM (2002) Photocatalytic degradation for environmental applications - a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 77(1) 102–116. doi: 10.1002/jctb.532
- Bhattacharjee S (2016) DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* 235 337–351. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- Bihari P, Vippola M, Schultes S, et al (2008) Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. 5(14) 1–14. doi: 10.1186/1743-8977-5-14
- Binnig G, Quate F, Gerber C (1986) Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 56(9) 930–934. doi: 10.1103/PhysRevLett.56.930
- Binnig G, Rohrer H (1983) Scanning Tunneling Microscopy. *Surface Science* 126(1) 236–244. doi: 10.1016/0039-6028(83)90716-1
- Bocca B, Caimi S, Senofonte O, et al (2018) ICP-MS based methods to characterize nanoparticles of TiO₂ and ZnO in sunscreens with focus on regulatory and safety issues. *Science of The Total Environment* 630 922–930. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.166
- Bocca B, Sabbioni E, Mičetić I, et al (2017) Size and metal composition characterization of nano- and microparticles in tattoo inks by a combination of analytical techniques. *J Anal At Spectrom* 32(3) 616–628. doi: 10.1039/C6JA00210B
- Bolea-Fernandez E, Leite D, Rua-Ibarz A, et al (2017) Characterization of SiO₂ nanoparticles by single particle-inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (SP-ICP-MS/MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 32(11) 2140–2152. doi: 10.1039/C7JA00138J
- Botta C, Labille J, Auffan M, et al (2011) TiO₂-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: Structures and quantities. *Environmental Pollution* 159(6) 1543–1550. doi: 10.1016/j.envpol.2011.03.003

- Bottero J-Y, Auffan M, Rose J, et al (2011) Manufactured metal and metal-oxide nanoparticles: Properties and perturbing mechanisms of their biological activity in ecosystems. *Comptes Rendus Geoscience* 343(2–3) 168–176. doi: 10.1016/j.crte.2011.01.001
- Brannon-Peppas L, Blanchette JO (2012) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 206–212. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.033
- Brunauer S, Emmett PH, Teller E (1938) Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society* 60(2) 309–319. doi: 10.1021/ja01269a023
- Buchalska M, Kras G, Oszejca M, et al (2010) Singlet oxygen generation in the presence of titanium dioxide materials used as sunscreens in suntan lotions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 213(2–3) 158–163. doi: 10.1016/j.jphotochem.2010.05.019
- Buzea C, Pacheco I, Robbie K (2007) Nanomaterials and nanoparticles : Sources and toxicity. *Biointerphases* 2(4) 17–71. doi: 10.1116/1.2815690
- Candás-Zapico S, Kutscher DJ, Montes-Bayón M, Bettmer J (2018) Single particle analysis of TiO₂ in candy products using triple quadrupole ICP-MS. *Talanta* 180 309–315. doi: 10.1016/j.talanta.2017.12.041
- Cervantes-Avilés P, Huang Y, Keller AA (2019) Incidence and persistence of silver nanoparticles throughout the wastewater treatment process. *Water Research* 156 188–198. doi: 10.1016/j.watres.2019.03.031
- Chan G, Zhao G, Schatz GC, Van Duyne RP (2008) Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Triangular Nanoprisms. *Nano Letters* 112(36) 13958–13963. doi: 10.1021/nl061286u
- Chauviré T (2014) Développement de systèmes photochimiques à base de Quantum Dots hydrosolubles de type cœur CdSe et cœur-coquille CdSe/ZnS. Thèse de doctorat - Université de Grenoble Alpe
- Chebbi A, Guipont V, Elleuch K, Jeandin M (2018) Effects of 316SS addition on the properties of the coatings based on Al₂O₃ applied by plasma spraying. *Journal of Composite Materials* 52(19) 2597–2608. doi: 10.1177/0021998317751282
- Chen Q, Boothroyd C, Soutar AM, Zeng XT (2010) Sol-gel nanocoating on commercial TiO₂ nanopowder using ultrasound. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 53(1) 115–120. doi: 10.1007/s10971-009-2066-3
- Chen XX, Cheng B, Yang YX, et al (2013) Characterization and preliminary toxicity assay of nano-titanium dioxide additive in sugar-coated chewing gum. *Small* 9(9–10) 1765–1774. doi: 10.1002/sml.201201506
- Choi JY, Ramachandran G, Kandlikar M (2009) The impact of toxicity testing costs on nanomaterial regulation. *Environmental Science and Technology* 43(9) 3030–3034. doi: 10.1021/es802388s

- Commission européenne (2011) Recommandation de la commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux (2011/696/UE). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32011H0696>
- Commission européenne (2010) Règlement (UE) N° 257/2010 de la Commission du 25 mars 2010. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:080:0019:0027:FR:PDF>
- Contado C, Pagnoni A (2008) TiO₂ in commercial sunscreen lotion: Flow field-flow fractionation and ICP-AES together for size analysis. *Analytical Chemistry* 80(19) 7594–7608. doi: 10.1021/ac8012626
- Corinaldesi C, Marcellini F, Nepote E, et al (2018) Impact of inorganic UV filters contained in sunscreen products on tropical stony corals (*Acropora* spp.). *Science of The Total Environment* 637–638 1279–1285. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.108
- Cornelis G, Hassellöv M (2014) A signal deconvolution method to discriminate smaller nanoparticles in single particle ICP-MS. *J Anal At Spectrom* 29(1) 134–144. doi: 10.1039/C3JA50160D
- Correia M, Uusimäki T, Philippe A, Loeschner K (2018) Challenges in Determining the Size Distribution of Nanoparticles in Consumer Products by Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Coupled to Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: The Example of Al₂O₃, TiO₂, and SiO₂ Nanoparticles in Toothpaste. *Separations* 5(56) 1–25. doi: 10.3390/separations5040056
- Cortie MB, McDonagh AM (2011) Synthesis and Optical Properties of Hybrid and Alloy Plasmonic Nanoparticles. *Chemical Reviews* 111(6) 3713–3735. doi: 10.1021/cr1002529
- Dakhlaoui A, Jendoubi M, Smiri LS, et al (2009) Synthesis, characterization and optical properties of ZnO nanoparticles with controlled size and morphology. *Journal of Crystal Growth* 311(16) 3989–3996. doi: 10.1016/j.jcrysgro.2009.06.028
- Dallas P, Sharma VK, Zboril R (2011) Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications, and perspectives. *Advances in Colloid and Interface Science* 166(1–2) 119–135. doi: 10.1016/j.cis.2011.05.008
- Dan Y, Shi H, Stephan C, Liang X (2015) Rapid analysis of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using single particle inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Microchemical Journal* 122 119–126. doi: 10.1016/j.microc.2015.04.018
- Dazon C, Witschger O, Bau S, et al (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. doi: 10.1039/C8EN00760H
- De Broglie L (1924) Recherches sur la théorie des Quanta. Thèse de doctorat - Université en cours d'affectation
- de la Calle I De, Menta M, Klein M, Séby F (2017) Screening of TiO₂ and Au nanoparticles in cosmetics and determination of elemental impurities by multiple techniques (DLS, SP-ICP-MS, ICP-MS and

- ICP-OES). *Talanta* 171 291–306. doi: 10.1016/j.talanta.2017.05.002
- de la Calle I, Menta M, Klein M, et al (**2018a**) Towards routine analysis of TiO₂ (nano-)particle size in consumer products: Evaluation of potential techniques. *Spectrochimica Acta - Part B: Atomic Spectroscopy* 147 28–42. doi: 10.1016/j.sab.2018.05.012
- de la Calle I, Menta M, Klein M, Séby F (**2018b**) Study of the presence of micro- and nanoparticles in drinks and foods by multiple analytical techniques. *Food Chemistry* 266 133–145. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.05.107
- Deguelldre C, Favarger PY (**2004**) Thorium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta* 62(5) 1051–1054. doi: 10.1016/j.talanta.2003.10.016
- Deguelldre C, Favarger PY (**2003**) Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry: A feasibility study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 217(1–3) 137–142. doi: 10.1016/S0927-7757(02)00568-X
- Deguelldre C, Favarger PY, Bitea C (**2004**) Zirconia colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 518(1–2) 137–142. doi: 10.1016/j.aca.2004.04.015
- Deguelldre C, Favarger PY, Wold S (**2006**) Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode. *Analytica Chimica Acta* 555(2) 263–268. doi: 10.1016/j.aca.2005.09.021
- Dekkers S, Krystek P, Peters RJB, et al (**2011**) Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology* 5(3) 393–405. doi: 10.3109/17435390.2010.519836
- Delay M, Dolt T, Woellhaf A, et al (**2011**) Interactions and stability of silver nanoparticles in the aqueous phase: Influence of natural organic matter (NOM) and ionic strength. *Journal of Chromatography A* 1218(27) 4206–4212. doi: 10.1016/j.chroma.2011.02.074
- Deng Y, Petersen EJ, Challis KE, et al (**2017**) Multiple Method Analysis of TiO₂ Nanoparticle Uptake in Rice (*Oryza sativa* L.) Plants. *Environmental Science & Technology* 51(18) 10615–10623. doi: 10.1021/acs.est.7b01364
- Deshmukh SP, Patil SM, Mullani SB, Delekar SD (**2019**) Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering: C* 97 954–965. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.102
- Dubascoux S, Von Der Kammer F, Le Hécho I, et al (**2008**) Optimisation of asymmetrical flow field flow fractionation for environmental nanoparticles separation. *Journal of Chromatography A* 1206(2) 160–165. doi: 10.1016/j.chroma.2008.07.032
- Dudefoi W, Terrisse H, Popa AF, et al (**2018**) Evaluation of the content of TiO₂ nanoparticles in the coatings of chewing gums. *Food Additives & Contaminants: Part A* 35(2) 211–221. doi: 10.1080/19440049.2017.1384576
- Dudefoi W, Terrisse H, Richard-Plouet M, et al (**2017**) Criteria to define a more relevant reference

- sample of titanium dioxide in the context of food: a multiscale approach. *Food Additives & Contaminants: Part A* 34(5) 1–13. doi: 10.1080/19440049.2017.1284346
- EFSA (2016) Re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive. *EFSA Journal* 14(9) e04545. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4545
- EFSA (2018) Evaluation of four new studies on the potential toxicity of titanium dioxide used as a food additive (E 171). *EFSA Journal* 16(7) 27. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5366
- Egerton RF (2011) *Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope*. Springer US, Boston, MA, <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-9583-4>
- Engelhard C (2011) Inductively coupled plasma mass spectrometry: recent trends and developments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399(1) 213–219. doi: 10.1007/s00216-010-4299-y
- Fage SW, Muris J, Jakobsen SS, Thyssen JP (2016) Titanium: a review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. *Contact Dermatitis* 74(6) 323–345. doi: 10.1111/cod.12565
- Fan X, Zheng W, Singh DJ (2014) Light scattering and surface plasmons on small spherical particles. *Light: Science & Applications* 3(6) e179–e179. doi: 10.1038/lsa.2014.60
- Faust JJ, Doudrick K, Yang Y, et al (2014) Food grade titanium dioxide disrupts intestinal brush border microvilli in vitro independent of sedimentation. *Cell Biology and Toxicology* 30(3) 169–188. doi: 10.1007/s10565-014-9278-1
- Faust JJ, Doudrick K, Yang Y, et al (2016) A facile method for separating and enriching nano and submicron particles from titanium dioxide found in food and pharmaceutical products. *PLoS ONE* 11(10) 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0164712
- Feynman RP (1959) Plenty of Room at the Bottom - Talk to the American Physical Society. 1–7
- Fievet P, Szymczyk A, Aoubiza B, Pagetti J (2000) Evaluation of three methods for the characterisation of the membrane-solution interface: Streaming potential, membrane potential and electrolyte conductivity inside pores. *Journal of Membrane Science* 168(1–2) 87–100. doi: 10.1016/S0376-7388(99)00302-6
- Freyre-Fonseca V, Téllez-Medina DI, Medina-Reyes EI, et al (2016) Morphological and Physicochemical Characterization of Agglomerates of Titanium Dioxide Nanoparticles in Cell Culture Media. *Journal of Nanomaterials* 2016 1–19. doi: 10.1155/2016/5937932
- Fuchs J, Aghaei M, Schachel TD, et al (2018) Impact of the Particle Diameter on Ion Cloud Formation from Gold Nanoparticles in ICPMS. *Analytical Chemistry* 90(17) 10271–10278. doi: 10.1021/acs.analchem.8b02007
- Galdiero S, Falanga A, Vitiello M, et al (2011) Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. *Molecules* 16(10) 8894–8918. doi: 10.3390/molecules16108894
- Gázquez MJ, Bolívar JP, García-Tenorio R, Vaca F (2014) A Review of the Production Cycle of Titanium

- Dioxide Pigment. *Materials Sciences and Applications* 05(07) 441–458. doi: 10.4236/msa.2014.57048
- Ge M, Cao C, Huang J, et al (2016) A review of one-dimensional TiO₂ nanostructured materials for environmental and energy applications. *Journal of Materials Chemistry A* 4(18) 6772–6801. doi: 10.1039/C5TA09323F
- Geertsen V, Barruet E, Gobeaux F, et al (2018) Contribution to Accurate Spherical Gold Nanoparticles Size Determination by Single Particle Inductively Coupled Mass Spectrometry : a Comparison with Small Angle X-ray Scattering. *Analytical Chemistry* 90(16) 9742–9750. doi: 10.1021/acs.analchem.8b01167
- Ghosh Chaudhuri R, Paria S (2012) Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. *Chemical Reviews* 112(4) 2373–2433. doi: 10.1021/cr100449n
- Ghosh P, Han G, De M, et al (2008) Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(11) 1307–1315. doi: 10.1016/j.addr.2008.03.016
- Giddings J (1993) Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. *Science* 260(5113) 1456–1465. doi: 10.1126/science.8502990
- Giddings JC (1966) A New Separation Concept Based on a Coupling of Concentration and Flow Nonuniformities. *Separation Science* 1(1) 123–125. doi: 10.1080/01496396608049439
- Gigault J (2011) Développement de méthodes de Fractionnement par couplage Flux-Force (FFF) – multi-détection pour la caractérisation de nanotubes de carbone dispersés en milieu aqueux. Thèse de doctorat - Université de Pau et des pays de l'Adour
- Gimbert LJ, Andrew KN, Haygarth PM, Worsfold PJ (2003) Environmental applications of flow field-flow fractionation (FIFFF). *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 22(10) 615–633. doi: 10.1016/S0165-9936(03)01103-8
- Goesmann H, Feldmann C (2010) Nanoparticulate Functional Materials. *Angewandte Chemie International Edition* 49(8) 1362–1395. doi: 10.1002/anie.200903053
- Gulzar M, Masjuki HH, Kalam MA, et al (2016) Tribological performance of nanoparticles as lubricating oil additives. *Journal of Nanoparticle Research* 18(223) 1–25. doi: 10.1007/s11051-016-3537-4
- Gundlach-Graham A, Hendriks L, Mehrabi K, Günther D (2018) Monte Carlo Simulation of Low-Count Signals in Time-of-Flight Mass Spectrometry and Its Application to Single-Particle Detection. *Analytical Chemistry* 90(20) 11847–11855. doi: 10.1021/acs.analchem.8b01551
- Guo Z, Tan L (2009) Fundamentals and Applications of Nanomaterials, Artech Hou. Boston, <https://us.artechhouse.com/Fundamentals-and-Applications-of-Nanomaterials-P1266.aspx>
- Gustavsson A (1984) The determination of some nebulizer characteristics. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 39B(5) 743–746. doi: 10.1016/0584-8547(84)80159-7

- Hagendorfer H, Kaegi R, Parlinska M, et al (2012) Characterization of silver nanoparticle products using asymmetric flow field flow fractionation with a multidetector approach - A comparison to transmission electron microscopy and batch dynamic light scattering. *Analytical Chemistry* 84(6) 2678–2685. doi: 10.1021/ac202641d
- Hagendorfer H, Kaegi R, Traber J, et al (2011) Application of an asymmetric flow field flow fractionation multi-detector approach for metallic engineered nanoparticle characterization - Prospects and limitations demonstrated on Au nanoparticles. *Analytica Chimica Acta* 706(2) 367–378. doi: 10.1016/j.aca.2011.08.014
- Hamandi M (2017) Élaboration et caractérisation d'oxydes de Titane de Morphologie Contrôlée : application à la Photodégradation de Polluants Organiques. Thèse de doctorat - Université de Claude Bernard Lyon 1
- Hamouda IM (2012) Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *Journal of Biomedical Research* 26(3) 143–151. doi: 10.7555/JBR.26.20120027
- Hasegawa S, Hirabayashi M, Kobayashi S, et al (2004) Size Distribution and Characterization of Ultrafine Particles in Roadside Atmosphere. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 39(10) 2671–2690. doi: 10.1081/ESE-200027025
- Hedrick JL, Magbitang T, Connor EF, et al (2002) Application of complex macromolecular architectures for advanced microelectronic materials. *Chemistry - A European Journal* 8(15) 3308–3319. doi: 10.1002/1521-3765(20020802)8:15<3308::AID-CHEM3308>3.0.CO;2-D
- Helsper JPF, Peters RJB, van Bommel MEM, et al (2016) Physicochemical characterization of titanium dioxide pigments using various techniques for size determination and asymmetric flow field flow fractionation hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408(24) 6679–6691. doi: 10.1007/s00216-016-9783-6
- Hendriks L, Gundlach-Graham A, Günther D (2018) Analysis of Inorganic Nanoparticles by Single-particle Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometry. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 72(4) 221–226. doi: 10.2533/chimia.2018.221
- Hergert W, Wriedt T (2012) The Mie Theory. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-28738-1>
- Heringa MB, Peters RJB, Bley RLAW, et al (2018) Detection of titanium particles in human liver and spleen and possible health implications. *Particle and Fibre Toxicology* 15(15) 1–9. doi: 10.1186/s12989-018-0251-7
- Heroult J, Nischwitz V, Bartczak D, Goenaga-Infante H (2014) The potential of asymmetric flow field-flow fractionation hyphenated to multiple detectors for the quantification and size estimation of silica nanoparticles in a food matrix. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(16) 3919–3927. doi: 10.1007/s00216-014-7831-7

- Hineman A, Stephan C (2014) Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality. *J Anal At Spectrom* 29(7) 1252–1257. doi: 10.1039/C4JA00097H
- Houdeau E, Lamas B, Lison D, Pierre F (2018) Nanoparticles and food: An emerging risk for human health? *Cahiers de Nutrition et de Dietetique* 53(6) 312–321. doi: 10.1016/j.cnd.2018.09.001
- Huber D (2005) Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles. *Small* 1(5) 482–501. doi: 10.1002/smll.200500006
- Huynh KA, Siska E, Heithmar E, et al (2016) Detection and Quantification of Silver Nanoparticles at Environmentally Relevant Concentrations Using Asymmetric Flow Field–Flow Fractionation Online with Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 88(9) 4909–4916. doi: 10.1021/acs.analchem.6b00764
- IARC (2006) Titanium Dioxide. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono93-7.pdf>
- Ingle AP, Duran N, Rai M (2014) Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(3) 1001–1009. doi: 10.1007/s00253-013-5422-8
- ISO (2015) Nanotechnologies - Vocabulary - Part 1: Core terms. <https://www.iso.org/standard/68058.html>
- Jain P, Pradeep T (2005) Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnology and Bioengineering* 90(1) 59–63. doi: 10.1002/bit.20368
- Jallouli Y, Paillard A, Chang J, et al (2007) Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood–brain barrier in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* 344(1–2) 103–109. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.06.023
- Jensen KA, Kembouche Y, Christiansen E, et al (2013) Final protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media. https://www.anses.fr/fr/system/files/nanogenotox_deliverable.1.pdf
- Jiménez-Lamana J, Abad-Álvaro I, Bierla K, et al (2018) Detection and characterization of biogenic selenium nanoparticles in selenium-rich yeast by single particle ICPMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 33(3) 452–460. doi: 10.1039/c7ja00378a
- Jose J, Netto G (2019) Role of solid lipid nanoparticles as photoprotective agents in cosmetics. *Journal of Cosmetic Dermatology* 18(1) 315–321. doi: 10.1111/jocd.12504
- Jovanović B, Bezirci G, Çağan AS, et al (2016) Food web effects of titanium dioxide nanoparticles in an outdoor freshwater mesocosm experiment. *Nanotoxicology* 10(7) 902–912. doi: 10.3109/17435390.2016.1140242
- Kaasalainen M, Aseyev V, von Haartman E, et al (2017) Size, Stability, and Porosity of Mesoporous

- Nanoparticles Characterized with Light Scattering. *Nanoscale Research Letters* 12(74) 1–10. doi: 10.1186/s11671-017-1853-y
- Kaszuba M, Corbett J, Watson FM, Jones A (2010) High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 368(1927) 4439–4451. doi: 10.1098/rsta.2010.0175
- Keller AA, Huang Y, Nelson J (2018) Detection of nanoparticles in edible plant tissues exposed to nano-copper using single-particle ICP-MS. *Journal of Nanoparticle Research* 20(101) 1–13
- Keller AA, Lazareva A (2014) Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local. *Environmental Science and Technology Letters* 1(1) 65–70. doi: 10.1021/ez400106t
- Keller AA, McFerran S, Lazareva A, Suh S (2013) Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research* 15(1692) 1–17. doi: 10.1007/s11051-013-1692-4
- Keller AA, Vosti W, Wang H, Lazareva A (2014) Release of engineered nanomaterials from personal care products throughout their life cycle. *Journal of Nanoparticle Research* 16(2489) 1–10. doi: 10.1007/s11051-014-2489-9
- Khan I, Saeed K, Khan I (2017) Nanoparticles : Properties , applications and toxicities. *Arab J Chem.* doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- Khodashenas B, Ghorbani HR (2015) Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arab J Chem.* doi: 10.1016/j.arabjc.2014.12.014
- Kim G, Choi W (2010) Charge-transfer surface complex of EDTA-TiO₂ and its effect on photocatalysis under visible light. *Applied Catalysis B: Environmental* 100(1–2) 77–83. doi: 10.1016/j.apcatb.2010.07.014
- Kim N, Kim C, Jung S, et al (2018) Determination and identification of titanium dioxide nanoparticles in confectionery foods, marketed in South Korea, using inductively coupled plasma optical emission spectrometry and transmission electron microscopy. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 35(7) 1238–1246. doi: 10.1080/19440049.2018.1482011
- Knight MW, Liu L, Wang Y, et al (2012) Aluminum Plasmonic Nanoantennas. *Nano Letters* 12(11) 6000–6004. doi: 10.1021/nl303517v
- Kollander B, Widemo F, Ågren E, et al (2017) Detection of lead nanoparticles in game meat by single particle ICP-MS following use of lead-containing bullets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409(7) 1877–1885. doi: 10.1007/s00216-016-0132-6
- Korposh S, James SW, Lee S, et al (2010) Fiber optic long period grating sensors with a nanoassembled mesoporous film of SiO₂ nanoparticles. *Optics Express* 18(12) 13227–13238. doi: 10.1109/ICSENST.2008.4757189.14.

- Kowal K, Cronin P, Dworniczek E, et al (2014) Biocidal effect and durability of nano-TiO₂ coated textiles to combat hospital acquired infections. *RSC Advances* 4(38) 19945. doi: 10.1039/c4ra02759k
- Kreyling WG, Holzwarth U, Schleh C, et al (2017) Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2. *Nanotoxicology* 11(4) 443–453. doi: 10.1080/17435390.2017.1306893
- Krug HF, Wick P (2011) Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge. *Angewandte Chemie International Edition* 50(6) 1260–1278. doi: 10.1002/anie.201001037
- Krystek P, Bäuerlein PS, Kooij PJF (2015) Analytical assessment about the simultaneous quantification of releasable pharmaceutical relevant inorganic nanoparticles in tap water and domestic waste water. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 106 116–123. doi: 10.1016/j.jpba.2014.04.008
- Krystek P, Tentschert J, Nia Y, et al (2014) Method development and inter-laboratory comparison about the determination of titanium from titanium dioxide nanoparticles in tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(16) 3853–3861. doi: 10.1007/s00216-013-7580-z
- Kundu TK, Karak N, Barik P, Saha S (2011) Optical Properties of ZnO Nanoparticles Prepared by Chemical Method Using Poly (VinylAlcohol) (PVA) as Capping Agent. *International Journal of Soft Computing and Engineering* 1(NCRAMT2011) 19–24
- Kutscher D, Wils J, McSheehy Ducos S (2016) Nanoparticle Characterization Via Single Particle Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (spICP-MS) Using a Dedicated Plug-in for Qtegra ISDS Software. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/TN-43279-LC-MS-nanoparticles-splCP-MS-npQuant-Qtegra-TN43279-EN.pdf>
- Kuznetsova Y V, Rempel AA (2015) Size and Zeta Potential of CdS Nanoparticles in Stable Aqueous Solution of EDTA and NaCl. *Inorganic Materials* 51(3) 215–219. doi: 10.1134/S0020168515020119
- Laborda F, Jiménez-Lamana J, Bolea E, Castillo JR (2011) Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(i) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26(7) 1362. doi: 10.1039/c0ja00098a
- Landmann M, Rauls E, Schmidt WG (2012) The electronic structure and optical response of rutile, anatase and brookite TiO₂. *Journal of Physics: Condensed Matter* 24(19) 1–7. doi: 10.1088/0953-8984/24/19/195503
- Langmuir I (1918) THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM. *Journal of the American Chemical Society* 40(9) 1361–1403. doi: 10.1021/ja02242a004
- Larue C, Baratange C, Vantelon D, et al (2018) Influence of soil type on TiO₂ nanoparticle fate in an

- agro-ecosystem. *Science of The Total Environment* 630 609–617. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.264
- Latthe SS, Sutar RS, Kodag VS, et al (2019) Self – cleaning superhydrophobic coatings: Potential industrial applications. *Progress in Organic Coatings* 128 52–58. doi: 10.1016/j.porgcoat.2018.12.008
- Le Ouay B, Stellacci F (2015) Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today* 10(3) 339–354. doi: 10.1016/j.nantod.2015.04.002
- Le Trequesser Q (2014) Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane de morphologies contrôlées : localisation, quantification et aspects toxicologiques de la cellule à l'organisme pluricellulaire. Thèse de doctorat - Université de Bordeaux
- Le Trequesser Q, Seznec H, Delville M-H (2013) Functionalized nanomaterials : their use as contrast agents in bioimaging : mono- and multimodal approaches. *Nanotechnology Reviews* 2(2) 125–169. doi: 10.1515/ntrev-2012-0080
- Lecloux AJ, Atluri R, Kolen'ko Y V, Deepak FL (2017) Discussion about the use of the volume specific surface area (VSSA) as a criterion to identify nanomaterials according to the EU definition. Part two: experimental approach. *Nanoscale* 9(39) 14952–14966. doi: 10.1039/C7NR02585H
- Lee J, Mahendra S, Alvarez PJJ (2010) Nanomaterials in the Construction Industry : A Review of Their Applications and Environmental Health and Safety Considerations. *American Chemical Society* 4(7) 3580–3590. doi: 10.1021/nn100866w
- Lee S, Bi X, Reed RB, et al (2014) Nanoparticle size detection limits by single particle ICP-MS for 40 elements. *Environmental Science & Technology* 48 10291–10300. doi: 10.1021/es502422v
- Lee W, Chan W (2015) Calibration of single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry (SP-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 1245–1254. doi: 10.1039/C4JA00408F
- Li J, Yang S, Lei R, et al (2018) Oral administration of rutile and anatase TiO₂ nanoparticles shifts mouse gut microbiota structure. *Nanoscale* 10(16) 7736–7745. doi: 10.1039/c8nr00386f
- Li L, Gu Z, Gu W, et al (2016) Efficient drug delivery using SiO₂ -layered double hydroxide nanocomposites. *Journal of Colloid and Interface Science* 470 47–55. doi: 10.1016/j.jcis.2016.02.042
- Lim J-H, Bae D, Fong A (2018) Titanium Dioxide in Food Products: Quantitative Analysis Using ICP-MS and Raman Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(51) 13533–13540. doi: 10.1021/acs.jafc.8b06571
- Lin YL, Wang TJ, Jin Y (2002) Surface characteristics of hydrous silica-coated TiO₂ particles. *Powder Technology* 123(2–3) 194–198. doi: 10.1016/S0032-5910(01)00470-3
- LNE (2016) Rapport d'essai - Dossier P156452 - Document DMSI/1 - Page 1/26. https://www.agirpourenvironnement.org/sites/default/files/communiqués_presses/Rapport

LNE_P156452.DMSI_.001-VC.pdf

- Loeschner K, Correia M, Chaves CL, et al (2018) Detection and characterisation of aluminium-containing nanoparticles in Chinese noodles by single particle ICP-MS. *Food Additives & Contaminants: Part A* 35(1) 86–93. doi: 10.1080/19440049.2017.1382728
- López-Heras I, Madrid Y, Cámara C (2014) Prospects and difficulties in TiO₂ nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field-flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 124 71–78. doi: 10.1016/j.talanta.2014.02.029
- Lorenz C, Windler L, von Goetz N, et al (2012) Characterization of silver release from commercially available functional (nano)textiles. *Chemosphere* 89(7) 817–824. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.04.063
- Lorenzetti M, Drame A, Šturm S, Novak S (2017) TiO₂ (Nano)Particles Extracted from Sugar-Coated Confectionery. *Journal of Nanomaterials* 2017 1–14. doi: 10.1155/2017/6298307
- Lu C, Willner B, Willner I, Al LUET (2013) DNA Nanotechnology : From Sensing and DNA Machines to Drug-Delivery Systems. *ACS Nano* 7(10) 8320–8332
- Lu P, Huang S, Chen Y, et al (2015) Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. *Journal of Food and Drug Analysis* 23(3) 587–594. doi: 10.1016/j.jfda.2015.02.009
- Luxbacher T (2014) The ZETA Guide - Principle of the streaming potential technique, 1st editio. Anton Paar GmbH, Graz, <https://www.worldcat.org/title/proceedings-symposium-on-plant-herbivore-interactions-snowbird-utah-august-7-9-1985/oclc/680905241>
- Mackevica A, Emil Olsson M, Foss Hansen S (2018) Quantitative characterization of TiO₂ Nanoparticle Release from textiles by conventional and Single Particle ICP-MS. *Journal of Nanoparticle Research* 20(6) 1–11
- Magdalena AG, Silva IMB, Marques RFC, et al (2018) EDTA-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 113 5–10. doi: 10.1016/j.jpcs.2017.10.002
- Mahmoudi M, Sant S, Wang B, et al (2011) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63(1–2) 24–46. doi: 10.1016/j.addr.2010.05.006
- Malvern Instrument (2017) Technical note: Intensity - Volume - Number. <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/TN101104IntensityVolumeNumber>
- Malvern Instrument (2012) Dynamic Light Scattering: An introduction in 30 minutes. https://warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/intro_to_dls.pdf
- Manh Thang N, Geckeis H, Kim J., Beck H. (2001) Application of the flow field flow fractionation (FFFF)

- to the characterization of aquatic humic colloids: evaluation and optimization of the method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 181(1–3) 289–301. doi: 10.1016/S0927-7757(00)00803-7
- Marques L, Hernandez FU, James SW, et al (2016) Highly sensitive optical fibre long period grating biosensor anchored with silica core gold shell nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 75 222–231. doi: 10.1016/j.bios.2015.08.046
- Martin M, Feuillebois F (2003) Onset of sample concentration effects on retention in field-flow fractionation. *Journal of Separation Science* 26(6–7) 471–479. doi: 10.1002/jssc.200390063
- Martinez-andrade JM, Avalos-borja M, Vilchis-nestor AR, et al (2018) Dual function of EDTA with silver nanoparticles for root canal treatment – A novel modification. *PLoS ONE* 13(1) 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0190866
- Mast J, Verleysen E, Temmerman P De (2015) *Advanced Transmission Electron Microscopy*. Springer International Publishing, Cham, <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-15177-9>
- Maximous N, Nakhla G, Wan W, Wong K (2009) Preparation, characterization and performance of Al₂O₃/PES membrane for wastewater filtration. *Journal of Membrane Science* 341(1–2) 67–75. doi: 10.1016/j.memsci.2009.05.040
- Maynard A, Michelson E (2014) The Nanotechnology Consumer Products Inventory. http://www.nanotechproject.org/process/files/2753/consumer_product_inventory_analysis_handout.pdf
- McAleer JF, Peter LM (1982) Instability of Anodic Oxide Films on Titanium. *Journal of The Electrochemical Society* 129(6) 1252–1260. doi: 10.1149/1.2124097
- Meermann B, Nischwitz V (2018) ICP-MS for the analysis at the nanoscale – a tutorial review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 33(9) 1432–1468. doi: 10.1039/C8JA00037A
- Meisterjahn B, Wagner S, von der Kammer F, et al (2016) Silver and gold nanoparticle separation using asymmetrical flow-field flow fractionation: Influence of run conditions and of particle and membrane charges. *Journal of Chromatography A* 1440 150–159. doi: 10.1016/j.chroma.2016.02.059
- Minetto D, Libralato G, Marcomini A, Volpi Ghirardini A (2017) Potential effects of TiO₂ nanoparticles and TiCl₄ in saltwater to *Phaeodactylum tricornutum* and *Artemia franciscana*. *Science of The Total Environment* 579 1379–1386. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.135
- Ministère de l'Economie et des Finances (2018) Communiqué de presse N°298. https://www.economie.gouv.fr/files/files/directions_services/dgccrf/presse/communiqu/2018/cp-298-Bruno-Le-Maire-reuni-cnc.pdf
- Ministère de l'Economie et des Finances (2019) Communiqué De Presse N°956. https://www.economie.gouv.fr/files/files/directions_services/dgccrf/presse/communiqu/2019

/cp-956.pdf

- Mitrano DM, Barber A, Bednar A, et al (2012) Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27(7) 1131. doi: 10.1039/c2ja30021d
- Mitrano DM, Motellier S, Clavaguera S, Nowack B (2015) Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products. *Environment International* 77 132–147. doi: 10.1016/j.envint.2015.01.013
- Montaño MD, Badiei HR, Bazargan S, Ranville JF (2014) Improvements in the detection and characterization of engineered nanoparticles using spICP-MS with microsecond dwell times. *Environmental Science Nano* 1(4) 338–346. doi: 10.1039/c4en00058g
- Mukerjee P, Mysels KJ (1972) Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61(2) 1–319. doi: 10.1002/jps.2600610254
- Naderi Peikam E, Jalali M (2018) Application of three nanoparticles (Al_2O_3 , SiO_2 and TiO_2) for metal-contaminated soil remediation (measuring and modeling). *Int J Environ Sci Technol*. doi: 10.1007/s13762-018-2134-8
- Nel A (2006) Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* 311(5761) 622–627. doi: 10.1126/science.1114397
- Nicolas J, Couvreur P (2017) Les nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs anticancéreux. *médecine/sciences* 33(1) 11–17. doi: 10.1051/medsci/20173301003
- Nischwitz V, Goenaga-Infante H (2012) Improved sample preparation and quality control for the characterisation of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using flow field flow fractionation on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27(7) 1084–1092. doi: 10.1039/c2ja10387g
- Nowack B, Bucheli TD (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150(1) 5–22. doi: 10.1016/j.envpol.2007.06.006
- Nunez S, Goenaga H, Yamanaka M, et al (2016) Application note - Analysis of 10 nm gold nanoparticles using the high sensitivity of the Agilent 8900 ICP-QQQ. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-6944EN.pdf>
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005) Review Nanotoxicology : An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives* 113(7) 823–839. doi: 10.1289/ehp.7339
- Ohtani B, Prieto-Mahaney OO, Li D, Abe R (2010) What is Degussa (Evonik) P25? Crystalline composition analysis, reconstruction from isolated pure particles and photocatalytic activity test. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 216(2–3) 179–182. doi: 10.1016/j.jphotochem.2010.07.024

- Olesik JW, Gray PJ (2012) Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: determination of the number of particles and the analyte mass in each particle. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27(7) 1143. doi: 10.1039/c2ja30073g
- Omar J, Boix A, Kerckhove G, von Holst C (2016) Optimisation of asymmetric flow field-flow fractionation for the characterisation of nanoparticles in coated polydisperse TiO₂ with applications in food and feed. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 33(12) 1775–1784. doi: 10.1080/19440049.2016.1239031
- Open Food Facts Open Food Facts - France. <https://fr.openfoodfacts.org/>. Accès : 1 Mai 2019
- Pace HE, Rogers NJ, Jarolimek C, et al (2011) Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 83(24) 9361–9369. doi: 10.1021/ac201952t
- Pace HE, Rogers NJ, Jarolimek C, et al (2012) Single Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: A Performance Evaluation and Method Comparison in the Determination of Nanoparticle Size. *Environmental Science & Technology* 46(22) 12272–12280. doi: 10.1021/es301787d
- Pardis S (2012) Synthèse de nanoparticules d'oxydes de titane par pyrolyse laser - Etude des propriétés optiques et de la structure électronique. Thèse de doctorat - Université Paris Sud
- Park N (2015) Perovskite solar cells : an emerging photovoltaic technology. *Biochemical Pharmacology* 18(2) 65–72. doi: 10.1016/j.mattod.2014.07.007
- Parlement européen (2012) Règlement (CE) 528/2012, relatif à la mise sur le marché des substances et produits biocides.
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/fr/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0528>
- Parlement européen (2009) Règlement (CE) N° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques.
<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:FR:PDF>
- Parlement européen (2011) Règlement (UE) N°1169/2011 du Parlement européen et du conseil du 25 octobre 2011. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32011R1169>
- Parlement européen (1994) Directive 94/36/CE du Parlement européen et du Conseil du 30 juin 1994 concernant les colorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32011H0696>
- Pecora R (2000) Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research* 2(2) 123–131. doi: 10.1023/A:1010067107182
- Pedata P, Malorni L, Sannolo N, et al (2016) Characterization and Inflammatory Potential of sub-10nm Particles from Gas Cooking Appliances. *Chemical Engineering Transactions* 47 433–438. doi: 10.3303/CET1647073

- Pele LC, Thoree V, Bruggaber SFA, et al (2015) Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers. *Particle and Fibre Toxicology* 12(26) 1–6. doi: 10.1186/s12989-015-0101-9
- Peng F, Setyawati MI, Tee JK, et al (2019) Nanoparticles promote in vivo breast cancer cell intravasation and extravasation by inducing endothelial leakiness. *Nature Nanotechnology* 14(3) 279–286. doi: 10.1038/s41565-018-0356-z
- Periasamy VS, Athinarayanan J, Al-Hadi AM, et al (2015) Identification of titanium dioxide nanoparticles in food products: Induce intracellular oxidative stress mediated by TNF and CYP1A genes in human lung fibroblast cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 39(1) 176–186. doi: 10.1016/j.etap.2014.11.021
- Peters RJB, Herrera-Rivera Z, Undas A, et al (2015) Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30(6) 1274–1285. doi: 10.1039/C4JA00357H
- Peters RJB, Rivera ZH, van Bommel G, et al (2014a) Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 3875–3885. doi: 10.1007/s00216-013-7571-0
- Peters RJB, van Bommel G, Herrera-Rivera Z, et al (2014b) Characterization of Titanium Dioxide Nanoparticles in Food Products: Analytical Methods To Define Nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(27) 6285–6293. doi: 10.1021/jf5011885
- Peters RJB, van Bommel G, Milani NBL, et al (2018a) Detection of nanoparticles in Dutch surface waters. *Science of the Total Environment* 621 210–218. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.238
- Podzimek S (2011) Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470877975>
- Praetorius A, Gundlach-Graham A, Goldberg E, et al (2017) Single-particle multi-element fingerprinting (spMEF) using inductively-coupled plasma time-of-flight mass spectrometry (ICP-TOFMS) to identify engineered nanoparticles against the elevated natural background in soils. *Environmental Science Nano* 4(2) 307–314. doi: 10.1039/c6en00455e
- Proquin H, Rodríguez-Ibarra C, Moonen CGJ, et al (2017) Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis* 32(1) 139–149. doi: 10.1093/mutage/gew051
- R-Nano (2013) Déclaration de substances à l'état nanoparticulaire. <https://www.r-nano.fr/>
- R-Nano (2017) Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire Rapport d'étude 2017. https://www.ecologique-solidaire.gouv.fr/sites/default/files/Rapport_R-nano_2017.pdf

- Rasmussen K, Mast J, Temmerman P-J De, et al **(2014)** Titanium Dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: Characterisation and Physico- Chemical Properties. <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC86291/lbna26637enn.pdf>
- Rawlings JO, Pantula SG, Dickey DA **(1998)** Applied Regression Analysis: A Research Tool, Second Edition. Springer-Verlag, New York, <http://link.springer.com/10.1007/b98890>
- Reddy KR, Hassan M, Gomes VG **(2015)** Hybrid nanostructures based on titanium dioxide for enhanced photocatalysis. *Applied Catalysis A: General* 489 1–16. doi: 10.1016/j.apcata.2014.10.001
- Regulations.gov **(2017)** Proposed TSCA Reporting and Recordkeeping Requirements for Chemical Substances When Manufactured or Processed as Nanoscale Materials. <https://www.regulations.gov/docket?D=EPA-HQ-OPPT-2010-0572>
- Ren G, Hu D, Cheng EWC, et al **(2009)** International Journal of Antimicrobial Agents Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33 587–590. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.12.004
- RIKILT Wageningen **(2015)** Single Particle Calculation tool. <https://www.wur.nl/en/show/Single-Particle-Calculation-tool.htm>. Accès : 30 Avril 2019
- Roduner E **(2006)** Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews* 35(7) 583. doi: 10.1039/b502142c
- Rossano M **(2014)** Utilisation des nanoparticules de dioxyde de titane dans les émulsions cosmétiques : impact sur la santé humaine et l'environnement. Thèse de doctorat - Université du Havre
- Rowe R, Sheskey P, Quinn M **(2009)** Summary for Policymakers. In: Intergovernmental Panel on Climate Change (ed) Climate Change 2013 - The Physical Science Basis. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1–30
- Rubilar O, Rai M, Tortella G, et al **(2013)** Biogenic nanoparticles: copper, copper oxides, copper sulphides, complex copper nanostructures and their applications. *Biotechnology Letters* 35(9) 1365–1375. doi: 10.1007/s10529-013-1239-x
- Rubio LA, Rovira MJF, Sanz MM, Gómez-Mascaraque LG **(2019)** Nanomaterials for Food Applications. Elsevier, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C2017001042X>
- Saleh R, Taufik A, Prakoso SP **(2019)** Fabrication of Ag₂O/TiO₂ composites on nanographene platelets for the removal of organic pollutants: Influence of oxidants and inorganic anions. *Applied Surface Science* 480 697–708. doi: 10.1016/j.apsusc.2019.03.027
- Saravanan R, Mansoob Khan M, Gupta VK, et al **(2015)** ZnO/Ag/CdO nanocomposite for visible light-induced photocatalytic degradation of industrial textile effluents. *Journal of Colloid and Interface Science* 452 126–133. doi: 10.1016/j.jcis.2015.04.035
- Schaming D, Colbeau-justin C, Remita H **(2017)** Photocatalyse : des matériaux nanostructurés aux réacteurs photocatalytiques Photocatalyse : des matériaux aux réacteurs nanostructure

- photocatalytiques par. *Techniques de l'Ingénieur* NM 3 600 1–23
- Schimpf ME, Caldwell K, Giddings JC (2000) Field-Flow Fractionation Handbook. http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=zJzJvs4LQAwC&oi=fnd&pg=PR9&dq=asymmetric+flow+field+flow+fractionation&ots=NdxD_k_9Re&sig=lpZLEgxp2KI53pJm9zjxQXOo4R4#PPA5,M1
- Schmidt B, Loeschner K, Hadrup N, et al (2011) Quantitative Characterization of Gold Nanoparticles by Field-Flow Fractionation Coupled Online with Light Scattering Detection and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 83(7) 2461–2468. doi: 10.1021/ac102545e
- Sénat (2018) Amendement N°734. https://www.senat.fr/enseance/2017-2018/571/Amdt_734.html
- Service Public Fédéral Santé Publique Sécurité de la chaîne alimentaire et Environnement (2014) Le Registre. <https://www.health.belgium.be/fr/environnement/substances-chimiques/nanomateriaux/le-registre>
- Shakeel M, Jabeen F, Shabbir S, et al (2016) Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO₂-NP) Through Various Routes of Exposure: a Review. *Biological Trace Element Research* 172(1) 1–36. doi: 10.1007/s12011-015-0550-x
- Sharma V, Tarachand, Chotia C, Okram GS (2017) Effect of additive on Zeta potential and particle size of nickel nanoparticles. p 050085
- Sheng Z, Liu Y (2011) Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water Research* 45(18) 6039–6050. doi: 10.1016/j.watres.2011.08.065
- Sikora P, Augustyniak A, Cendrowski K, et al (2018) Antimicrobial Activity of Al₂O₃, CuO, Fe₃O₄, and ZnO Nanoparticles in Scope of Their Further Application in Cement-Based Building Materials. *Nanomaterials* 8(212) 1–15. doi: 10.3390/nano8040212
- Singh R, Lillard JW (2009) Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology* 86(3) 215–223. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.12.004
- Smijs T, Pavel (2011) Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, Science and Applications* 4 95. doi: 10.2147/NSA.S19419
- Smith DD, Browner RF (1982) Measurement of Aerosol Transport Efficiency in Atomic Spectrometry. *Analytical Chemistry* 54(3) 533–537. doi: 10.1021/ac00240a041
- Sogne V, Meier F, Klein T, Contado C (2017) Investigation of zinc oxide particles in cosmetic products by means of centrifugal and asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of Chromatography A* 1515 196–208. doi: 10.1016/j.chroma.2017.07.098
- Song ZM, Chen N, Liu JH, et al (2015) Biological effect of food additive titanium dioxide nanoparticles on intestine: An in vitro study. *Journal of Applied Toxicology* 35(10) 1169–1178. doi: 10.1002/jat.3171
- Stephen ZR, Kievit FM, Zhang M (2011) Magnetite nanoparticles for medical MR imaging. *Materials*

- Today* 14(7–8) 330–338. doi: 10.1016/S1369-7021(11)70163-8
- Sun C, Tian P, Tian J, et al (2018) Magnetic mesoporous γ -Al₂O₃/ZnFe₂O₄ micro-bowls realizing enhanced adsorption, separation and recycle performance towards waste water. *Microporous and Mesoporous Materials* 270 120–126. doi: 10.1016/j.micromeso.2018.05.013
- Suwanboon S, Amornpitoksuk P, Haidoux A, Tedenac JC (2008) Structural and optical properties of undoped and aluminium doped zinc oxide nanoparticles via precipitation method at low temperature. *Journal of Alloys and Compounds* 462(1–2) 335–339. doi: 10.1016/j.jallcom.2007.08.048
- Tame MS, McEnery KR, Özdemir ŞK, et al (2013) Quantum plasmonics. *Nature Physics* 9(6) 329–340. doi: 10.1038/nphys2615
- Taylor DA (2002) Dust in the wind. *Environmental Health Perspectives* 110(2) 80–87. doi: 10.1289/ehp.110-a80
- Teleki A, Akhtar MK, Pratsinis SE (2008) The quality of SiO₂-coatings on flame-made TiO₂-based nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 18(30) 3547–3555. doi: 10.1039/b803039a
- Teulon J-M, Godon C, Chantalat L, et al (2019) On the Operational Aspects of Measuring Nanoparticle Sizes. *Nanomaterials* 9(18) 1–29. doi: 10.3390/nano9010018
- Tharaud M, Gondikas AP, Benedetti MF, et al (2017) TiO₂ nanomaterial detection in calcium rich matrices by spICPMS. A matter of resolution and treatment. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 32(7) 1400–1411. doi: 10.1039/c7ja00060j
- Thermo Scientific (2016) npQuant Software Manual
- Truffier-Boutry D, Fiorentino B, Bartolomei V, et al (2017) Characterization of photocatalytic paints: A relationship between the photocatalytic properties-release of nanoparticles and volatile organic compounds. *Environmental Science: Nano* 4(10) 1998–2009. doi: 10.1039/c7en00467b
- Tuoriniemi J, Cornelis G, Hassellöv M (2012) Size Discrimination and Detection Capabilities of Single-Particle ICPMS for Environmental Analysis of Silver Nanoparticles. *Analytical Chemistry* 84(9) 3965–3972. doi: 10.1021/ac203005r
- Tuoriniemi J, Cornelis G, Hassellöv M (2014) Improving the accuracy of single particle ICPMS for measurement of size distributions and number concentrations of nanoparticles by determining analyte partitioning during nebulisation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29(4) 743–752. doi: 10.1039/c3ja50367d
- Turchi CS, Ollis DF (1990) Photocatalytic degradation of organic water contaminants: Mechanisms involving hydroxyl radical attack. *Journal of Catalysis* 122(1) 178–192. doi: 10.1016/0021-9517(90)90269-P
- Ulrich A, Losert S, Bendixen N, et al (2012) Critical aspects of sample handling for direct nanoparticle analysis and analytical challenges using asymmetric field flow fractionation in a multi-detector

- approach. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27(7) 1120–1130. doi: 10.1039/c2ja30024a
- United States Environmental Protection Agency (2017) Technical Fact Sheet – Nanomaterials. https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/ffrrofactsheet_emergingcontaminant_nanomaterials_jan2014_final.pdf
- van Driel BA, Kooyman PJ, van den Berg KJ, et al (2016) A quick assessment of the photocatalytic activity of TiO₂ pigments — From lab to conservation studio! *Microchemical Journal* 126 162–171. doi: 10.1016/j.microc.2015.11.048
- VeilleNano (2010) VeilleNanos - Les enjeux des nanosciences et nanotechnologies. In: Avicenn. <http://veillenanos.fr/wakka.php?wiki=PagePrincipale>. Accès : 1 Mai 2019
- Venkatesan AK, Reed RB, Lee S, et al (2018a) Detection and Sizing of Ti-Containing Particles in Recreational Waters Using Single Particle ICP-MS. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 100(1) 120–126. doi: 10.1007/s00128-017-2216-1
- Venkatesan AK, Rodríguez BT, Marcotte AR, et al (2018b) Using single-particle ICP-MS for monitoring metal-containing particles in tap water. *Environmental Science: Water Research and Technology* 4(12) 1923–1932. doi: 10.1039/c8ew00478a
- Verleysen E, De Temmerman P-J, Van Doren E, et al (2014) Quantitative characterization of aggregated and agglomerated titanium dioxide nanomaterials by transmission electron microscopy. *Powder Technology* 258 180–188. doi: 10.1016/j.powtec.2014.03.010
- Verleysen E, Van Doren E, Waegeneers N, et al (2015) TEM and SP-ICP-MS Analysis of the Release of Silver Nanoparticles from Decoration of Pastry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(13) 3570–3578. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00578
- Vidmar J, Milačič R, Ščančar J (2017) Sizing and simultaneous quantification of nanoscale titanium dioxide and a dissolved titanium form by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal* 132 391–400. doi: 10.1016/j.microc.2017.02.030
- Virk Indberet (2014) Nanoproduktregister - Virk | Indberet. <https://indberet.virk.dk/myndigheder/stat/MST/Nanoproduktregister>. Accès : 1 Mai 2019
- Wahlund KG, Giddings JC (1987) Properties of an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel Having One Permeable Wall. *Analytical Chemistry* 59(9) 1332–1339. doi: 10.1021/ac00136a016
- Wang C, Yu C (2012) Detection of chemical pollutants in water using gold nanoparticles as sensors : a review. *Reviews in Analytical Chemistry* 32(1) 1–14. doi: 10.1515/revac-2012-0023
- Wang J, Zhou G, Chen C, et al (2007) Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters* 168(2) 176–185. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.12.001
- Wang P, Huang B, Zhang Q, et al (2010) Highly Efficient Visible Light Plasmonic Photocatalyst Ag@Ag(Br,I). *Chemistry - A European Journal* 16(33) 10042–10047. doi:

10.1002/chem.200903361

- Warheit DB, Brown SC, Donner EM (2015) Acute and subchronic oral toxicity studies in rats with nanoscale and pigment grade titanium dioxide particles. *Food and Chemical Toxicology* 84 208–224. doi: 10.1016/j.fct.2015.08.026
- Warheit DB, Donner EM (2015) Risk assessment strategies for nanoscale and fine-sized titanium dioxide particles: Recognizing hazard and exposure issues. *Food and Chemical Toxicology* 85 138–147. doi: 10.1016/j.fct.2015.07.001
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, et al (2012) Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environmental Science & Technology* 46(4) 2242–2250. doi: 10.1021/es204168d
- Williams DB, Carter CB (2009) Transmission Electron Microscopy. Springer US, Boston, MA, <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-76501-3>
- Witzler M, Küllmer F, Günther K (2018) Validating a Single-Particle ICP-MS Method to Measure Nanoparticles in Human Whole Blood for Nanotoxicology. *Analytical Letters* 51(4) 587–599. doi: 10.1080/00032719.2017.1327538
- Wu W, Wu Z, Yu T, et al (2015) Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 16(2) 023501. doi: 10.1088/1468-6996/16/2/023501
- Wyatt PJ (1993) Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta* 272(1) 1–40. doi: 10.1016/0003-2670(93)80373-S
- Xiong Z, Ma J, Ng WJ, et al (2011) Silver-modified mesoporous TiO₂ photocatalyst for water purification. *Water Research* 45(5) 2095–2103. doi: 10.1016/j.watres.2010.12.019
- Xu P, Zeng GM, Huang DL, et al (2012) Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: A review. *Science of The Total Environment* 424 1–10. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.02.023
- Yahia Ammar A (2015) Synthèse, caractérisations et fonctionnalisation de nanocristaux semi-conducteurs luminescents. Thèse de doctorat - Université de Strasbourg
- Yang Y, Doudrick K, Bi X, et al (2014) Characterization of Food-Grade Titanium Dioxide: The Presence of Nanosized Particles. *Environmental Science & Technology* 48(11) 6391–6400. doi: 10.1021/es500436x
- Yang Y, Long C, Li H, et al (2016) Analysis of silver and gold nanoparticles in environmental water using single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Science of the Total Environment* 563–564(392) 996–1007. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.150
- Yi DK, Selvan ST, Lee SS, et al (2005) Silica-Coated Nanocomposites of Magnetic Nanoparticles and Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society* 127(14) 4990–4991. doi: 10.1021/ja0428863
- Zhang W (2003) Nanoscale iron particles for environmental remediation : An overview. *Journal of*

Nanoparticle Research 5 323–332. doi: 10.1023/A:1025520116015

Zhang Y, Leu Y-R, Aitken R, Riediker M (**2015**) Inventory of Engineered Nanoparticle-Containing Consumer Products Available in the Singapore Retail Market and Likelihood of Release into the Aquatic Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12(8) 8717–8743. doi: 10.3390/ijerph120808717

Zimm BH (**1948**) The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions. *The Journal of Chemical Physics* 16(12) 1093–1099. doi: 10.1063/1.1746738