

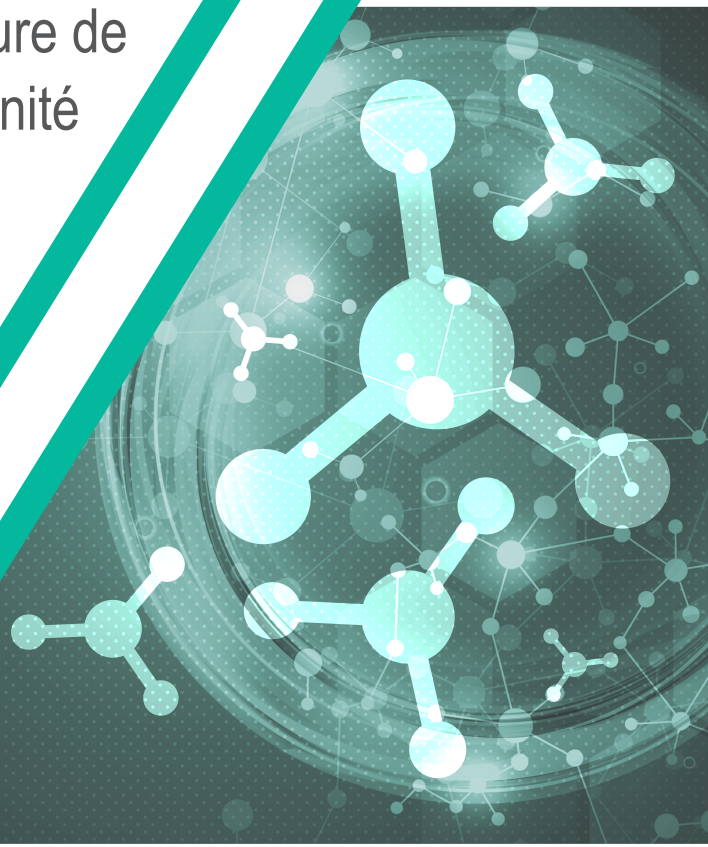


Section 1
Propriétés physico-chimiques

Essai n° 126:
Détermination de l'index d'hydrophobicité
des nanomatériaux par mesure de
l'affinité

4 Juillet 2023

**Lignes directrices de l'OCDE pour
les essais de produits chimiques**



LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Détermination de l'indice d'hydrophobicité des nanomatériaux au moyen de la mesure de l'affinité

1. La présente Ligne directrice pour les essais (LD) décrit une méthode visant à déterminer l'indice d'hydrophobicité (H_y) des nanomatériaux (NM) en mesurant leur affinité pour un substrat. Obtenu en mesurant la vitesse de liaison des NM à la surface de différents substrats manufacturés (qui constituent le revêtement de lames appelées « collecteurs »), H_y exprime la tendance de ces matériaux à se lier de préférence à une surface non polaire (hydrophobe) en raison de leur faible affinité pour l'eau. La méthode est applicable aux NM suspendus dans un milieu aqueux ou aux NM en poudre une fois qu'ils ont été suspendus dans un milieu aqueux (avec ou sans agent tensioactif) selon un mode opératoire recommandé.

2. L'hydrophobicité est définie comme « l'association de groupes ou molécules non polaires dans un environnement aqueux en raison de la tendance de l'eau à exclure les molécules non polaires » (IUPAC Gold Book : <https://goldbook.iupac.org/terms/view/HT06964>). L'hydrophobicité représente donc la tendance d'une substance à repousser l'eau. Le degré d'hydrophobicité d'une surface plane macroscopique peut être déterminé en mesurant l'angle de contact (AC) entre une gouttelette d'eau à la surface d'un solide et la surface de ce solide. En général, une surface plane est dite hydrophobe lorsque son AC est supérieur à 90° , un seuil conventionnel utilisé pour distinguer les surfaces hydrophobes des surfaces hydrophiles (1). La littérature décrit plusieurs méthodes qui permettent de caractériser l'hydrophobicité des NM, par exemple les tests d'adsorption de colorant, la mesure de l'angle de contact et la chromatographie d'interaction hydrophobe. Cependant, ces méthodes ne permettent pas de quantifier l'hydrophobicité des NM, posent des problèmes de reproductibilité et présentent des difficultés techniques, ou bien nécessitent une grande quantité de matériel. Des examens approfondis de ces méthodes sont disponibles dans la littérature (p. ex., (2,3)).

3. Plusieurs cadres législatifs, dont le Règlement 1907/2006 de l'Union européenne (REACH), exigent de mentionner le coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}), un paramètre clé des modèles d'exposition environnementale qui indique le devenir et le transport d'un produit chimique dans le compartiment aquatique ou pour l'évaluation des risques pour la santé humaine. Cependant étant donné que le comportement des NM suspendus dans les fluides peut dépendre de facteurs cinétiques plutôt que thermodynamiques (4), le Groupe de travail de l'OCDE sur les nanomatériaux manufacturés (GTNM) (p. ex. (5,6,7)) et la communauté scientifique (p. ex., NANoREG 2015 (8)) sont parvenus à la conclusion que les LD existantes relatives à la mesure de K_{ow} (LD n° 107, 117 et 123) ne s'appliquent pas aux nanomatériaux. Par ailleurs, le document d'orientation du Règlement REACH énonce que le K_{ow} est pertinent pour la fraction soluble des nanomatériaux ayant une solubilité dans l'eau <100 mg/L, mais ne

l'est pas pour la fraction particulaire. Le GTNM a pointé la nécessité de développer d'autres procédures pour acquérir des informations relatives au comportement des nanomatériaux dans les fluides (10). L'hydrophobicité fait actuellement partie des paramètres physicochimiques énumérés dans le Cadre de décision de l'OCDE sur la caractérisation physicochimique des nanomatériaux manufacturés (10). L'interaction des nanomatériaux avec des organismes aquatiques et terrestres (qui comprend la bioaccumulation et la persistance) et avec la surface des cellules humaines (y compris le transport dans le corps humain à travers la peau et les poumons et l'accumulation qui en résulte dans les tissus/organes, ou la clairance sanguine) est un processus complexe qui dépend de nombreux facteurs faisant intervenir aussi bien les propriétés des NM que leur microenvironnement. Entre autres paramètres, l'hydrophobicité pourrait apporter des informations sur l'affinité des NM pour ces matrices et organismes (9). Cependant, la mise au point d'une relation quantitative propriété-propriété (QPPR) entre, par exemple, l'hydrophobicité et l'un des paramètres de départ d'un modèle de devenir (par exemple, l'affinité de liaison), nécessiterait de rassembler davantage de données sur les deux aspects. La présente LD contribuera au rassemblement des connaissances nécessaires.

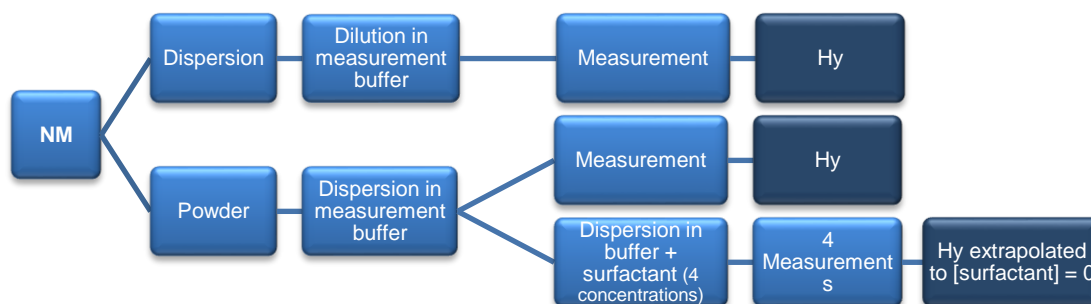
4. La méthode décrite dans la présente Ligne directrice vise à déterminer l'indice d'hydrophobicité (H_y) de nanomatériaux en suspension dans un échantillon aqueux (en tenant compte de tous les traitements, y compris l'enrobage, qui peuvent influencer sur leurs propriétés) ou de nanomatériaux en poudre après dispersion, suivant un mode opératoire recommandé. H_y représente la tendance des NM à se lier à des surfaces hydrophobes, ce qui apporte une information relative à l'affinité de ces matériaux pour des matrices et organismes naturels.

5. La proposition initiale de rédaction de la présente LD a fait fond sur deux articles publiés par Desmet et al. (11) et Valsesia et al. (12), ainsi que la validation de la méthode lors d'une comparaison interlaboratoire entre 2019 et 2022 (13).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

6. La présente Ligne directrice vise à déterminer l'indice d'hydrophobicité des nanomatériaux en suspension dans un milieu aqueux. Si un NM a subi un traitement de surface, les nouvelles propriétés de surface sont considérées comme des propriétés intrinsèques du matériau soumis à l'essai. La détermination de H_y s'applique au matériau dans son ensemble, avec ou sans modification de surface, et non uniquement à la formulation du cœur. Cependant, il est possible d'ajouter un agent tensioactif afin de permettre la dispersion de NM hautement hydrophobes, en suivant le mode opératoire recommandé. Si un tel additif est utilisé, les propriétés de surface du NM concerné sont partiellement modifiées par rapport à celles du matériau pur. En conséquence, pour tenir compte l'impact de cette modification, il convient d'utiliser des concentrations décroissantes d'agent tensioactif (c.-à-d. des niveaux différents de couverture de surface tensioactif/NM) puis d'extrapoler les valeurs de H_y mesurées pour obtenir l'indice théorique en l'absence de tensioactif ([tensioactif] = 0). Pour les NM en poudre, le mode opératoire de dispersion dépend du matériau soumis à l'essai : il doit garantir que la suspension obtenue est stable et que les propriétés de surface du NM (y compris son enrobage s'il y en a dans la poudre) ne sont pas modifiées. Le **graphique 1** présente un arbre de décision applicable au traitement des échantillons de NM. L'exigence de stabilité de la suspension est remplie si la concentration de NM suspendu est égale ou supérieure à 90 % de la concentration initiale 6 h après la fin de la procédure de dispersion. Cette valeur de stabilité de dispersion correspond à celle donnée dans la LD n°318 de l'OCDE (« Stabilité de dispersion des nanomatériaux en milieu environnemental simulé »). Pour déterminer l'indice d'hydrophobicité, une concentration comprise entre 10^6 et 10^9 particules/mL est recommandée. Cette page permet généralement d'obtenir un colloïde stable et d'éviter la saturation du signal de diffusion en microscopie à

fond noir, tout en maintenant une quantité dénombrable de particules à même de fournir des résultats statistiquement exploitables.



Graphique 1. Arbre de décision applicable à la méthode décrite dans la LD.

7. La méthode s'applique aux NM qui peuvent être détectés au moyen d'un microscope à fond noir, sans restriction quant à leur composition. Il faut cependant tenir compte d'une limite qui dépend du rapport entre l'intensité de diffusion de la lumière par le NM et sa taille : la limite inférieure de taille est estimée à environ 10 nm pour les NM métalliques et 50 nm pour les NM qui présentent une faible efficacité de diffusion, si l'on utilise un microscope à fond noir (pour améliorer le contraste) (14,15). La méthode n'est pas limitée aux particules sphériques. Cependant, elle n'a pas été validée pour les fibres ; c'est pourquoi un rapport d'aspect de 1/3 constitue une limite recommandée. Pour les NM solubles, la réduction de la taille pendant la période de mesure ne doit pas être critique, c'est-à-dire que le NM doit toujours être détectable par microscopie à fond noir à la fin des mesures. Les informations disponibles relatives à la dissolution des nanomatériaux devront être consignées. Une étape permettant de confirmer l'applicabilité de la méthode au nanomatériau soumis à l'essai (en tenant compte de paramètres tels que la taille, la forme et la solubilité) consiste à détecter et à mesurer par microscopie à fond noir l'adsorption effective des NM à une concentration de 10^9 particules/mL sur le collecteur hydrophile chargé positivement (ou sur le collecteur hydrophile chargé négativement pour les NM chargés positivement) après une durée de contact de l'échantillon de 12 min. L'indice d'hydrophobicité Hy déterminé pour les matériaux solubles sera une conséquence de leurs propriétés de surface du fait de leur interaction avec le milieu de dispersion. Les matériaux suivants ont été utilisés lors de la vérification interlaboratoire : particules de polystyrène nues, nanoparticules d'or stabilisées par des ions citrate, particules de polystyrène de carboxylate, nanoparticules hydrophobes de TiO_2 stabilisées avec de la matière organique naturelle (MON), et de TiO_2 (additif alimentaire commercial E171).

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. L'essai permet de quantifier l'indice d'hydrophobicité (Hy) des NM en mesurant la vitesse à laquelle des NM suspendus se lient à différents collecteurs. Les surfaces des collecteurs ont été manufacturées de manière à posséder différentes propriétés. Le paramètre Hy constitue une mesure directe de la tendance d'un NM à se lier à une surface hydrophobe plutôt qu'à rester dans la phase aqueuse. Trois collecteurs différents sont utilisés dans l'essai. Le collecteur hydrophobe est celui qui permet de mesurer l'hydrophobicité du NM, c'est-à-dire celui qui fait intervenir les interactions hydrophobes

entre le NM et le collecteur. Les deux autres collecteurs sont hydrophiles et porteurs de charges positives et négatives, ils font office de référence et de témoin négatif. Dans le cas des NM chargés négativement, c'est le collecteur hydrophile chargé positivement qui est la référence : la vitesse de liaison y est maximisée par les interactions électrostatiques. Dans le cas des NM chargés positivement, c'est le collecteur hydrophile chargé négativement qui remplit cette fonction de référence. La vitesse de liaison au collecteur de référence n'est limitée que par le transport du NM à la surface du collecteur. Le dernier collecteur (dont la surface porte une charge de même signe que le NM) est le témoin négatif. L'indice d'hydrophobicité est défini comme le logarithme du rapport entre la vitesse de liaison du NM au collecteur hydrophobe et la vitesse de liaison du NM au collecteur de référence (le collecteur hydrophile sur lequel la vitesse de liaison est maximale).

9. Les collecteurs sont manufacturés de manière à présenter des niveaux d'hydrophobicité et des charges de surface différents. Ils présentent les propriétés suivantes :

- une rugosité de surface très faible (\ll à la taille des NM),
- une certaine valeur de la composante polaire de l'énergie libre de surface, comme décrit ci-après,
- un certain potentiel ζ dans le milieu de mesure, comme décrit ci-après.

10. D'après la théorie de Owens-Fowkes-Wendt (16,17), l'énergie de surface totale d'un solide est la somme d'une composante dispersive (tenant compte des interactions non polaires) appelée γ_{LW} (composante Lifschitz–van der Waals) et d'une composante polaire appelée γ_{AB} (composante acide-base). Les matériaux solides ayant une faible composante γ_{AB} sont dits hydrophobes. Un solide dont γ_{AB} augmente devient plus hydrophile. Le collecteur hydrophobe peut être obtenu, comme dans le test de compétence, à partir d'un revêtement aux fluorocarbures, lequel est associé à une valeur γ_{AB} très faible. On peut ensuite faire augmenter γ_{AB} en ajoutant des couches de matériau hydrophile.

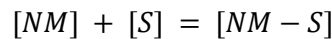
11. Avant la réalisation des mesures, les NM déjà suspendus dans un milieu aqueux sont dilués dans du tampon phosphate (TP). Les NM qui se présentent sous forme de poudre sont mis en suspension dans le TP. Un agent tensioactif peut être ajouté pour faciliter la dispersion des NM hautement hydrophobes. Dans ce cas, il convient de réaliser une série de 4 mesures en ayant recours à des concentrations décroissantes de tensioactif (jusqu'à la concentration minimum qui permet d'obtenir une suspension stable). L'ensemble des valeurs Hy mesurées pour chaque concentration permet d'extrapoler la valeur Hy du NM sans tensioactif (Hy_x pour [tensioactif] = 0). La suspension est dégazée puis injectée sur les collecteurs au moyen d'une cellule liquide dans laquelle elle sera transportée jusqu'à la surface. Le nombre de particules qui se lient au collecteur en fonction du temps (vitesse de liaison) détermine l'affinité du matériau concerné pour le collecteur. L'imagerie des particules liées en fonction du temps est réalisée au moyen d'un microscope à fond noir et d'une caméra. Un logiciel d'analyse d'images détecte et compte les particules automatiquement puis trace les courbes représentant les vitesses de liaison. Pour distinguer les particules liées des particules libres, on suit leur position sur la série d'images acquises : les particules qui se déplacent d'un cliché à un autre ne sont pas comptabilisées. L'essai permet ainsi de connaître le nombre de particules liées aux différents collecteurs en fonction du temps.

12. Ces données expérimentales peuvent être utilisées au départ pour évaluer qualitativement l'hydrophobicité des nanomatériaux ((11,12)). En principe, plus la vitesse de liaison à un collecteur hydrophobe est proche de la vitesse observée avec le collecteur de référence, plus l'hydrophobicité du NM est élevée (du fait des interactions hydrophobes).

13. La vitesse de liaison des NM aux différents collecteurs est régie par les forces XDLVO (forces de la théorie de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek étendue, obtenues en ajoutant les forces hydrophobes au modèle DLVO) et par des limites cinétiques imposées par la diffusion des NM (18).

L'énergie d'interaction XDLVO entre les NM et la surface détermine la formation d'une barrière d'énergie qui inhibe la liaison. La théorie XDLVO s'applique aux NM en suspension stable dans des échantillons aqueux.

14. Lorsque la barrière d'énergie est comparable à l'énergie thermique, le NM parvient à se lier à la surface dans un état thermodynamique stable. Ceci se produit lorsque les forces de Van der Waals ou hydrophobes peuvent compenser la répulsion électrostatique. Lorsque les forces électrostatiques sont attractives, le seul facteur qui limite la vitesse de liaison des particules à la surface est le transport des particules. L'équilibre de la réaction peut s'écrire comme suit :



Où $[S]$ est le site de liaison à la surface et $[NM - S]$ est le complexe formé par le nanomatériau et le site de liaison. La constante d'équilibre de la réaction est égale au rapport entre les produits et les réactifs :

$$K_{eq} = [NM - S]/([NM] + [S])$$

15. La constante d'équilibre K_{eq} ne peut pas être déterminée, car la réaction ne se produit que dans un seul sens (4). Il n'est donc pas possible de déterminer l'énergie libre de liaison de Gibbs en utilisant une seule surface. La relation thermodynamique entre l'énergie libre de Gibbs et la constante d'équilibre est donnée par l'équation suivante :

$$\Delta G_0 = -kT \ln K_{eq}$$

Où k est la constante de Boltzmann et T est la température. De l'autre côté, ΔG_0 est le paramètre limitant qui inhibe la liaison des NM à la surface. Suivant la distribution de Boltzmann, la vitesse de liaison à une surface se calcule ainsi :

$$v = v_{max} e^{-(\Delta G_0/kT)}$$

où v_{max} est la vitesse de liaison maximum (pour une réaction spontanée limitée uniquement par le transport des particules à la surface). D'où le fait que $\Delta G_0/kT$ peut s'écrire :

$$-\Delta G_0/kT = \ln(v/v_{max})$$

16. On définit un indice d'hydrophobicité (H_y) en fonction du rapport entre l'affinité du matériau pour une phase solide hydrophobe (le collecteur hydrophobe) et son affinité pour une phase solide hydrophile qui fait prévaloir les forces d'attraction électrostatique (le collecteur de référence, porteur d'une charge négative ou positive selon la charge de surface du NM mesuré, sur lequel la vitesse de liaison est maximale), comme décrit au paragraphe 7. H_y peut être exprimé ainsi :

$$H_y = \log(v_{H_y}/v_{max})$$

H_y est une mesure directe de la tendance d'un NM à se lier au collecteur hydrophobe, plutôt qu'à rester dans la phase aqueuse, ce qui est directement en lien avec son hydrophobicité.

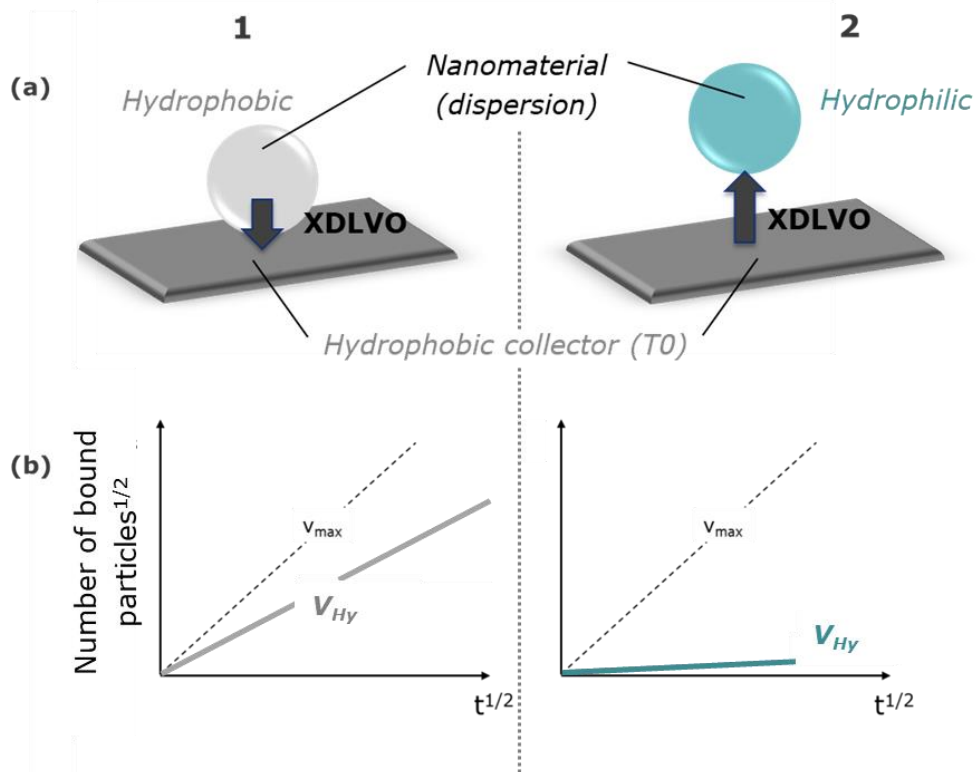
17. Dans la méthode, v_{H_y} est la vitesse de liaison sur le collecteur hydrophobe : elle est directement liée à l'hydrophobicité du NM lorsque les liaisons sont régies par les interactions hydrophobes entre le NM et le collecteur. v_{max} est mesurée sur le collecteur où la vitesse de liaison est maximale car les interactions électrostatiques y prévalent. Comme, dans la plupart des cas, les NM sont chargés négativement dans les conditions de mesure de l'essai, c'est sur le collecteur hydrophile chargé positivement que la vitesse de

liaison n'est limitée que par le transport des NM à la surface. Quand les NM sont chargés positivement, on utilise à la place la vitesse de liaison sur le collecteur hydrophile chargé négativement.

18. Puisque v_{Hy}/v_{max} est toujours < 1 , les valeurs Hy sont toujours < 0 . Hy proche de zéro signale une forte affinité pour le collecteur hydrophobe (voir graphique 2), c'est-à-dire que les particules se comportent comme des produits chimiques hydrophobes. À titre indicatif, un nanomatériau est considéré comme hydrophobe lorsque la valeur de l'indice est comprise entre 0 et -1, et comme hydrophile lorsque la valeur est inférieure à -1. Plus Hy est proche de 0, plus le nanomatériau est hydrophobe.

19. Comme décrit au paragraphe 11, dans le cas d'un NM hydrophobe auquel on ajoute un agent tensioactif pour faciliter la suspension, on calcule une valeur Hy pour chaque concentration. Chaque valeur Hy mesurée correspond à l'indice d'hydrophobicité du NM dont les propriétés ont été modifiées par le tensioactif. On représente graphiquement les valeurs obtenues afin d'extrapoler par régression linéaire la valeur de Hy en l'absence d'agent tensioactif (Hy_x pour [tensioactif] = 0). On réalise cette extrapolation sur une plage de concentrations où Hy est une fonction linéaire de la concentration de tensioactif, en commençant par la concentration minimale à laquelle la suspension est stable. Dans le cas contraire où la relation ne serait pas linéaire, il convient de réduire les concentrations d'agent tensioactif pour éviter toute saturation.

20. Le principe de la méthode est illustré dans le **graphique 2**.



Graphique 2. Principe de la méthode de quantification de l'indice d'hydrophobicité des nanomatériaux. Les NM en suspension stable sont mis en contact avec le collecteur par diffusion. (a) L'équilibre énergétique décrit par la théorie XDLVO régissant la liaison stable des NM hydrophobes au collecteur hydrophobe (colonne 1) ou la répulsion des NM hydrophiles (colonne 2). (b) La racine carrée du nombre de particules liées est présentée comme une fonction de la racine carrée dans le temps. La vitesse de

liaison des NM au collecteur hydrophobe v_{Hy} est représentée graphiquement et comparée à la vitesse de liaison maximale v_{max} que l'on observe lorsque les forces électrostatiques dominent. Plus la pente de V_{Hy} est proche de la pente de V_{max} , plus la particule est hydrophobique.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

21. Pour la démonstration des compétences, il convient d'injecter sur les collecteurs un matériau standard disponible dans le commerce destiné à servir de témoin. Un métal noble hydrophobe peut être utilisé, par exemple des nanoparticules d'or de 70 nm. Le NM est mis en suspension dans le tampon phosphate (TP) à 10 mM, pH 7, à une concentration de 10^9 particules/mL, et soumis à l'essai suivant la procédure d'essai décrite ci-dessous (paragraphe 29). Après 12 min d'incubation sur le collecteur hydrophobe, on doit obtenir une liaison d'environ 1 particule/ μm^2 . Ce test permet de définir les paramètres du système d'essai (microscope et caméra).

22. Dans ces conditions, l'indice d'hydrophobicité du matériau cité au paragraphe précédent doit être > -1 .

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

23. Les critères de validité de l'essai sont les suivants :

Les propriétés physico-chimiques de la dispersion de NMs à mesurer suivent les critères suivants :

Les NM doivent être en suspension stable dans le tampon phosphate à 10 mM et pH 7 (avec ou sans utilisation d'agent tensioactif). L'exigence de stabilité de la suspension est remplie si la concentration de particules suspendues est égale ou supérieure à 90 % de la concentration initiale 6 h après la fin de la procédure de dispersion, ce qui correspond à la valeur de stabilité de dispersion retenue dans la LD n° 318 de l'OCDE. La concentration massique de la suspension doit être mesurée dans la couche supérieure de 0.5-1 cm du tube à essai. Une concentration de particules de 10^6 à 10^9 par mL est conseillée.

Les propriétés physico-chimiques de la surface des collecteurs suivent les critères suivants :

- moyenne quadratique (RMS) de la rugosité < 2 nm
- composantes (polaire et dispersive) de l'énergie libre de surface telles que décrites au **tableau 1**,
- stabilité dans le temps (pas de changement de la vitesse de liaison pendant 12 min).

Tableau 1

Surface	Exemple de revêtement	Rugosité (RMS)	Angle de contact dans l'eau (degré)	γ_{AB} (mJ/m ²)
Hydrophobe	Fluorocarbure ou alkylsilane (18)	< 2 nm	> 100	< 1
Positive	5 couches de polyélectrolytes, finissant par du PDDA		< 70	> 10
Négative	4 couches de polyélectrolytes, finissant par du PSS		< 70	> 10

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparation de l'essai

Appareillage et réactifs chimiques

24. Équipement normal de laboratoire, comprenant notamment :

- Pipettes calibrées pour la préparation et l'injection des échantillons (volumes de 5 mL, 1 mL, 0.1 mL, 0.02 mL).
- Lames de verre pour microscope utilisées comme collecteurs.
- Lame disponible dans le commerce, dotée de conduits sans fond et d'une face inférieure auto-adhésive permettant d'y coller un substrat de son choix, ou bien conduits microfluidiques fabriqués par le laboratoire d'essai.
- Microscope optique équipé d'une caméra permettant des observations sur fond noir.

25. Produits et réactifs :

- Eau (H₂O) – de l'eau ultra pure déionisée (18 M Ω de résistivité) est utilisée pour toutes les préparations et dilutions.
- Tampon phosphate (TP) 10 mM, pH = 7.
- Nanomatériaux sous forme de poudre sèche ou de suspension aqueuse.
- Agent tensioactif (p. ex., matière organique naturelle – MON) dilué dans le TP et utilisé uniquement avec les NM hydrophobes qui ne peuvent être mis en suspension seuls.

Conditions générales

26. Toutes les expériences sont menées en trois réplicats à 20 +/- 1°C.

Préparation des suspensions mères de nanomatériau

27. Les matériaux sont mis en suspension dans un milieu aqueux et dégazés. Pour la dispersion, il est recommandé de suivre une procédure qui garantit que la suspension obtenue remplira les conditions de stabilité sans modification des propriétés de surface ni de la nature chimique des NM. Par exemple, on évitera de recourir à la sonication à forte puissance, car celle-ci pourrait, en ôtant l'enrobage de la surface des particules, modifier les propriétés du NM. Les traitements de surface n'étant pas considérés ici comme une modification, mais comme une propriété intrinsèque du matériau soumis à l'essai, la méthode est

applicable aux NM traités en surface. Les NM déjà suspendus dans un milieu aqueux sont dilués dans le TP. Les NM qui se présentent sous forme de poudre sont mis en suspension dans le TP. Un agent tensioactif peut être ajouté pour faciliter la dispersion des NM hautement hydrophobes qui, sans cela, ne pourraient pas être mis en suspension. Dans ce cas, il convient de préparer une série de 4 concentrations croissantes de tensioactif doivent être préparées, à partir de la concentration minimum nécessaire pour obtenir une suspension stable. Toutes les concentrations seront mesurées selon une même procédure.

28. Trois surfaces différentes (hydrophobe, positive et négative) caractérisées par les paramètres énoncés au **tableau 1** sont préparées sur des lames transparentes ou achetées auprès de fabricants de lames fonctionnalisées. Un exemple de procédure de préparation est fourni à l'**annexe 2**.

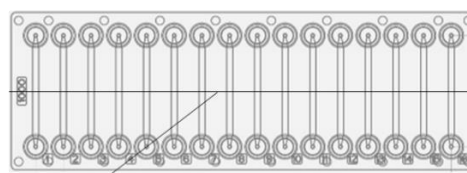
Montage de la chambre microfluidique

29. Afin de faciliter la mise au point sur la surface en microscopie à fond noir, pratiquer une incision longitudinale nette sur la lame qui sert de collecteur, en ligne droite au milieu de la largeur de la lame, comme illustré dans le graphique 3. Ensuite, sur chaque substrat (collecteur), installer les chambres microfluidiques d'un volume, d'une superficie et d'une hauteur connus. Pour réaliser les mesures dans les conditions du mode opératoire de l'essai, on peut utiliser des lames multiconduits auto-adhésives disponibles dans le commerce (p. ex. lames auto-adhésives 6 conduits de Idibi ou 16 conduits de Chipshop)¹.

a. Collector (modified microscope glass slide)



b. Collector after mounting of fluidic cell



Line position

Graphique 3. Étapes de préparation des collecteurs. **a.** Pratiquer une incision longitudinale nette, en ligne droite au milieu de la largeur, sur les lames de microscope en verre présentant des propriétés hydrophobes et porteuses de charges. **b.** Coller sur chaque collecteur une lame dotée de chambres fluidiques. La présence de la ligne incisée au milieu des conduits fluidiques facilitera la mise au point du microscope.

Mode opératoire de l'essai : mesure de la liaison des nanomatériaux aux collecteurs par microscopie à fond noir

30. Afin de mesurer les vitesses de liaison des NM sur les différents collecteurs, on enregistre des vidéos (séries de clichés) par microscopie à fond noir. Il est aussi possible d'utiliser la microscopie à contraste de phase ou la microscopie à contraste interférentiel différentiel, ou toute autre technique permettant une analyse par traçage de particules individuelles. L'acquisition des images est effectuée avec les paramètres suivants : grossissement 10x, ouverture numérique ON = 0.15. Le champ de vision du microscope doit être au minimum de 0.4 mm. À chaque acquisition, l'objectif doit être centré sur le conduit

¹L'essai a été mis au point avec des lames auto-adhésives 6 conduits d'Idibi et 16 conduits de Chipshop, mais n'importe quelle lame multiconduits disponible dans le commerce ou système microfluidique conçu par le laboratoire peut être utilisé.

observé afin d'éviter tout effet de bord. La mise au point, l'éclairage et le contraste doivent être ajustés en prenant pour référence la ligne incisée sur le collecteur (voir **graphique 3**). Le logiciel d'acquisition des images doit être configuré de manière à acquérir au moins une image toutes les 30 sec pendant les 12 min qui suivent l'injection des échantillons.

31. Un volume d'échantillon équivalant au volume total du conduit et de son réservoir (par exemple, 20 μL à injecter dans une lame 16 conduits comme celles de Chipshop) doit être injecté à l'aide d'une pipette de manière à remplir complètement le conduit. L'acquisition des images commence immédiatement après l'injection et dure 12 min.

32. En principe, l'analyse peut également être réalisée au moyen de techniques qui fournissent un signal global indiquant la liaison des NM aux collecteurs, sous réserve que ces techniques permettent une analyse cinétique (p. ex., microbalance à quartz ou résonance des plasmons de surface (19, 21, 22)). Comme avec la méthode au microscope, la comparaison de la cinétique de liaison aux différents collecteurs permettra de déterminer l'indice d'hydrophobicité du nanomatériau. Une évaluation comparative des méthodes n'a cependant pas encore été réalisée dans le cadre des essais interlaboratoires.

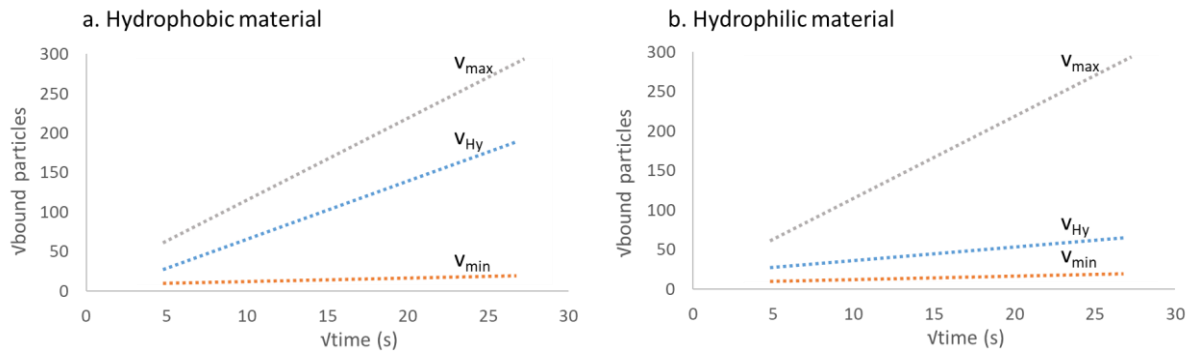
RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des données

33. La mesure du nombre de particules liées aux collecteurs sur chaque cliché est réalisée au moyen du logiciel libre ImageJ et de son module d'extension Trackmate². Sur une image de microscopie à fond noir, les particules sont plus lumineuses que le fond. Pour les détecter, on applique un seuil à la distribution d'intensité des pixels. L'analyse consiste alors à détecter automatiquement les particules sur chaque cliché et à suivre leurs positions tout au long de la série d'images. Les objets qui ne se déplacent pas après plus de deux images consécutives (en comptant à rebours à partir de la dernière image observée) sont comptabilisés. Ce calcul automatisé permet de quantifier le nombre de particules liées par cliché. Pour obtenir l'intervalle de temps, on multiplie le nombre de clichés par le délai entre chaque prise (30 sec) : on obtient ainsi le nombre de particules liées par unité de temps, autrement dit la vitesse de liaison du nanomatériau au collecteur. Le fichier texte ainsi produit peut être importé dans un logiciel de traitement de données en vue de l'étape d'ajustement de la courbe.

34. Le nombre de particules liées à chaque collecteur peut être tracé en fonction de la racine carrée du temps afin d'obtenir une droite de tendance, comme le montre le **graphique 4**. Cette fonction est calculée pour chaque collecteur. Elle peut être ajustée par régression linéaire en utilisant l'assistant d'ajustement disponible dans Microsoft Excel® ou dans tout autre logiciel de traitement de données. Cet ajustement permet également d'obtenir la pente de la droite, appelée v , qui représente la vitesse à laquelle les NM se lient aux différents collecteurs.

²Le logiciel est disponible en libre téléchargement à l'adresse <https://imagej.net/download.html>



Graphique 4. Exemple graphique du résultat de l'analyse des images pour un nanomatériau (a) hydrophobe et (b) hydrophile. Les droites de tendance sont obtenues en représentant la racine carrée du nombre de particules liées en fonction de la racine carrée du temps en secondes. Les pentes de ces droites sont v_{Hy} , qui représente la vitesse de liaison au collecteur hydrophobe, v_{max} , qui représente la vitesse maximale de liaison, obtenue avec le collecteur hydrophile porteur d'une charge de surface opposée à la charge du NM (cas où les forces électrostatiques attractives dominent), et v_{min} , qui représente la vitesse de liaison au collecteur hydrophile porteur d'une charge de surface identique à la charge du NM.

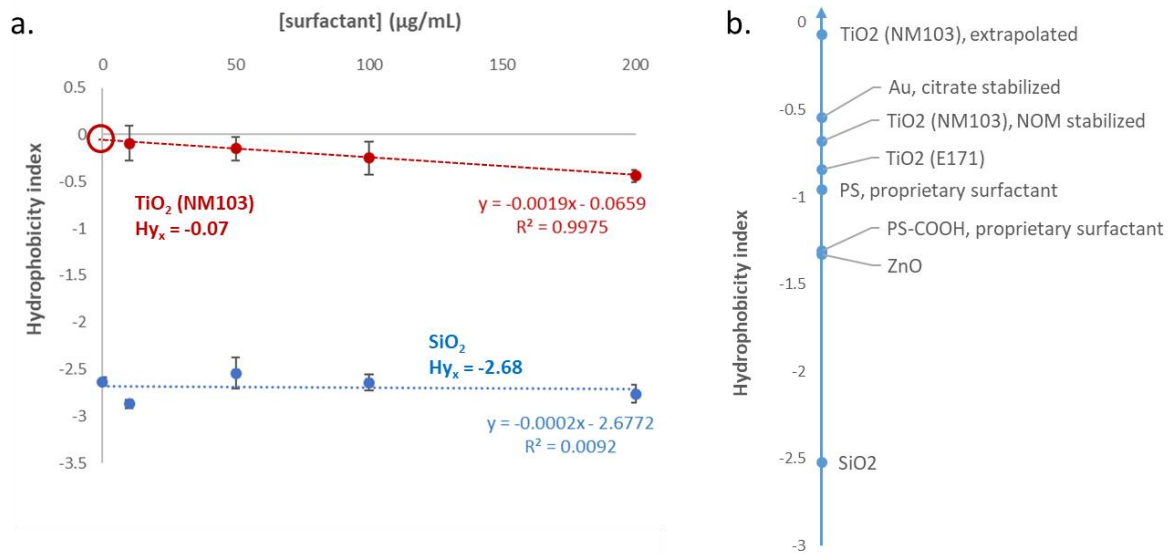
35. Les vitesses de liaison servent ensuite à calculer l'indice d'hydrophobicité Hy , défini comme le logarithme du rapport entre la vitesse de liaison au collecteur hydrophobe (v_{Hy}) et la vitesse de liaison au collecteur hydrophile sur lequel l'attraction électrostatique est dominante (v_{max}) (collecteur hydrophile chargé positivement pour les nanomatériaux chargés négativement, ce qui est le cas le plus courant dans le milieu de mesure, ou collecteur hydrophile chargé négativement pour les nanomatériaux chargés positivement), tels que spécifié dans l'équation des paragraphes 16 à 18. À titre indicatif, un nanomatériau est considéré comme hydrophobe lorsque la valeur de l'indice est comprise entre 0 et -1, et comme hydrophile lorsque la valeur est inférieure à -1. Plus l'indice est proche de 0, plus le nanomatériau est hydrophobe.

36. Dans le cas d'un NM hydrophobe auquel on ajoute un agent tensioactif pour faciliter la suspension, on calcule une valeur Hy pour chaque concentration de tensioactif. Chaque valeur Hy correspond à l'indice d'hydrophobicité du NM dont les propriétés ont été modifiées par le tensioactif. On représente graphiquement les valeurs obtenues afin d'extrapoler par régression linéaire la valeur de Hy sans agent tensioactif (**graphique 5**). On réalise cette extrapolation sur une plage de concentrations où Hy est une fonction linéaire de la concentration de tensioactif. Dans le cas contraire où la relation ne serait pas linéaire, il convient de réduire les concentrations d'agent tensioactif pour éviter toute saturation.

Analyse des données / évaluation des résultats de l'essai

37. La première évaluation qualitative consiste à observer la capacité de dispersion d'un nanomatériau dans le milieu d'essai. S'il n'est pas possible de le mettre en suspension, le nanomatériau est considéré comme hautement hydrophobe et l'on suppose que Hy est proche de 0. Pour quantifier Hy dans un tel cas, on ajoute un agent tensioactif qui facilite la dispersion des NM hautement hydrophobes, comme décrit dans les paragraphes 27 et 36.

38. Le calcul de Hy , c.-à-d. le logarithme du rapport v_{Hy}/v_{max} , permet de quantifier l'indice d'hydrophobicité du NM soumis à l'essai. Plus Hy est négatif, moins le NM est hydrophobe. Une échelle indicative des indices obtenus avec les matériaux soumis à l'essai est fournie dans le graphique 5b.



Graphique 5. a. Exemple d'extrapolations de H_y pour deux NM – un NM hydrophobe impossible à suspendre seul dans un milieu aqueux (NM103, TiO_2 enrobé hydrophobe) et un NM hydrophile pouvant être suspendu sans tensioactif (SiO_2) – à partir de mesures réalisées en utilisant des concentrations décroissantes d'agent tensioactif. H_{y_x} est la valeur extrapolée pour [surfactant] = 0. b. Échelle indicative de l'indice d'hydrophobicité (H_y) de matériaux soumis à l'essai suivant la méthode décrite. Plus l'indice est proche de 0, plus le nanomatériau est hydrophobe.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai comprend les informations suivantes, sans s'y limiter :

Conditions d'essai

Pour les collecteurs :

- origine, numéro de lot, date limite d'utilisation,
- valeurs de l'angle de contact,
- valeurs des autres paramètres (facultatif si l'on suit la procédure de préparation proposée).

Pour la chambre microfluidique :

- origine, numéro de lot, date limite d'utilisation.

Pour le milieu de dispersion :

- date limite d'utilisation,
- mesure du pH et concentration en sels,
- type et concentration d'agent tensioactif (le cas échéant).

Pour les particules soumises à l'essai et les particules de référence :

- origine, numéro de lot, numéro CAS, date limite d'utilisation,
- concentration en nombre de particules par mL,
- distribution granulométrique (recommandé),
- procédure de dispersion
- capacité de dissolution .

Pour le microscope à fond noir :

- objectif,
- ouverture numérique.

Résultats

Résultats pour les particules de référence

- vitesses de liaison au collecteur hydrophobe v_{Hy} et sur les deux collecteurs hydrophiles v_{min} et v_{max} ,
- hydrophobicité qualitative,
- indice d'hydrophobicité.

Résultats pour les nanomatériaux soumis à l'essai

- Graphiques des racines carrées des nombres de particules liées par rapport à la racine carrée du temps,

- vitesses de liaison au collector hydrophobe v_{Hy} et sur les deux collecteurs hydrophiles v_{min} et v_{max} ,
- hydrophobicité qualitative,
- indice d'hydrophobicité.

Discussion des résultats***Conclusion***

ABRÉVIATIONS

AC	angle de contact
ΔG^{\max}	barrière d'énergie
γ_N^{AB}	composante polaire de l'énergie libre de surface de la particule
H_y	indice d'hydrophobicité
JRC	Centre commun de recherche
K_{ow}	coefficient de partage octanol/eau
kT	produit de la constante de Boltzmann et de la température
NM	nanomatériau
Nm	nanomètre
PDDA	poly(chlorure de diallyldiméthylammonium)
PE	polyélectrolyte
PSS	polystyrène sulfonate de sodium
RMS	moyenne quadratique
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i> (mode opératoire normalisé).
LD	Ligne directrice pour les essais
V	vitesse d'adsorption
V_{Hy}	vitesse d'adsorption sur le collecteur hydrophobe
V_{\max}	vitesse maximale d'adsorption
XDLVO	théorie de Derjaguin Landau, Verwey et Overbeek étendue

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Law KY (2014). Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right. *J Phys Chem Lett.* Feb 20;5(4):686–8.
- (2) Neumann AW, David R, Zuo Y, editors. (2010). *Applied Surface Thermodynamics* [Internet]. 0 ed. CRC Press; [cited 2023 Mar 8]. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420009668>
- (3) Crandon LE, Boenisch KM, Harper BJ, Harper SL. (2020). Adaptive methodology to determine hydrophobicity of nanomaterials in situ. Mukherjee A, editor. *PLoS ONE.* Jun 3;15(6):e0233844.
- (4) Praetorius A, Tufenkji N, Goss KU, Scheringer M, von der Kammer F, Elimelech M. (2014) The road to nowhere: equilibrium partition coefficients for nanoparticles. *Environ Sci: Nano.*;1(4):317–23.
- (5) OECD (2014). Report of the OECD Expert meeting on the Physical Chemical Properties of Manufactured Nanomaterials and Test Guidelines. OECD Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. No. 41. OECD Publishing Paris. Available from: ENV/JM/MONO(2014)15 [https://one.oecd.org/document/env/jm/mono\(2014\)15/en/pdf](https://one.oecd.org/document/env/jm/mono(2014)15/en/pdf)
- (6) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials. OECD Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. No 15. OECD Publishing Paris. ENV/JM/MONO(2009)21
- (7) OECD (2014). Ecotoxicology and Environmental Fate of Manufactured Nanomaterials: Test Guidelines: Expert Meeting Report Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 40. ENV/JM/MONO(2014)1 [https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2014\)1/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2014)1/en/pdf)
- (8) NANoREG. (2015) Experimental evaluation of OECD methods for analysis of physicochemical MNM properties, Deliverable 2.3 [Internet]. Available from: <https://www.rivm.nl/sites/default/files/2018-11/NANoREG%20D2.03%20FS%20Experimental%20evaluation%20of%20OECD%20methods%20for%20analysis%20of%20physicochemical%20MNM%20properties.pdf>
- (9) OECD (2012). Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials. OECD Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. No. 36. OECD publishing, Paris. Available: [https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2012\)40/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2012)40/en/pdf)
- (10) OECD (2019). Physical-Chemical Decision Framework to Inform Decisions for Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials. OECD Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. No. 90. OECD publishing, Paris. Available from: [https://one.oecd.org/document/env/jm/mono\(2019\)12/en/pdf](https://one.oecd.org/document/env/jm/mono(2019)12/en/pdf)
- (11) Desmet C, Valsesia A, Oddo A, Ceccone G, Spampinato V, Rossi F, et al. (2017) Characterisation of nanomaterial hydrophobicity using engineered surfaces. *J Nanopart Res.* Mar;19(3):117.
- (12) Valsesia A, Desmet C, Ojea-Jiménez I, Oddo A, Capomaccio R, Rossi F, et al. (2018). Direct quantification of nanoparticle surface hydrophobicity. *Commun Chem.* Sep 6;1(1):53.
- (13) Desmet, C., Roncari, F., Gottardo, S., Ponti, J., Riego Sintes, J., Colpo, P. and Valsesia, A., Inter-laboratory comparison on the determination of the hydrophobicity index of nanomaterials through an affinity measurement, EUR 31542 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2023, ISBN 978-92-68-04186-4, doi:10.2760/486603, JRC133937.
- (14) Vetten MA, Tlotleng N, Tanner Rascher D, Skepu A, Keter FK, Boodhia K, et al. (2013) Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines. *Part Fibre Toxicol.* Dec;10(1):50.
- (15) Rahman L, Mallach G, Kulka R, Halappanavar S. (2021). Microplastics and nanoplastics science: collecting and characterizing airborne microplastics in fine particulate matter. *Nanotoxicology.* 2021 Oct 21;15(9):1253–78.

- (16) Owens DK, Wendt RC (1969) Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci.* Aug;13(8):1741–7.
- (17) Fowkes FM. (1964) Attractive forces at interfaces. *Ind Eng Chem.* Dec;56(12):40–52.
- (18) van Oss CJ. (1993). Acid—base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* Oct;78:1–49.
- (19) Wong (2013). Preparation of Transparent Superhydrophobic Glass Slides: Demonstration of Surface Chemistry Characteristics. *J. Chem. Educ.* 2013, 90, 9, 1203–1206 <https://doi.org/10.1021/ed300809m>
- (20) Chen Q, Xu S, Liu Q, Masliyah J, Xu Z. (2016). QCM-D study of nanoparticle interactions. *Advances in Colloid and Interface Science.* 2016 Jul;233:94–114.
- (21) Olsson ALJ, Quevedo IR, He D, Basnet M, Tufenkji N. (2013) Using the Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring to Evaluate the Size of Nanoparticles Deposited on Surfaces. *ACS Nano.* Sep 24;7(9):7833–43.
- (22) Zybin A, Kuritsyn YA, Gurevich EL, Temchura VV, Überla K, Niemax K. (2010). Real-time Detection of Single Immobilized Nanoparticles by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Plasmonics.* Mar;5(1):31–5.

ANNEXE – EXEMPLE DE PRÉPARATION ET DE CARACTÉRISATION DES COLLECTEURS

Appareillage et réactifs chimiques

- Lames de verre classiques pour microscope ou lames recouvertes de fluorocarbure pour la préparation des collecteurs.
- Tensiomètre optique pour vérifier l'angle de contact des collecteurs préparés.
- Lame disponible dans le commerce, dotée de conduits sans fond et d'une face inférieure auto-adhésive permettant d'y coller un substrat de son choix, ou bien conduits microfluidiques fabriqués par le laboratoire d'essai.
- Eau (H₂O) – de l'eau ultra pure déionisée (18 MΩ de résistivité) est utilisée pour toutes les préparations et dilutions.
- Solution de poly(chlorure de diallyldiméthylammonium) (PDDA) à 2 % dans l'eau pour la modification par autoassemblage couche par couche du substrat.
- Solution de polystyrène sulfonate de sodium (PSS) à 2 % dans l'eau pour la modification par autoassemblage couche par couche du substrat.

Exemple de préparation des collecteurs

39. Trois surfaces différentes (hydrophobe, positive et négative) caractérisées par les paramètres énoncés au tableau 1 (paragraphe 23) sont préparées sur des lames transparentes. Les collecteurs peuvent également être achetés auprès de fabricants de lames fonctionnalisées.

40. Les autres paramètres des collecteurs (obtenus dans les conditions décrites ci-dessous) doivent être proches de ce qui suit. L'indice de réfraction doit être d'environ 1.3 (il s'agit non pas de vérifier les propriétés optiques de la couche mais de s'assurer que sa composition chimique est appropriée) et l'épaisseur doit être d'environ 100 nm, ces deux paramètres pouvant être mesurés par ellipsométrie pour les trois collecteurs. Le potentiel ζ des collecteurs à pH = 7 doit être négatif pour la surface hydrophobe (avec revêtement de fluorocarbure) tout comme pour la surface hydrophile à charge négative. Le potentiel ζ de la surface hydrophile à charge positive doit être proche de 0. La stabilité de la surface des collecteurs dans le temps (son niveau d'hydrophobicité) peut être évaluée en mesurant l'angle de contact d'une gouttelette sur chaque surface.

41. Le mode opératoire suivant est l'une des manières possibles de fabriquer les collecteurs en laboratoire en respectant les paramètres énoncés au tableau 1. Il est aussi possible d'utiliser des lames de microscope hydrophobes disponibles dans le commerce ou de les préparer suivant une autre méthode (p. ex., en utilisant l'octadécyltrichlorosilane comme l'ont fait J. X. H. Wong et H-Z Yu, 2013), tant que les surfaces obtenues présentent les propriétés décrites au tableau 1.

42. Pour fabriquer des collecteurs ayant différentes propriétés de surface, il convient de modifier des lames de verre classiques pour microscope en appliquant divers procédés de dépôt. On commence par nettoyer soigneusement trois lames de verre à l'éthanol et à l'eau ultra pure, puis on les sèche à l'azote. On dépose ensuite une couche de fluorocarbure afin de produire une surface hydrophobe (un autre type de revêtement hydrophobe basé sur un précurseur non fluoré peut également être utilisé, par exemple un alkylsilane). Il est possible de réaliser une polymérisation plasma avec de l'octafluorocyclobutane pur (C₄F₈) comme précurseur gazeux à une pression de 3.5 Pa, en appliquant un courant de 142 W pendant 5 min. Une lame est conservée sans autre modification après cette étape de dépôt de fluorocarbure : elle constituera le collecteur purement hydrophobe.

43. Ensuite, dans le but d'ajuster l'hydrophobicité de la surface des lames recouvertes de fluorocarbure (pour les rendre un peu plus hydrophiles), on procède au dépôt couche par couche de deux polyélectrolytes (PE) sur les deux autres lames. Les substrats (lames) modifiés recouverts de fluorocarbure sont trempés pendant 2 min dans une solution de poly(chlorure de diallyldiméthylammonium) (PDDA) à 2 % dans l'eau et dans une solution de polystyrène sulfonate de sodium (PSS) à 2 % dans l'eau, dans une boîte de Petri placée sur un agitateur réglé sur une vitesse modérée. L'autoassemblage de chaque couche de PE commence par le PDDA (chargé positivement) et alterne avec le PSS (chargé négativement). Après chaque étape, le substrat est rincé à l'eau ultra pure et séché à l'azote. Un des substrats est recouvert de 4 couches (PDDA-PSS-PDDA-PSS), l'autre de 5 couches (en ajoutant une dernière couche de PDDA). L'adhésion des couches de PE permet de modifier les composantes de l'énergie libre de surface des collecteurs.

Caractérisation des collecteurs

44. Si l'on recourt à une procédure de préparation différente de celle donnée en exemple, alors il convient de réaliser une caractérisation complète des collecteurs afin de s'assurer que les paramètres adéquats ont bien été obtenus. Si l'on suit la procédure proposée en exemple, il suffit de vérifier l'angle de contact, comme expliqué au tableau 1.

45. Les composantes de l'énergie libre de surface des trois collecteurs peuvent être déterminées en mesurant l'angle de contact des surfaces solides avec une solution polaire (l'eau) et une solution non polaire (le bromonaphtalène). Pour ce faire, on dépose 2 μ L du liquide de test à trois emplacements différents de chaque substrat (en trois répliqués) au moyen d'une microseringue calibrée, puis on calcule la moyenne des neuf mesures obtenues. On mesure l'angle de contact après chaque étape de la procédure de modification de la surface.

46. Les mesures du potentiel ζ des collecteurs peuvent être réalisées à pH = 7 pour vérifier la charge de surface dans les conditions de l'essai (par exemple, en employant la méthode du potentiel spontané décrite par Desmet et al., 2017). Dans le cas des collecteurs produits par le laboratoire à partir de lames de verre classiques, on peut également évaluer les paramètres suivants : par ellipsométrie, l'épaisseur et l'indice de réfraction de chaque couche de revêtement ; et par microscopie à force atomique, la rugosité.