

Traitements de surface pour l'électrophorèse capillaire des protéines

M.-C. Millot, R.J. Xu, B. Sébille et C. Vidal-Madjar

Laboratoire de Recherches sur les Polymères, CNRS - Université Paris XII, 2 rue Henri Dunant, 94320 Thiais, France

The performance of Capillary Electrophoresis applied to the analysis of proteins can be considerably improved by using a pre-treated capillary presenting a permanent hydrophilic layer immobilised on the capillary surface. The protein/surface interactions are then reduced or eliminated, resulting in an increased efficiency of separation. Some difficult analyses become possible, such as the analysis of basic proteins which are irreversibly adsorbed on a silica wall. The use of pre-treated tubes allows to improve the reproducibility of the analyses, as the electroosmotic flow is better controlled in a broader range of pH.

This review examines the various processes used to modify permanently the wall of a silica capillary. Two different approaches are possible: i/ adsorption and immobilisation of a hydrophilic layer.

ii/ covalent bonding of a stationary phase (ligand or macromolecule) having no affinity with the proteins analysed.

Introduction

Les techniques classiques d'électrophorèse sur plaque sont largement utilisées en biochimie et en recherche biomédicale pour l'analyse de routine des biopolymères. Pourtant, divers problèmes liés à la méthode (lenteur, mise en œuvre difficile) empêchent les réelles avancées technologiques. Les récents progrès en électrophorèse capillaire (EC) en font un outil performant d'analyse des protéines, offrant divers avantages tels que rapidité, quantification et automatisation aisées. De plus, l'EC, avec ses différents modes de fonctionnement, permet de mettre en place des stratégies complémentaires pour caractériser l'échantillon biologique [1]. En électrophorèse capillaire de zone (ECZ), les séparations se font en fonction de la charge et de la taille de la protéine ; l'électrophorèse capillaire par isoélectrofocalisation (cIEF) sépare les protéines selon leur point isoélectrique ; l'électrophorèse capillaire sur gel (ECG) en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) permet de déterminer la masse de la protéine à partir de la migration du complexe protéine - SDS.

La séparation des protéines a été réalisée par électrophorèse de zone, pour la première fois, par Jorgenson et Lukacs [2]. Les efficacités théoriques, calculées à partir de la valeur du coefficient de diffusion moléculaire sont supérieures à 10^6 plateaux théoriques par mètre. Ils ont montré qu'en fait, l'adsorption des protéines sur la paroi du capillaire provoque une perte d'efficacité très importante. Cette adsorption indésirable peut être réduite ou éliminée par traitement de la surface du capillaire, en recouvrant la paroi interne par une phase stationnaire hydrophile, immobilisée de façon permanente. Généralement, le dépôt d'un film neutre réduit le flux électroosmotique, en masquant les charges de surface. L'adsorption des protéines à la surface du capillaire est diminuée et la reproductibilité des analyses améliorée. Le film formé après traitement de surface, doit être stable dans les conditions de séparation, car l'utilisation du capillaire est prévue pour des analyses répétitives. La dégradation de la couche au cours d'une analyse conduit à une perte d'efficacité et de résolution, et surtout à un manque de reproductibilité.

Parmi les nombreux procédés proposés pour le traitement des capillaires, on distingue globalement deux approches différentes. L'approche la plus simple à mettre en œuvre consiste à adsorber un polymère hydrophile constitué de groupements neutres ou chargés positivement, capables de masquer ou neutraliser les effets dus aux silanols de surface du capillaire de silice. L'immobilisation du polymère est parfois accompagnée d'une réticulation thermique ou chimique afin de stabiliser le dépôt de polymère. On peut aussi adsorber le polymère sur une surface préalablement traitée par greffage chimique. Dans une deuxième technique très employée, on fixe de façon covalente une phase stationnaire hydrophile qui a peu ou pas d'affinité pour les protéines à séparer. Cette couche immobilisée est constituée dans la plupart des cas de chaînes macromoléculaires greffées ou obtenues par polymérisation *in situ* d'un monomère.

Modification des capillaires par adsorption d'une couche hydrophile

En électrophorèse capillaire, l'adsorption d'un film protecteur hydrophile sur la paroi interne des tubes de silice est probablement la méthode la plus facile à mettre en œuvre pour réduire les interactions entre les protéines analysées et

la surface. Dans la plupart des cas, la désactivation est réalisée par adsorption directe sur la paroi de silice, mais parfois une modification préalable par un silane hydrophobe est effectuée.

Adsorption sur paroi de silice

Le traitement du capillaire par une solution contenant un polymère, capable de s'adsorber irréversiblement à la surface du tube, permet d'obtenir des colonnes bien adaptées à la séparation des protéines par électrophorèse capillaire. En effet, après élimination de l'excédent de polymère, le film adsorbé sur la paroi de silice masque les groupements silanols. Cependant, la stabilité parfois médiocre de la couche ainsi déposée peut nécessiter une étape supplémentaire de réticulation chimique ou thermique.

Ce procédé, utilisé dès 1967 par Hjerten [3] a permis d'éliminer le flux électroosmotique par dépôt sur la paroi des capillaires d'un polymère neutre, la méthylcellulose, puis réticulation à température élevée par le formaldéhyde. Busch et al. [4] ont choisi l'acétate de cellulose pour passer la surface interne des capillaires. Avec les colonnes ainsi modifiées, la séparation de protéines basiques a été effectuée à des valeurs de pH voisines de 4, avec une efficacité pouvant atteindre 10^6 plateaux par mètre. La reproductibilité des dépôts est satisfaisante (moins de 15 % de variation du nombre de plateaux pour 10 colonnes testées). En revanche, la couche d'acétate de cellulose étant instable à $\text{pH} > 7,5$ ce type de colonne ne peut pas être utilisé pour les séparations en milieu basique.

D'autres polymères neutres présentant des interactions fortes avec la silice ont été utilisés pour modifier la surface des tubes. En particulier, Gilges et al. [5] ont rapporté l'emploi de capillaires recouverts d'alcool polyvinylique (APV) modifié thermiquement à $140\text{ }^\circ\text{C}$. Les capillaires ainsi obtenus sont donc recouverts d'une couche permanente d'APV, stable jusqu'à des valeurs de pH égales à 10, et permettent de séparer des mélanges de protéines basiques ou de protéines acides avec une excellente efficacité (Fig. 1).

Les polymères neutres provoquent en général une diminution importante du flux électroosmotique qui peut être un inconvénient quand il s'agit d'analyser des protéines négatives. En 1991, Bentrop et al. [6] ont décrit des capillaires recouverts d'un film mince de polyméthylglutamate qui ne provoquent qu'une réduction modérée du flux électroosmotique.

Des polymères cationiques ont également été utilisés pour modifier la surface interne des capillaires. Ces dépôts ont pour effet de minimiser les interactions entre les protéines basiques et la surface par répulsion électrostatique. Un polymère cationique, la polyéthylèneimine (PEI), a été proposé dès 1990 par Towns et Regnier [7]. Avec de la PEI de masse élevée ($M = 20\ 000\ \text{g mol}^{-1}$) le flux électroosmotique est inversé sur la totalité du domaine de pH considéré ($3 < \text{pH} < 12$) et son intensité varie peu entre $\text{pH} = 8$ et $\text{pH} = 12$. Ces capillaires permettent ainsi la séparation de protéines basiques sur une large gamme de pH. De plus, la stabilité

des dépôts, dans ces conditions d'utilisation, est satisfaisante durant 6 à 7 jours.

Plus récemment, lors d'une étude portant sur l'influence de la nature et de la concentration de l'électrolyte sur la mobilité électrophorétique de trois protéines modèles, Rabiller-Baudry et al. [8] ont comparé des capillaires recouverts de PEI, réticulée par du diglycidoxybisphénol A, et des colonnes de silice vierge. Ils ont montré qu'après quelques injections la paroi des capillaires se saturait en protéines et que la mobilité de celles-ci devenait alors indépendante de la nature chimique du capillaire.

Erim et al. [9] ont proposé un processus d'immobilisation simplifié, utilisant des solutions aqueuses de polyéthylèneimine de masse très élevée. Ces capillaires se sont révélés efficaces pour la séparation des protéines basiques (3 à 5×10^5 plateaux par mètre). De plus, les temps de migration sont reproductibles d'un lot à l'autre et subissent peu de modification au cours du temps.

En conclusion, l'adsorption directe de polymères neutres ou cationiques sur la paroi des capillaires de silice semble être une méthode simple et rapide pour masquer les silanols, ce qui permet dans la plupart des cas de séparer les protéines avec une grande efficacité et une reproductibilité suffisante. Il faut noter qu'une tentative de désactivation des capillaires par une solution de protéine a également été décrite [10]. La méthode consiste à adsorber du fibrinogène sur la paroi de silice et à lui faire subir un traitement thermique, à $70\text{ }^\circ\text{C}$ durant 20 minutes. Les films de protéine ainsi formés, semblent immobilisés irréversiblement et empêchent l'adsorption des protéines. Ce traitement permet de réduire le flux électroosmotique d'environ 30 %, et de le maintenir à une valeur pratiquement constante en cours d'utilisation.

Adsorption sur la paroi modifiée par un silane hydrophobe

Dès 1991, le groupe de Regnier [11] a montré que l'adsorption de surfactants non ioniques linéaires (Tween) ou ramifiés (Brij) sur des capillaires traités par un silane hydrophobe était une méthode intéressante pour rendre la surface biocompatible. La partie hydrosoluble du surfactant semble, en effet, former une couche hydrophile, qui masque le film de silane et les silanols résiduels. Ce traitement se traduit par une réduction du flux électroosmotique, plus importante avec le surfactant ramifié (Brij). Ainsi on peut séparer à $\text{pH} = 7$, des mélanges de protéines acides ou de protéines basiques, démontrant ainsi l'efficacité de la méthode. Cependant, le manque de stabilité du film adsorbé nécessite l'addition de surfactant à l'éluant.

Huang et al. [12] préconisent l'emploi de surfaces rendues hydrophobes par formation de chaînes orientées de polyalkylsiloxanes. Alors que les capillaires obtenus après adsorption de Brij nécessitent, comme précédemment, la percolation en continu de solutions diluées de surfactant pour que les temps de migration soient reproductibles, l'adsorption d'un surfactant macromoléculaire, breveté par

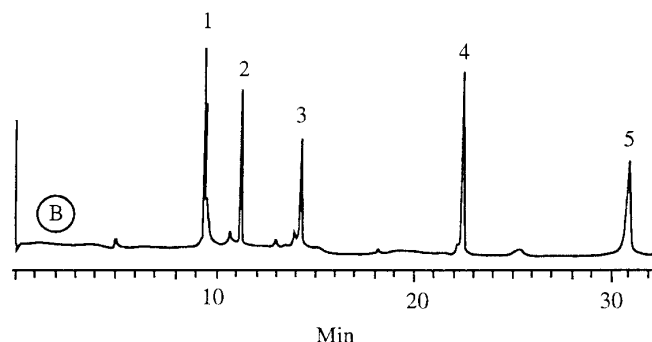
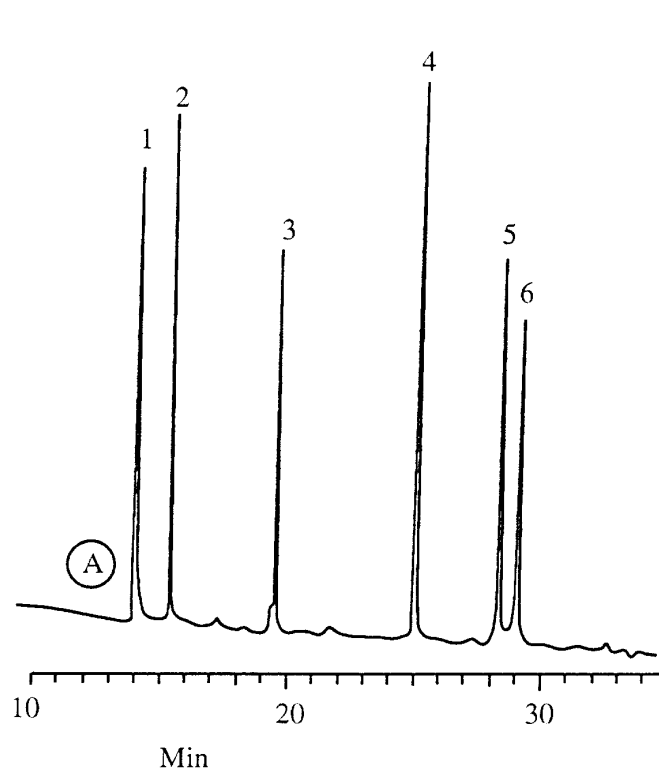


Figure 1. Séparation de protéines basiques à pH = 5,5 (A) et de protéines acides à pH = 10 (B) dans un capillaire recouvert d'alcool polyvinylique. Capillaire : 57 cm de longueur effective, \varnothing int. 50 μ m. Électrophérogramme (A) : échantillon : (1) lysozyme, (2) cytochrome C, (3) trypsine, (4) ribonucléase A, (5) trypsinogène et (6) α -chymotrypsinogène A. Tampon : phosphate de sodium 50 mM, pH 5,5. Conditions : 30 kV (429 V/cm), 33 μ A ; 20 °C ; Injection : 10 kV, 6 s. ; détection : UV, 214 nm. Électrophérogramme (B) : échantillon : (1) pepsine, (2) inhibiteur tryptique, (3) α -lactalbumine, (4) myoglobine et (5) anhydrase carbonique. Tampon : AMP/acide cacodylique 50 mM, pH = 10. Conditions : -35 kV (500 V/cm), 10 μ A ; 20 °C ; injection : 20 kV, 7 s. ; détection : UV, 220 nm. D'après la référence [5], avec la permission de American Chemical Society.

Supelco, conduit à des revêtements présentant une bonne stabilité au cours du temps.

Formation de dépôts minéraux ou de sol-gels sur la paroi

La technique sol-gel utilisée par Engelhardt et al. [13], dans le cas du méthacryloxypropyltriméthoxysilane (MAPS), permet d'obtenir des films présentant une excellente résistance à l'hydrolyse acide et basique. En particulier, des variations minimales du flux électroosmotique ont été observées [14], après traitement de ces capillaires dans des conditions extrêmes de pH (Fig. 2), alors que les tubes de silice modifiés par simple silanisation manquent de stabilité dans des conditions analogues.

La formation de dépôts par la technique sol-gel semble être une méthode rapide et bien adaptée à la séparation des protéines en électrophorèse capillaire.

Modification des capillaires par greffage chimique

Une modification permanente de la surface du capillaire par des composés biocompatibles paraît être la solution la plus séduisante, pour minimiser l'interaction protéine - silice. Les groupements silanols offrent diverses possibilités pour le traitement chimique des capillaires de silice. Ils permettent,

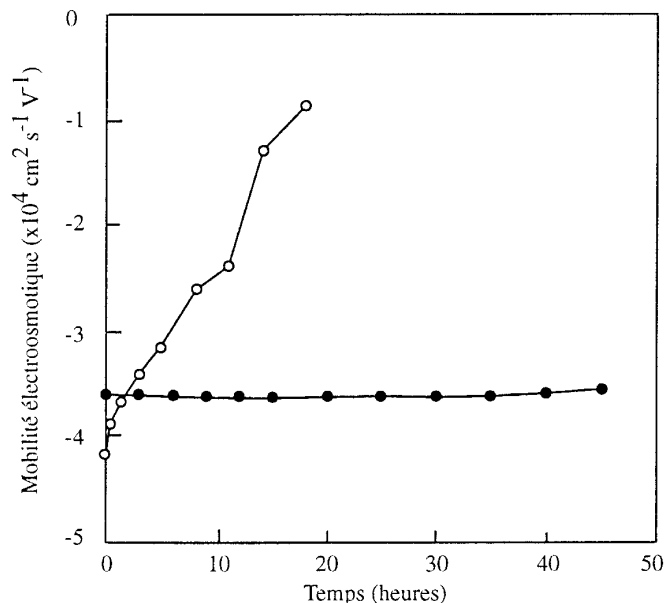


Figure 2. Flux électroosmotique mesuré en fonction du temps d'exposition aux conditions acides. Conditions : Tampon phosphate (20 mM, pH 3,4) + 1 % acide trifluoroacétique. (●) dépôt de gel de silice aminé, (○) tube de silice modifié par silanisation. (\varnothing int. 50 μ m). D'après la référence [14], avec la permission d'Elsevier Science.

en particulier, de greffer sur la paroi des composés ou des polymères hydrophiles, qui réduisent l'adsorption des protéines. Une autre voie, impliquant la polymérisation d'un monomère hydrophile à l'intérieur du tube (polymérisation *in situ*) est également couramment utilisée. Elle conduit à des capillaires, recouverts d'un film de polymère ancré à la paroi, parfaitement adaptés à l'électrophorèse capillaire des protéines.

Greffage d'un composé ou d'un polymère hydrophile

Les premières tentatives de désactivation des capillaires par greffage chimique, font référence à l'emploi de composés hydrophiles de faible masse moléculaire. En particulier, Bruin et al. [15] ont décrit des tubes modifiés par des fonctions diol, obtenus par silanisation de la paroi avec du glycidoxypropyltriméthoxysilane puis hydrolyse acide. Ces colonnes d'une efficacité voisine de 10^5 plateaux par mètre ont permis de séparer des protéines basiques à pH 4, mais la dégradation de la forme des pics aux valeurs de pH supérieures à 5 en limite le domaine d'application. Par la suite, l'efficacité des revêtements protecteurs a pu être améliorée en greffant des films de polymère sur la surface des capillaires. En particulier, du polyoxyéthylène a été fixé sur des tubes de silice modifiés par du glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTS) en solution dans du toluène [16]. Ces colonnes permettent de séparer les protéines en milieu acide mais leur domaine d'utilisation est très restreint ($3 < \text{pH} < 5$), du fait de l'élargissement et de la dissymétrie des pics aux valeurs de pH supérieures à 5. Une modification du processus de greffage des chaînes de polyoxyéthylène (POE) a permis à Nashabeh et El Rassi [17] d'élaborer des capillaires mieux adaptés à l'analyse des protéines.

Une autre voie intéressante [18], consiste à greffer sur la paroi le polyoxyéthylène, polymère neutre et hydrophile, ainsi que des fonctions ammonium quaternaire limitant les interactions entre les protéines positives et la paroi. La présence des charges positives sur la surface provoque une inversion du flux électroosmotique pour des valeurs de pH inférieures à 5,8 et se traduit par un nombre de plateaux élevé (2×10^5 plateaux par mètre).

Un procédé différent dans lequel la surface du capillaire est recouverte d'un film épais de polymère époxy a été introduit par Towns et al. [19]. La méthode utilisée consiste à greffer du GPTS sur la paroi du tube, puis à polymériser, en présence d'un catalyseur, une pellicule de 1,2-diglycidoxyéthane, puis une pellicule de glycidol. La durée de vie des colonnes est supérieure à 120 heures et des protéines acides ou basiques peuvent être séparées à des pH compris entre 5 et 10.

Lee et al. [20,21] ont proposé une méthode originale impliquant une étape unique, durant laquelle la fonctionnalisation de la silice, le greffage et la réticulation du polymère, en présence d'un amorceur de radicaux libres (peroxyde de cumyle), ont lieu simultanément. Des polyéthers, de l'hydroxypropylcellulose et de la polyéthylèneimine ont pu être greffés selon ce principe, conduisant à des colonnes

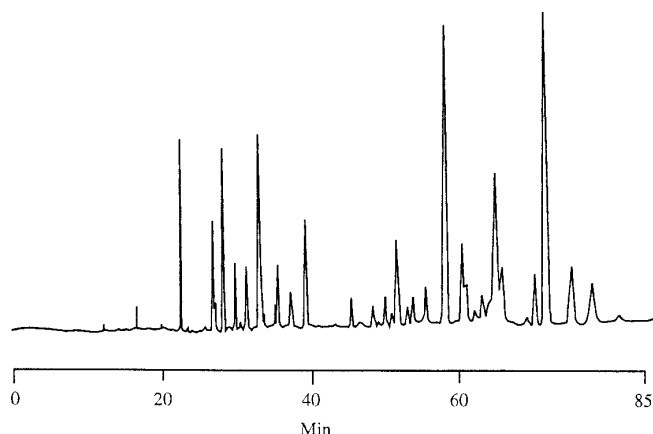


Figure 3. Electrophorogramme de peptides obtenus à partir de la digestion chymotryptique du lysozyme réduit et carboxyméthylé sur un capillaire modifié. Conditions : capillaire (74 cm \times 75 μm \varnothing int.) avec dépôt de Superox 4 ; tampon : Tris-HCl 25 mM, pH 4,8 ; tension : 15 kV ; injection électrocinétique : 2 s à 10 kV. D'après la référence [21], avec la permission de J. Microcol. Sep.

reproductibles, stables et d'une grande efficacité (plus de 10^6 plateaux par mètre, dans certains cas). Ces capillaires ont été utilisés pour séparer non seulement des protéines basiques mais également des fragments peptidiques [21] comme indiqué sur la figure 3.

Polymérisation *in-situ*

Cette méthode en deux étapes, initialement utilisée par Hjerten [22], consiste à greffer sur la paroi du capillaire un composé vinylique ou acrylique, puis à copolymériser un monomère hydrophile, introduit dans le tube, avec les groupements insaturés liés à la paroi. Ce procédé conduit à la formation de couches monomoléculaires de polymère, greffées à la surface du capillaire. Hjerten [22] a ainsi réalisé la polymérisation *in situ*, en milieu aqueux, de l'acrylamide après traitement du capillaire par un silane insaturé, le γ -méthacryloxypropyltriméthoxysilane (MAPS). L'emploi de ce réactif permet de relier le polymère à la paroi du tube par des ponts siloxanes Si-O-Si-C (Fig. 4). Cette modification rend le flux électroosmotique pratiquement nul et conduit à des résultats similaires à ceux obtenus précédemment avec des couches épaisses de méthylcellulose [3].

D'autres polymères ont été greffés *in situ* par l'intermédiaire du MAPS. Ainsi, des capillaires recouverts de polyvinylpyrrolidone [23] ont permis de séparer un mélange de quinze protéines acides et basiques (pI compris entre 4,5 et 11), en moins de 25 minutes, avec une solution d'électrolyte acide (pH = 2) ; les pics obtenus sont fins et symétriques, mais l'utilisation de ces capillaires à des valeurs de pH supérieures à 5 tend à augmenter l'asymétrie des pics. Récemment, Xu et al. [24] ont montré que l'emploi de copolymères de vinylpyrrolidone et de vinylimidazole

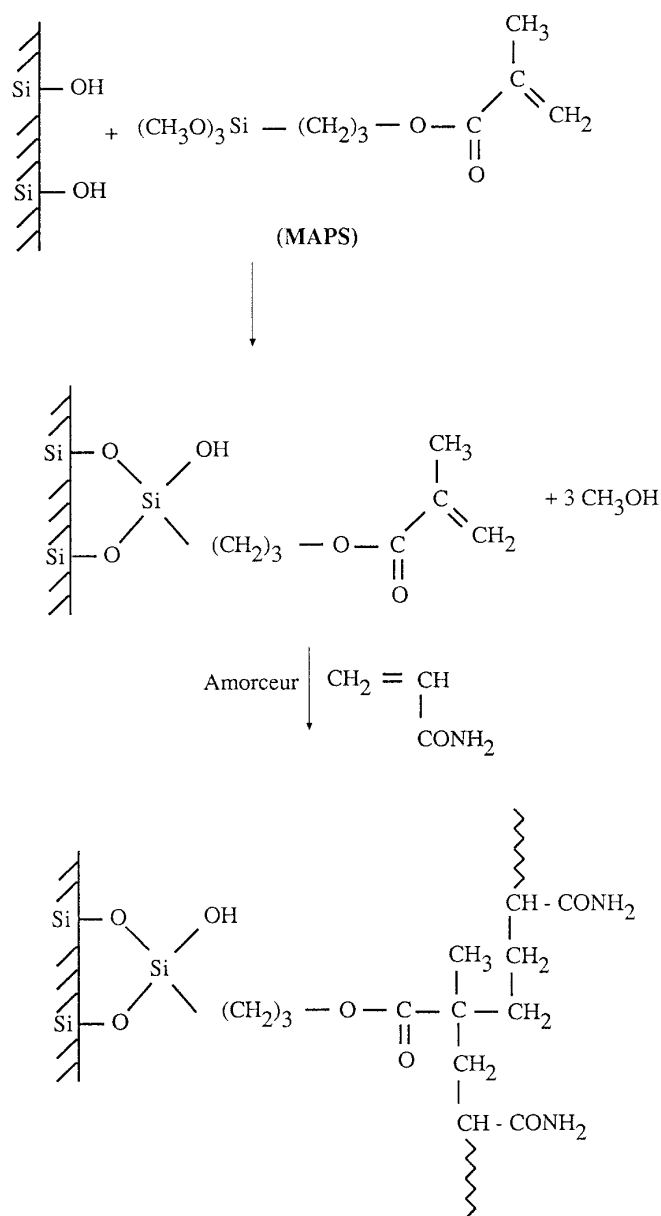
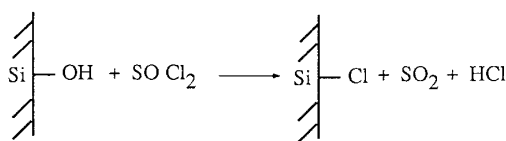


Figure 4. Schéma réactionnel de la formation d'un dépôt de polymère par polymérisation *in-situ* de l'acrylamide.

permettait également une séparation efficace des protéines basiques à pH 5 ; en effet, la présence de charges positives, résultant de la protonation des cycles imidazoles à pH < 7, limite leur adsorption sur la paroi des tubes de silice. Mais la stabilité des dépôts de polymère aux valeurs de pH supérieures ou égales à 7 est réduite.

Huang et al. [25,26] ont montré que la formation à la surface du capillaire de couches orientées d'alcényltriméthoxysilanes générant des films monomoléculaires d'alkylsilane

Etape 1:



Etape 2:

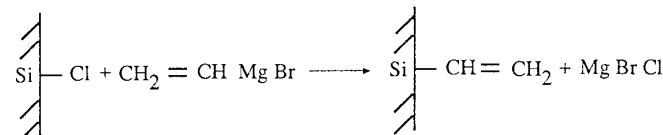


Figure 5. Schéma réactionnel de greffage d'un groupement vinylique via des liaisons Si-C. Selon Cobb et al. [28].

stables en milieu basique, ce qui tend à prouver que les ponts siloxanes sont bien protégés par ce film hydrophobe. Après traitement des capillaires, ainsi modifiés, par du polyacrylamide [25] ou par des copolymères d'hydroxypropylcellulose et de 2-hydroxyéthylméthacrylate réticulés [26], les séparations de protéines réalisées en milieu basique se sont avérées efficaces et reproductibles.

Un procédé original, impliquant le greffage d'un polymère insaturé sur la paroi d'un capillaire par l'intermédiaire de ponts siloxanes, a été proposé par Schmalzing et al. [27]. Il consiste à former une couche de poly(vinylsiloxane) hautement réticulée par réaction du diol correspondant avec les silanols de la paroi. Les fonctions vinyliques du film greffé à la surface sont ensuite utilisées pour polymériser *in situ* de l'acrylamide.

Les méthodes précédemment décrites, basées sur l'utilisation d'un organosilane, conduisent dans certains cas à des revêtements ayant une stabilité médiocre [23,24], attribuée à l'hydrolyse, à pH élevé, des ponts siloxanes reliant le polymère à la paroi de silice. Pour résoudre ce problème, Cobb et al. [28] ont proposé un autre type de modification des silanols permettant de greffer un composé vinylique à la surface du capillaire par l'intermédiaire de liaisons Si-C stables (Fig. 5). La polymérisation *in situ* de l'acrylamide est ensuite réalisée en milieu aqueux par un procédé similaire à celui de Hjerten [22].

Afin d'éviter les problèmes liés au manque de stabilité en milieu basique d'une part des ponts siloxanes, d'autre part des fonctions amides du polyacrylamide, Chiari et al. [29,30] ont greffé à la paroi des revêtements de polyacrylamide *N*-substitué, connus pour être plus résistants à l'hydrolyse, par l'intermédiaire de liaisons Si-C. Il a été montré que ces capillaires, à base de polyacrylamide *N*-substitué,

conduisaient à une amélioration de la reproductibilité des analyses, à pH 8,5, de protéines acides.

En conclusion, la polymérisation *in situ* de monomères hydrophiles dans des tubes de silice modifiés est une méthode simple et efficace. Le manque de stabilité des capillaires, parfois observé aux valeurs élevées de pH, a été attribué par certains auteurs à l'hydrolyse des ponts siloxanes. Cependant, le greffage de chaînes de silane autoassemblées, ou la formation de liaisons Si-C entre la silice et les greffons insaturés, permettent de remédier aux problèmes de stabilité. D'autre part, la résistance du polymère immobilisé à l'hydrolyse et l'homogénéité du film polymérisé sur la paroi sont également des paramètres essentiels.

Conclusion

Bien que l'utilisation de capillaires de silice présente des avantages du fait de leur conductivité thermique élevée et de leur transparence en UV, l'adsorption des biomolécules sur la paroi et le manque de résistance à l'hydrolyse sont des inconvénients majeurs. Les méthodes présentées précédemment permettent en partie d'y remédier mais elles sont parfois longues à mettre en oeuvre.

Depuis quelques années, des capillaires constitués de polymères tendent à se développer. En particulier, l'utilisation de tubes de polypropylène est assez répandue car il s'agit d'un matériau souple, stable aux valeurs extrêmes de pH et transparent dans le domaine du visible et du proche UV. Cependant le caractère hydrophobe de la surface ne permet pas une analyse directe des protéines et nécessite, par exemple, l'addition d'un surfactant non ionique à la phase mobile [31].

Les progrès réalisés dans les procédés de traitement de surface des capillaires de silice ont abouti à la commercialisation de capillaires prétraités, avec modification permanente de la surface de silice. Le tableau I donne une liste de quelques capillaires passivés, commercialement disponibles. Le manque de stabilité des tubes modifiés, ainsi que leur coût prohibitif limitent encore leur usage en EC des protéines. Les capillaires prétraités trouvent des applications dans les divers modes d'EC car ils permettent de réduire l'adsorption des protéines et augmentent les performances de

l'analyse. Leur utilisation s'avère indispensable pour éviter l'adsorption irréversible des protéines basiques sur la paroi du capillaire de silice. En EC de zone des protéines, les capillaires passivés de façon permanente trouvent des applications lors des analyses qui utilisent des tampons sans additifs, ayant une force ionique peu élevée. L'EC par focalisation isoélectrique est souvent utilisée pour séparer les protéines par leur charge et déterminer leur point isoélectrique. Une large gamme de pH est balayée et l'utilisation de capillaires prétraités s'avère indispensable non seulement pour réduire l'adsorption des protéines mais aussi pour éviter les variations importantes du flux électroosmotique.

Références

1. Karger, B. L.; Chu, Y. H.; Foret, F. *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 24, 579-610.
2. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Science* **1983**, 222, 266-272.
3. Hjerten, S. *Chromatogr. Rev.* **1967**, 9, 122-219.
4. Busch, M. H. A.; Kraak, J. C.; Poppe, H. *J. Chromatogr. A* **1995**, 695, 287-296.
5. Gilges, M.; Kleemiss, M. H.; Schomburg, G. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2038-2046.
6. Bentrop, D.; Kohr, J.; Engelhardt, H. *Chromatographia* **1991**, 32, 171-178.
7. Towns, J. K.; Regnier, F. E. *J. Chromatogr.* **1990**, 516, 69-78.
8. Rabiller-Baudry, M.; Bouguen, A.; Lucas, D.; Chaufer, B. *J. Chromatogr. B* **1998**, 706, 23-32.
9. Erim, F. B.; Cifuentes, A.; Poppe, H.; Kraak, J. C. *J. Chromatogr. A* **1995**, 708, 356-361.
10. Van Tassel, P. R.; Miras, D.; Hagege, A.; Leroy, M.; Voegel, J. C.; Schaaf, P. *J. Coll. and Interface Sci.* **1996**, 183, 269-273.
11. Towns, J. K.; Regnier, F. E. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1126-1132.
12. Huang, M.; Mitchell, D.; Bigelow, M. *J. Chromatogr. B* **1996**, 677, 77-84.
13. Engelhardt, H.; Cunat-Walter, M. A. *J. Chromatogr. A* **1995**, 716, 27-33.
14. Guo, Y.; Imahori, G. A.; Colon, L. A. *J. Chromatogr. A* **1996**, 744, 17-29.
15. Bruin, G. J. M.; Huisden, R.; Kraak, J. C.; Poppe, H. *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 339-349.
16. Bruin, G. J. M.; Chang, J. P.; Kuhlman, R. H.; Zegers, K.; Kraak, J. C.; Poppe, H. *J. Chromatogr.* **1989**, 471, 429-436.
17. Nashabeh, W.; El Rassi, Z. *J. Chromatogr.* **1991**, 559, 367-383.
18. Smith, J. T.; El Rassi, Z. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1992**, 15, 573-578.
19. Towns, J. K.; Bao, J.; Regnier, F. E. *J. Chromatogr.* **1992**, 559, 227-237.
20. Malik, A.; Zhao, Z.; Lee, M. L. *J. Microcol. Sep.* **1993**, 5, 119-125.
21. Zhao, Z.; Malik, A.; Lee, M. L. *J. Microcol. Sep.* **1992**, 4, 411-417.
22. Hjerten, S. *J. Chromatogr.* **1985**, 347, 191-198.
23. McCormick, R. M. *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2322-2328.
24. Xu, R. J.; Vidal-Madjar, C.; Sébille, B.; Diez-Masa, J. C. *J. Chromatogr. A* **1996**, 730, 289-295.
25. Huang, M.; Dubrovackova-Schneiderman, E.; Novotny, M. V.; Fatunlbi, H. O.; Wirth, M. J. *J. Microcol. Sep.* **1994**, 6, 571-576.

Tableau I. Capillaires passivés pour l'EC des protéines.

Fabriquant	Technique de passivation
Beckman	Polyacrylamide
Bio-Rad Labs	Polyacrylamide
Hewlett-Packard	Alcool polyvinylique
J & W	Diméthylesiloxane
Supelco	C ₈ ou C ₁₈ greffés

26. Huang, M.; Plocek, J.; Novotny, M.V. *Electrophoresis* **1995**, 16, 396-401.
27. Schmalzing, D.; Piggee, C. A.; Foret, F.; Carrillo, E.; Karger, B. L. *J. Chromatogr. A* **1993**, 652, 149-159.
28. Cobb, K. A.; Dolnik, V.; Novotny, M. V. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2478-2483.
29. Chiari, M.; Nesi, M.; Sandoval, J.E.; Pesek, J. J. *J. Chromatogr. A* **1995**, 717, 1-13.
30. Chiari, M.; Dell'Orto, N.; Gelain, A. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2731-2736.
31. Nielen, M. W. F. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1993**, 16, 62-64.