



HAL
open science

Nouvelles approches pour la quantification et la réduction de l'adsorption de biomolécules en électrophorèse capillaire : capillaires superhydrophobes et multicouches de polyélectrolytes

Charly Renard

► **To cite this version:**

Charly Renard. Nouvelles approches pour la quantification et la réduction de l'adsorption de biomolécules en électrophorèse capillaire : capillaires superhydrophobes et multicouches de polyélectrolytes. Autre. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONT013 . tel-02968874

HAL Id: tel-02968874

<https://theses.hal.science/tel-02968874>

Submitted on 16 Oct 2020

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 L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie Analytique

École doctorale Sciences Chimique Balard

Unité de recherche Institut des Biomolécules Max Mousseron

Nouvelles approches pour la quantification et la réduction de l'adsorption de biomolécules en électrophorèse capillaire : capillaires superhydrophobes et multicouches de polyélectrolytes

Présentée par Charly RENARD

Le 24 janvier 2020

Sous la direction de Hervé COTTET
et Laurent LECLERCQ

Devant le jury composé de

Marianne FILLET, Professeur, Université de Liège

Reine NEHME, Professeur, Université d'Orléans

François COUDERC, Professeur, Université de Toulouse

Hervé COTTET, Professeur, Université de Montpellier

Laurent LECLERCQ, Chargé de Recherche, CNRS

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Co-Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Merci à tous.

Merci à toi, Hervé. Je n'étais certainement pas le thésard idéal pour toi, et malgré nos divergences, nous sommes allés au bout. Même si ta façon de faire ne me correspondait pas toujours, je sais que toutes tes actions et toutes tes pensées n'avaient que pour but d'accomplir le meilleur travail possible. Tu m'as de plus appris à serrer les dents et à résister à la pression. Tu es l'une des personnes qui a eu une influence majeure sur ce que je suis devenu au bout de ces trois dernières années, et je t'en remercie.

Merci à toi, Laurent. Ta douceur et ton éternelle bonne humeur ont été un soutien inestimable. Si tu n'avais pas été là, pour me faire reprendre espoir lorsque c'était nécessaire, je n'aurai peut-être même pas pu aller au bout de cette thèse.

Merci à vous, Nesrine, Phu, Mihai et Camille. Nos discussions au labo ou en dehors m'ont permis de souffler et de me sortir la tête de mes données quand j'en avais besoin. Pour ceux qui ne sont pas encore docteurs, tous mes encouragements. J'espère que vous aurez passé autant de bons moments que moi dans ce labo.

Merci Joseph pour tes conseils parfois caustiques mais toujours bien intentionnés. Merci Philippe pour tes conseils francs et ton humour. Merci Jean-Philippe pour ton aide sur le fonctionnement informatique de la CE. Laurent Boiteau, merci d'avoir toujours pris le temps de m'expliquer dans le détail le fonctionnement du labo et de l'université. Merci Marie-Sophie pour les mille et un coups de main dont j'ai eu besoin pour tous les à-côtés administratifs du travail de thèse.

Un merci tout particulier à vous, Isabelle et Jean-Christophe, de m'avoir permis de diriger des Travaux Pratiques et projets tuteurés aux étudiants de l'IUT. C'était une expérience précieuse, et vous avez su m'expliquer comment être efficace sans angoisser d'encadrer des étudiants. Je n'aurai pu demander mieux comme première expérience d'enseignement.

Enfin, merci à toi, Lucie, qui m'a supporté pendant ces trois années et même plus, pour m'avoir toujours écouté quand j'avais besoin de te confier mes problèmes et mes aspirations pour cette thèse.

Merci à tous. Sans vous, cette thèse n'aurait pas été la même, et, même si elle n'est pas parfaite, je suis content de ce qu'elle est et je suis fier d'en être l'auteur.

Table des matières

Abréviations et symboles	7
INTRODUCTION GENERALE.....	9
Chapitre 1: Etude Bibliographique.....	17
Partie 1 : La superhydrophobie	17
I. La superhydrophobie naturelle.....	17
I.1. Le lotus.....	17
I.2. La peau de requin.....	18
I.3 Autres exemples.....	19
II. Les grandeurs caractéristiques de la superhydrophobie	21
II.1. Les angles	21
II.1.1. Angle de contact θ	22
II.1.2. Hystérésis et angle θ	23
II.2. La rugosité de surface.....	24
II.2.1. Généralités sur la rugosité de surface	24
II.2.2. Rugosité à double échelle et rugosité simili-fractale.....	25
II.2.3. Méthode pour observer la rugosité: microscopie de force atomique (AFM)	26
II.2.4. Méthode pour mesurer l'épaisseur de la couche d'air : ellipsométrie.....	26
II.3. Le glissement de surface.....	27
II.3.1. Longueur de glissement b	27
II.3.2. Les méthodes pour mesurer la longueur de glissement.....	29
II.3.3. Superhydrophobie sans glissement.....	34
III. Le (non-)mouillage d'une surface superhydrophobe	36
III.1. Les modèles de mouillage (Cassie et Wenzel).....	36
III.1.1 Wenzel.....	37

III.1.2 Cassie-Baxter	37
III.1.3. Transition d'un modèle/régime à l'autre: exemple de la vitesse critique d'empalement	37
III.2. Le comportement des nanobulles	39
III.2.1. Influence de la salinité, de la quantité de gaz dissous et du champ électrique sur les caractéristiques des bulles.....	41
III.2.2. Caractéristiques de la couche de gaz et état métastable	43
IV. Elaboration d'une surface superhydrophobe.....	44
IV.1 Dépôt de nanoparticules.....	45
IV.1.1. Colloïdes de silice modifiée	45
IV.1.2. Nanotubes de carbone	46
IV.2. Lithographie	47
IV.3. Combinaison de plusieurs méthodes.....	47
IV.4. Le Glaco™	50
V. Exemple de matériaux aux surfaces superhydrophobes	52
VI. Comportement électrocinétique de surfaces superhydrophobes	61
VI.1. Modélisations de l'effet de glissement sur l'écoulement électroosmotique	61
VI.2. Applications électrocinétiques de surfaces superhydrophobes	63
Partie 2 : Les revêtements SMIL.....	66
I. Principe d'un revêtement SMIL.....	66
II. Historique et exemple d'applications des SMIL en CE.....	68
II.1. Séparations en CE et CE/MS.....	68
II.2. Stabilisation de l'écoulement électroosmotique et répétabilité/reproductibilité.	71
III. Paramètres d'optimisation des SMIL	74
III.1. Nature du couple de polyélectrolytes	75
III.2. Tampon de construction	79

III.3. Concentration des solutions de polyélectrolytes	82
III.4. Nombre de couches	83
III.5. Epaisseur du revêtement SMIL	84
III.6. Force ionique du tampon de séparation.....	85
III.7. pH du tampon de séparation.....	89
III.8. Temps de rinçage du capillaire.....	89
III.9. Stabilisation après greffage	89
III.10. Temps d'attente après greffage	90
III.11. Conditions de stockage et de régénération	90
Chapitre 2 : Superhydrophobic capillary coatings elaboration, characterization and application to electrophoretic separations	102
I. Introduction	104
II. Experimental section.....	107
II.1. Chemicals and samples.....	107
II.2. Glaco™ coating	107
II.3. Surface characterization methods	108
II.3.1 Contact Angle (CA).....	108
II.3.2 Ellipsometry.....	108
II.3.3 Atomic Force Measurement	108
II.3.4 Dynamic Light Scattering (DLS)	109
II.3.5 Scanning Electron Microscopy (SEM).....	109
II.3.6 Optical Microscopy	109
II.3.7. C4D profiling of the Glaco™ coated capillary	109
II.3.8. Hydrodynamic behavior: Poiseuille law.....	110
II.3.9. Capillary electrophoresis	111
III. Results and discussion.....	111

III.1. Superhydrophobic glass blade.....	111
III.3. Hydrodynamic behavior.....	117
III.4. Electrokinetic Behavior of SHS coated capillaries	120
IV. Conclusion.....	123
Supporting Information of chapter 2: Superhydrophobic capillary coatings: elaboration, characterization and application to electrophoretic separations.....	128
SI-1. Observation of the air layer on a glaco-coated glass blade immersed in water	129
SI-2. Conductivity profiles along the capillary for a 50 µm Glaco™ coated capillaries and for bare silica capillaries of different internal diameters.....	129
SI-3. Poiseuille law on Glaco™ coated capillaries of 50 µm and 100 µm internal diameter	130
SI-4. Evolution of the water/air interface inside a 100 µm I.D. Glaco™ coated capillary	131
Complément chapitre 2: Etude d'autres types de revêtements superhydrophobes pour les séparations en électrophorèse capillaire	132
I.Introduction.....	132
II. Material and methods.....	133
II.1. Chemicals	133
II.2. Coatings with R805 or R805 and PLA mixtures	133
II.3. Hydrodynamic behavior	134
Chapitre 3 : Generation and characterization of air microbubbles in highly hydrophobic capillaries	148
I. Introduction	148
II. Materials and methods.....	150
II.1. Chemicals	150
II.2. Glaco™ coated capillaries.....	151
II.3. Capillary electrophoresis	152
III. Results and discussion.....	152

III.1. Highlighting the generation of air bubbles during electrophoresis on a Glaco™ coated capillary	153
III.2. Electrophoretic mobility and zeta potential of air bubbles.....	154
III.3. Air bubble dimensions	157
III.4. Influence of the applied separation voltage on the bubble formation and characteristics	160
IV. Conclusion.....	163
Supporting Information of Chapter 3: Generation and characterization of air microbubbles in highly hydrophobic capillaries	166
SI-1. Bubble generation reproducibility	166
SI-2. Required parameters for bubble generation: influence of the DMF concentration and nature of the neutral marker	167
Chapitre 4 : Quantification of protein adsorption in Capillary Electrophoresis	170
I. Introduction	174
II. Materials and methods.....	177
II.1. Chemicals	177
II.2. SMIL coatings	177
II.3. Capillary electrophoresis	178
III. Theoretical part	179
III.1. Influence of adsorption on separation efficiency in CE.....	179
III.2. Determining the retention factor by varying the separation voltage.....	181
III.3. Influence of the capillary length on the theoretical plate number.....	181
III.4. Influence of the capillary I.D. on the theoretical plate number.....	182
IV. Results and discussion.....	183
IV.1. Determination of protein retention factor on SMIL coatings by varying the separation voltage	183
IV.2. Influence of the capillary internal diameter	186

IV.3. Influence of the capillary length	190
IV.4. Comparison and ranking of different SMIL coatings and fused silica capillary	191
IV.5. Optimization of the separation efficiency	191
V. Conclusion	195
Supporting information of Chapter 4 : Quantification of protein adsorption in Capillary	
Electrophoresis	199
SI-1. Study of different capillary Internal Diameters	200
1.1. 25 μm I.D. PB-PMA SMIL coated capillary	200
1.2. 75 μm I.D. PB-PMA SMIL coated capillary	201
SI-2. Ohm law study.....	202
SI-3. Study of different capillary lengths on a 50 μm I.D. PB-PMA SMIL coated capillary	203
SI-4. Study of different capillary coatings	204
4.1. 50 μm I.D. PB-PLC SMIL capillary coating	204
4.2. 50 μm I.D. fused silica capillary	206
SI-5. Optimized separations	208
CONCLUSION GENERALE	212

Abréviations et symboles

POLYMERES :

DEAED: Diéthylaminoéthyl dextrane

DS: Sulfate de dextrane

HA: Acide hyaluronique

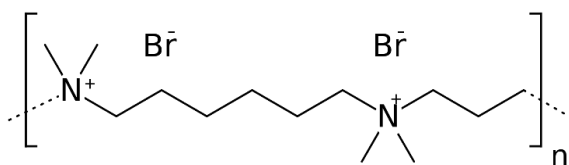
PAA: Poly(acide acrylique)

PAAM: Poly(allylamine)

PAM : Poly(acrylamide)

Paa_xamy: copolymère d'acide acrylique (x%) et d'acrylamide (y%),

PB: Polybrène



PDADMA: poly(diallyl dimethyl ammonium)

PDMAEMA: poly(diméthylaminoéthyl méthacrylate)

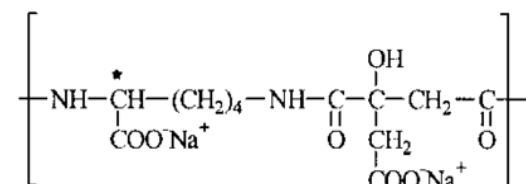
Pei: polyéthylèneimine

PEO : oxyde de polyéthylène

Pglu: poly(acide L-glutamique)

PLA : Poly(acide lactique)

PLC: Poly(L-Lysine citramide)



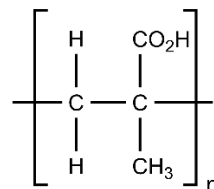
εPLL: epsilon poly(L-Lysine)

PLys: α poly(L-Lysine)

P(Lys_xTyr_y): polypeptide avec x % d'unités lysine et y % d'unités tyrosine

P(Lys_xSer_y): polypeptide avec x% d'unités lysine et y% d'unités sérine

PMA: Poly(acide méthacrylique)



PMMA : poly (méthyl-méthacrylate)

PSS: Poly(styrène sulfonate) de sodium

PVA Polyacétate de vinyle

PVS: Poly(acide vinylsulfonique)

PROTEINES & PEPTIDES :

B-lac : β -lactoglobuline

Lys : Lysozyme

Myo : Myoglobine

RNase A : ribonuclease A

TI : Inhibiteur de Trypsin

SYMBOLES :

b : longueur de glissement

CA : Angle de Contact

θ_a : angle d'avancée

θ_r : angle de reculée

r_{pv} : rugosité du pic à la vallée

r_a : rugosité moyenne

TECHNIQUES :

AFM : Microscopie de Force Atomique

C4D : Détecteur Conductimétrique à
Couplage sans Contact

CE : électrophorèse capillaire

CZE : électrophorèse capillaire de zone

DLS : Diffusion dynamique de la Lumière

ESI : électrospray

MEKC : chromatographie micellaire
électrocinétique

MS : Spectrométrie de Masse

(μ)PIV : Vélocimétrie par Imagerie de
(micro)particules

SEM : Microscopie Electronique à
Balayage

SFA : Appareillage de mesure des Forces
de Surface

SH : Superhydrophobe

SMIL : multicouches de polyélectrolytes

TIRF : Fluorimétrie par Réflexion Interne
Totale

TOF : Time of Flight (détecteur de MS)

PRODUITS CHIMIQUES :

17FTMS : heptadecafluoro-1,1,2,2-
tetrahydrodecyl trimethoxysilane

OTS : Octadecyltrichlorosilane

PDMS : poly(dimethyl siloxane)

TEOS : tetraethylortho silicate

AUTRES ABREVIATIONS :

EOF : écoulement électroosmotique

I.D. : diamètre interne

INTRODUCTION GENERALE

L'électrophorèse capillaire (CE) est une méthode analytique reconnue pour sa flexibilité dans les modes de séparations accessibles, sa rapidité, sa faible consommation d'échantillons, et ses performances séparatives. Couplée à la spectrométrie de masse (MS), elle offre une alternative complémentaire aux méthodes chromatographiques pour l'analyse d'échantillons complexes, tels que les protéines. L'analyse des protéines est un domaine majeur de la chimie analytique, notamment dans la pharmacologie et le domaine biomédical, par exemple pour l'élaboration de nouveaux médicaments contre le cancer constitués d'anticorps monoclonaux, ou le diagnostic des maladies par l'analyse protéomiques, métabolomiques ou de biomarqueurs spécifiques.

L'objectif général de cette thèse est d'étudier différentes stratégies de greffage de capillaires afin d'optimiser les performances séparatives (notamment l'efficacité de séparation) de la CE pour l'analyse de protéines. En effet, il est connu que les efficacités de séparation obtenue en pratique pour les protéines, bien que relativement élevées par rapport aux méthodes chromatographiques, sont en dessous des valeurs théoriques en considérant uniquement la diffusion moléculaire comme source de dispersion. Bien que les raisons expliquant cet écart observé en pratique soient encore discutées, l'adsorption des solutés restent souvent la cause principale de cette baisse de performances séparatives. Deux approches principales sont étudiées dans cette thèse. D'une part, il est étudié la possibilité de réduire l'adsorption des solutés en limitant leur interaction avec la surface du capillaire par l'utilisation de greffages superhydrophobes (SH). A notre connaissance, la superhydrophobie n'a jamais été utilisée dans le cadre de séparations électrophorétiques, les travaux s'en rapprochant le plus étant ceux de Wirth *et al.*[1] qui ont travaillé sur l'utilisation du glissement en chromatographie liquide, provoqué par l'utilisation de canaux extrêmement fins et hydrophobes. Par la suite, les greffages de capillaire basés sur des multicouches de polyélectrolytes (SMIL) ont été étudiés dans le but de caractériser et d'étudier les interactions résiduelles de surface pouvant limiter l'efficacité de séparation des protéines. Ces études ont été réalisées dans des conditions analytiques compatibles avec un couplage CE/MS (électrolyte volatil).

Le premier chapitre de cette thèse présente une étude bibliographique. La première partie traite des greffages SH, en définissant l'état de superhydrophobie, tel qu'il peut être observé dans la nature, puis en introduisant les grandeurs permettant de caractériser une surface SH. Les phénomènes induits par la superhydrophobie tels que le glissement de surface ou la non mouillabilité sont ensuite exposés. Enfin, les méthodes de fabrication, de caractérisation de la superhydrophobie sont présentées. La seconde partie bibliographique traite des greffages SMIL

en expliquant leur principe, puis en développant les nombreux paramètres expérimentaux qui peuvent avoir une influence sur leurs performances séparatives en CE.

Le deuxième chapitre de cette thèse propose une méthode expérimentale d'élaboration d'un greffage SH dans un capillaire pour son utilisation en CE. Une solution commerciale de nanoparticules de silice hydrophobisées dispersées dans l'isopropanol (Glaco™) a été utilisée. L'optimisation du protocole de greffage pour obtenir un revêtement de capillaire superhydrophobe est présentée, ainsi que les différentes méthodes de caractérisation utilisées (mesure de l'angle de contact, ellipsométrie, microscopie de force atomique (AFM), diffusion dynamique de la lumière (DLS), microscopie électronique à balayage (SEM), microscopie optique, profilage par détecteur conductimétrique à couplage sans contact (C4D), visualisation du ménisque, comportement hydrodynamique) pour évaluer la superhydrophobie du revêtement sur une surface plane et dans un capillaire (lorsque cela a été possible). Les capillaires SH ont ensuite été utilisés pour la séparation de peptides modèles, en comparant les efficacités de séparation avec celles obtenues dans les mêmes conditions sur un capillaire de silice vierge.

Un complément au Chapitre 2 est ensuite fourni sous la forme de tests comparatifs de greffages SH réalisés avec des nanoparticules de silice greffées hydrophobes (R805) seules ou en mélange avec un polymère filmogène (polyacide lactique, PLA). L'intérêt scientifique de ce complément est de pouvoir mieux contrôler la formulation de la solution/suspension de greffage (choix du solvant utilisé dans la suspension de nanoparticules, concentration en nanoparticules, ajout possible de polymère filmogène).

Le troisième chapitre s'intéresse à un phénomène mis en évidence lors du premier chapitre: la génération de bulles d'air dans les capillaires SH. Ce phénomène, bien que n'ayant pas d'application directe pour la réalisation de séparations électrophorétiques, revêt un intérêt dans de nombreux autres domaines, notamment pour la compartimentation ou le transport en microfluidique. Ces bulles ont été caractérisées (charge de surface, mobilité électrophorétique, dimensions) et les paramètres nécessaires (tension appliquée, rayonnement UV, revêtement SH d'une densité particulière, surfactant spécifique) à leur génération dans les capillaires SH ont été étudiés.

Le quatrième chapitre concerne l'étude des interactions résiduelles des protéines à la surface de capillaires greffés (ou non). L'influence de la tension appliquée, de la longueur du capillaire, et du diamètre interne du capillaire sur les performances séparatives d'un capillaire greffé SMIL a été étudiée. L'adsorption sur le capillaire a été déterminée expérimentale via le calcul du

facteur de rétention k , dans le cadre de la théorie de l'électrochromatographie. Ce point est important car il permet de quantifier l'adsorption résiduelle, et par conséquent, d'estimer la qualité du revêtement dans des conditions analytiques données. Des séparations de protéines modèles en milieu acide ont ensuite été optimisées en prenant en compte l'adsorption résiduelle, menant parfois à des résultats de conditions optimales qui sont contre-intuitifs par rapport aux habitudes de la CE.

Une conclusion générale avec quelques perspectives termine ces travaux de thèse.

Bibliographie :

- [1] B. Wei, B.J. Rogers, M.J. Wirth, Slip flow in colloidal crystals for ultraefficient chromatography, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 10780–10782.
doi:10.1021/ja304177m.

Chapitre 1:
Etude Bibliographique

Chapitre 1: Etude Bibliographique

Partie 1 : La superhydrophobie

Une surface dite « superhydrophobe » est une surface qui, par sa nature chimique et sa structure, présente une interaction de très faible énergie avec une solution aqueuse. L'état de superhydrophobie est généralement obtenu lorsque deux conditions sont réunies [1]:

- La nature chimique de la surface, et plus particulièrement sa polarité, doit être de nature hydrophobe. Mais cette hydrophobie ne suffit pas à elle seule à conduire à des matériaux superhydrophobes.
- La seconde condition pour obtenir une surface superhydrophobe concerne la structure/géométrie de surface du matériau. Il est nécessaire d'avoir une microstructuration ou une nanostructuration de surface pour engendrer une superhydrophobie. La rugosité de surface, l'échelle de ces aspérités, mais aussi la forme (plots, billes, pores...) sont des paramètres importants qui permettent de contrôler la superhydrophobie.

L'effet superhydrophobe tient à ce qu'une goutte d'eau, posée sur une telle surface, ne va pas « pénétrer » la surface, mais reposer sur les sommets des aspérités (pointes des plots, haut de la bille, rebord des pores). On observe généralement l'apparition d'un film d'air entre les micro- ou nano- aspérités et la goutte d'eau. L'eau ne présente, par conséquent, qu'une surface de contact très limitée avec le matériau, et n'a que très peu d'interactions avec la surface: c'est cela qui caractérise la superhydrophobie.

I. La superhydrophobie naturelle

La superhydrophobie confère aux surfaces naturellement présentes dans la nature un certain nombre de propriétés utiles pour le monde animal ou végétal. Les exemples sont nombreux, du lotus autonettoyant aux ailes de papillon évitant l'alourdissement par la rosée.

I.1. Le lotus

L'exemple le plus célèbre de superhydrophobie naturelle est celui de « l'effet lotus », caractérisé par Barthlott et al. en 1997 [2]. Les feuilles de lotus sont couvertes de picots

micrométriques, eux-mêmes recouverts d'une couche nanométrique de cire végétale hydrophobe (Figure 1). Cette surface permet peu de liaisons hydrogène, car elle est rendue apolaire par la cire. Par ailleurs, sa rugosité fait qu'une goutte d'eau déposée sur cette surface repose essentiellement sur de l'air. De cette façon, la goutte d'eau ne gagne que très peu d'énergie en s'adsorbant sur cette surface, par rapport à l'énergie que lui coûterait l'augmentation de sa surface de contact en cas de mouillage (étalement de la goutte). Par conséquent, la goutte reste sphérique. En revanche, les particules déposées sur la feuille, telles que des poussières ou des microorganismes, sont plutôt hydrophiles. En glissant/roulant sur la feuille de lotus, l'eau peut « coller » et entraîner ces particules, nettoyant ainsi la feuille de lotus. Ce nettoyage est rendu efficace par le fait que les particules posées sur la feuille sont plus grosses que la structuration de la surface de la feuille. Elles reposent, par conséquent, au sommet des micro et nano plots, ce qui les rend facile à évacuer.

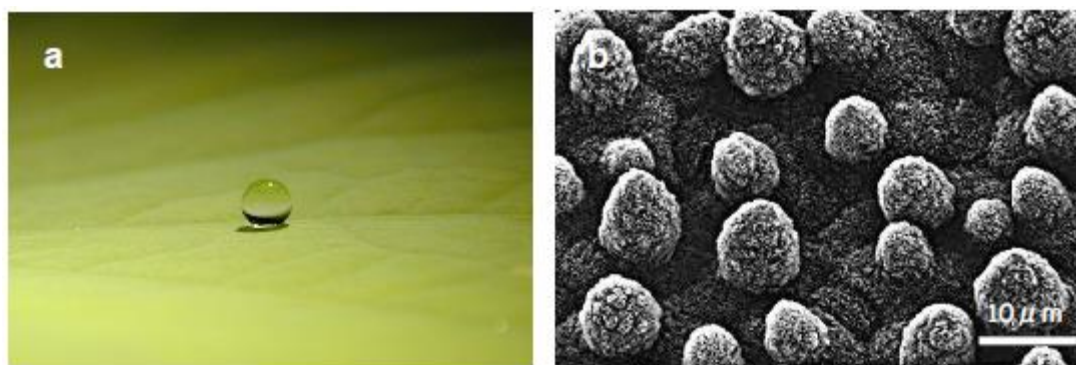


Figure 1: Goutte d'eau millimétrique posée sur une feuille de lotus (a); Image MEB de la surface d'une feuille de lotus (b). Adapté de W. Barthlott et al. [2].

I.2. La peau de requin

Une autre application de la superhydrophobie largement répandue dans la nature consiste à réduire les frottements de l'eau. Ainsi, la peau de requin, étudiée par Y. Jung and B. Bhushan [3], permet à son porteur de nager de manière plus efficace dans l'eau en limitant le dépôt de microorganismes parasites sur sa surface. Cette peau est recouverte de « denticules dermiques », des petites écailles de peau en forme de dents présentant des stries dans le sens de la nage (Figure 2), qui éliminent les turbulences engendrées par le déplacement dans l'eau.

L'orientation des micro-écailles joue un grand rôle sur l'effet superhydrophobe de la peau de requin. Leur alignement contrôlé dans le sens de la nage est crucial pour obtenir une diminution du frottement. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le requin ne peut nager que vers l'avant.

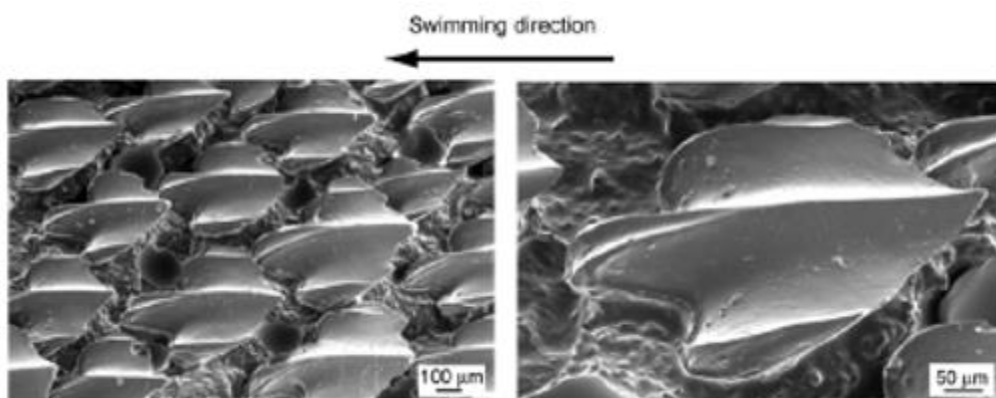


Figure 2: Images SEM de la peau de requin (*Squalus acanthias*) à différents grossissements. Adapté de Y. Jung, et al. [3].

I.3 Autres exemples

Une multitude d'autres exemples de superhydrophobie existent dans la nature, avec des spécificités qui sont propres aux besoins de l'organisme présentant ce revêtement superhydrophobe [4,5]. On peut notamment citer:

- Le gérédié (araignée d'eau) et ses pattes couvertes de micropoils striés de nano-rainures lui permettant de « marcher sur l'eau » [6], comme le montre la Figure 3.
- Le gecko aux pattes striées de façon à ce que l'humidité ne puisse s'y déposer afin qu'il puisse adhérer à toutes les surfaces et grimper sur un mur lisse [7], comme le montre la Figure 4.
- Le moustique aux yeux recouverts de microsphères, elles-mêmes recouvertes de nano-sphères empêchant l'eau de se déposer sur ses yeux, tout en les laissant transparents [8], comme le montre la Figure 5.

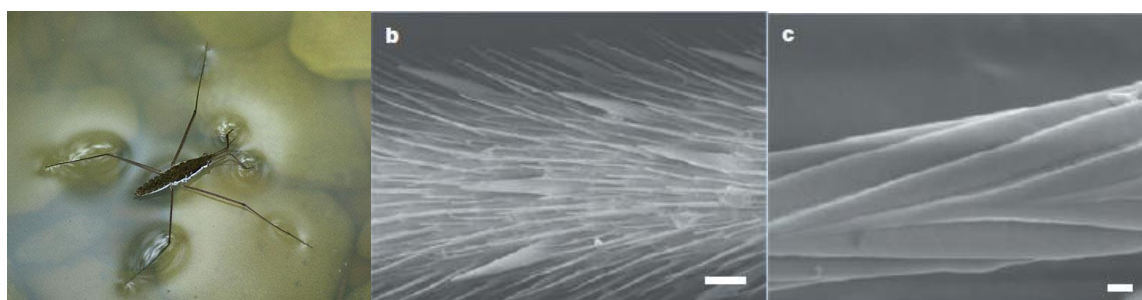


Figure 3: Structure des pattes de l'araignée d'eau. Vue générale (a) et images MEB d'une patte à différentes échelles 20 μm (b) et 200 nm (c). Adapté de X. Gao et al. [6].

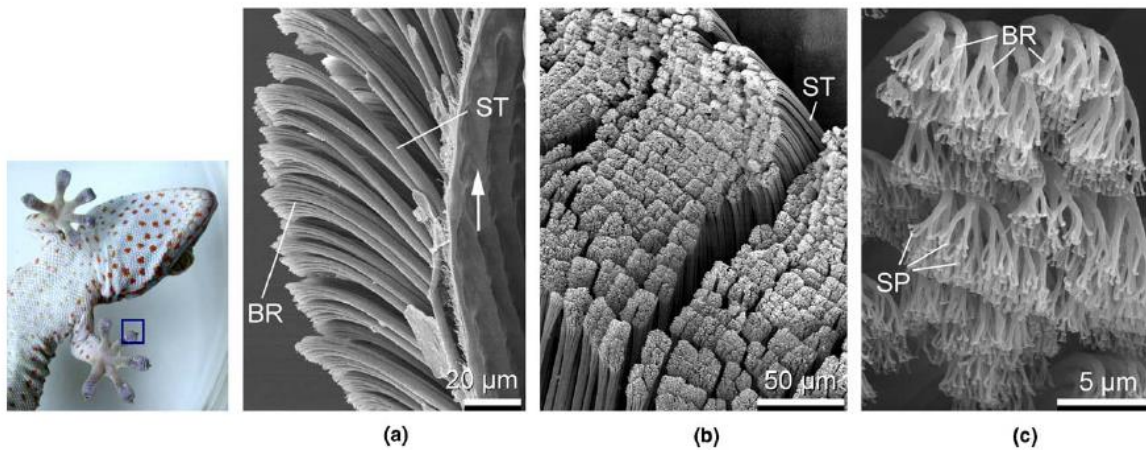


Figure 4: Structure hiérarchique des pattes du gecko. Image MEB des lamelles (BR: branch) constituant les pattes du gecko sous deux angles différents (a) et (b). Ces branches sont constituées de setae (ST) eux-mêmes constitués de spatulae (c). Adapté de H. Gao et al. [7].

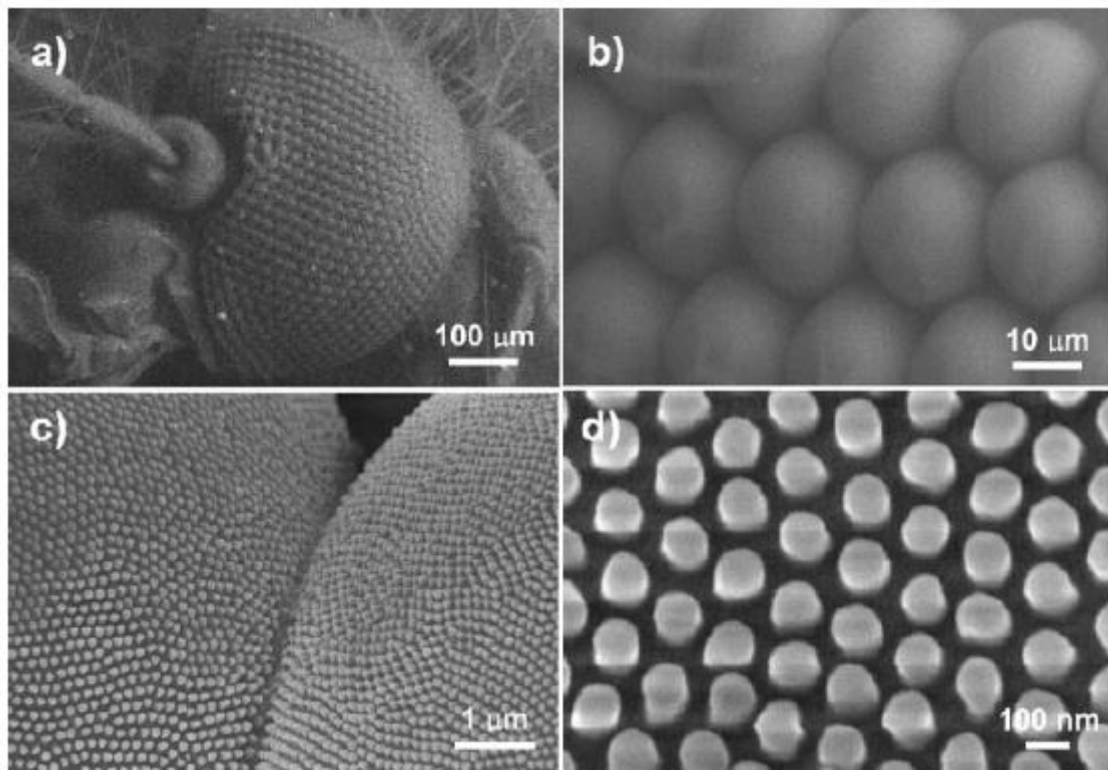


Figure 5: Image MEB d'un œil de moustique sur une échelle de 100 μm (a), 10 μm (b), 1 μm (c) et 100 nm (d). Adapté de X. Gao et al. [8].

Ces surfaces ont de nombreuses applications potentielles (autonettoyant, antigivre, antibruine, anticorrosion, antibactérien, imperméabilisant, purifiant, flottant...), dites « bioinspirées » [9]

II. Les grandeurs caractéristiques de la superhydrophobie

II.1. Les angles

Un fluide adopte toujours la forme la plus stable, c'est-à-dire celle de moindre énergie. Dans le cas d'une goutte (d'assez faible volume pour que l'effet de la gravité puisse être considéré comme négligeable) dans l'air, cela consiste à minimiser son énergie de surface, en adoptant une forme sphérique, qui est la géométrie permettant la plus petite surface de contact avec le milieu extérieur. Si la goutte est déposée sur une surface, un équilibre se crée entre l'optimisation de la surface d'échange vis-à-vis de l'air et l'économie d'énergie engendrée par l'adsorption sur un support [2,10]. Dans le cas de l'eau, ce sont les liaisons hydrogène entre les molécules d'eau (à l'origine de sa tension de surface élevée) qui représentent la force de cohésion poussant la goutte à adopter une forme sphérique. Si la goutte d'eau est posée sur un support ne permettant pas la formation de liaisons hydrogène (support apolaire), elle reste en cohésion avec elle-même et la calotte formée n'est pas très étalée sur le support. En revanche, si le support est polaire, l'eau peut créer des liaisons hydrogène avec lui et les molécules d'eau peuvent se désolidariser les unes des autres pour se lier aux molécules du support. La goutte se déforme et adopte une forme de calotte aplatie, de plus grande surface qu'une sphère (énergie de surface supérieure), mais avec une adsorption sur la surface du support. La déformation est d'autant plus forte et la calotte d'autant plus aplatie sur le support que le liquide a une affinité avec le support solide. Cette déformation est donnée par la loi de Young-Dupré [11]:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad (1)$$

où les différents γ (γ_{SV} , γ_{SL} et γ_{LV}) sont, respectivement, les tensions superficielles aux interfaces Solide/Vapeur, Solide/Liquide et Liquide/Vapeur, et où θ est l'angle entre l'interface Solide/Liquide et l'interface Liquide/Vapeur, appelé angle de contact (Figure 6).

A noter que la tension de surface (ou tension superficielle) d'une interface est l'énergie requise pour créer cette interface. Dans le cas de l'eau, cette tension superficielle est d'environ 72 N.m^{-1} (ou J.m^{-2} , c'est littéralement l'énergie qu'il faut pour avoir un mètre carré d'interface) à 25°C . A noter que la tension superficielle diminue lorsque la température augmente.

II.1.1. Angle de contact θ

L'angle de contact (CA) θ entre la surface solide et l'interface liquide/air du côté liquide est représenté à la Figure 6. Plus il est élevé, moins la goutte a d'interaction avec la surface solide, et plus la surface est hydrophobe (surface de contact plus faible). Une surface est dite:

- mouillante (Figure 6a) si $\theta = 0^\circ$
- hydrophile (Figure 6b) si $0^\circ < \theta < 90^\circ$
- hydrophobe (Figure 6c) si $120^\circ > \theta > 90^\circ$
- superhydrophobe (Figure 6d) si $\theta > 120^\circ$. L'angle de contact θ constitue une première façon de définir une surface superhydrophobe.

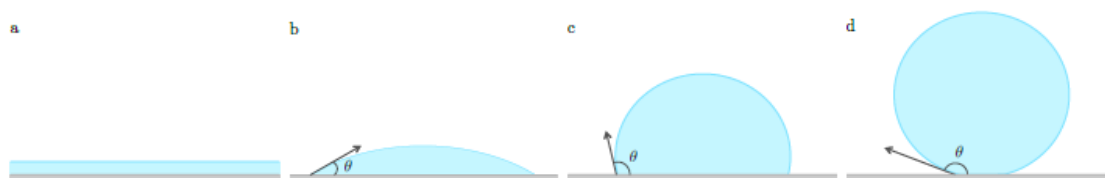


Figure 6: Différents valeurs d'angle θ selon la mouillabilité de la surface. Surface totalement mouillante (a), surface hydrophile (b), surface hydrophobe (c), surface superhydrophobe (d). Adapté de [12].

Plus une goutte présente un angle θ élevé, plus elle a tendance à rouler sur la surface (super)hydrophobe plutôt que de glisser [2]. Les angles θ , ainsi que l'hystérésis (différence entre l'angle de contact θ à l'avant d'une goutte et l'angle de contact θ à l'arrière de la même goutte lorsque celle-ci se déplace sur une paroi, voir section II.1.2.) qui en découle (voir section II.1.2.), sont généralement mesurés par goniométrie: la goutte est observée de côté à un fort grossissement, et, à partir de l'image obtenue (Figure 7), l'angle désiré est mesuré.

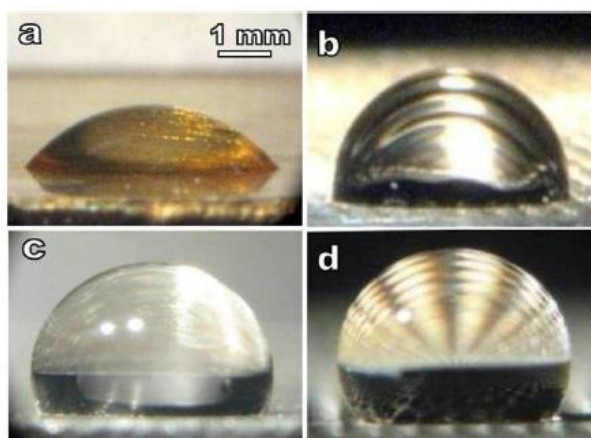


Figure 7: Photographies d'une goutte d'eau posée sur une surface de cuivre lisse (a), une surface de cuivre texturée de petits trous (b), une surface hydrophobe lisse (c), et une surface hydrophobe texturée (d). Adapté de D. Dilip et al. [13].

II.1.2. Hystérésis et angle θ

En général, on ne se contente pas simplement de mesurer un seul des angles θ sur une goutte. En pratique, une goutte présente deux angles θ , selon le « bord » considéré. En effet, une goutte est dissymétrique si elle se déplace sur une surface inclinée d'un angle α par rapport à l'horizontal. Par conséquent, on mesure deux angles: l'angle avant/d'avancée (θ_a , le plus grand) et l'angle arrière/de reculée (θ_r , le plus petit), comme le montre la Figure 8. La différence entre ces deux angles est appelée hystérésis:

$$\text{hystérésis} = \theta_a - \theta_r \quad (2)$$

L'hystérésis donne une indication sur le fait que la goutte va couler ou rouler sur le plan incliné. Une hystérésis faible indique que l'angle d'avancée et l'angle de reculée ont des valeurs proches, ce qui signifie que la goutte reste ronde, et qu'elle aura tendance à rouler. Une hystérésis importante indique que l'angle d'avancée et l'angle de reculée ont des valeurs très différentes, ce qui signifie que la goutte se déforme et aura tendance à couler sur la surface.

On note α l'angle de la surface sur laquelle repose une goutte, à partir duquel la goutte se déplace sur la surface dans le sens de la pente (Figure 8). Cet angle reflète la force de liaison entre la goutte et la surface. Plus cet angle est faible, moins la goutte est liée à son support. A noter qu'une goutte avec un faible angle d'inclinaison a tendance à rouler plutôt qu'à couler sur la surface. A l'inverse, une goutte avec un grand angle d'inclinaison a généralement tendance à couler/glisser et à laisser une traînée derrière elle.

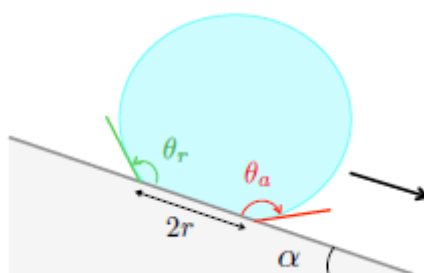


Figure 8: Schéma d'une goutte sur une pente avec l'angle α d'inclinaison de la surface, à partir duquel la goutte avance. θ_r est l'angle de contact de reculée, θ_a est l'angle de contact d'avancée, et r est le rayon du cercle de contact entre la goutte et la surface [12].

II.2. La rugosité de surface

II.2.1. Généralités sur la rugosité de surface

Différents paramètres peuvent être utilisés pour définir la rugosité d'une surface. On utilise notamment la « rugosité du pic à la vallée » (*peak-to-valley roughness*), la rugosité moyenne, et la racine carrée de la rugosité. La rugosité du pic à la vallée (r_{pv}) est calculée comme la différence entre la cote (altitude) du pic et celle de la vallée, sur un axe normal au plan de la surface. Cette valeur est radicalement influencée par la moindre rayure et/ou la moindre protubérance présente sur la surface. De plus, on mesure souvent des minima et maxima locaux. Il est par conséquent préférable d'utiliser la rugosité moyenne (r_a), définie comme la moyenne de l'altitude z sur la surface, selon l'équation (3):

$$r_a = \frac{1}{l} \int_0^l |z(x)| dx \quad (3)$$

La rugosité altère le comportement des liquides au contact de la surface, puisqu'elle influe directement sur la surface d'interaction à l'interface. En théorie, la présence de pics sur la surface offre une résistance à l'écoulement du fluide. Cependant, les points de vallée permettent un meilleur drainage du fluide. Dans les faits, la manière dont a été préparée la surface, et donc les caractéristiques propres à sa rugosité, vont définir l'effet de la rugosité sur l'écoulement du fluide à la surface. La rugosité a un impact très fort sur l'hydrophobie d'une surface, comme cela est illustré par l'expérience de Dettre et Johnson (1964) présentée à la Figure 9 [14]. Les auteurs ont démontré que l'augmentation de la rugosité à partir d'une surface lisse mène tout d'abord à une augmentation de l'hystérésis avec formation d'une « traînée » derrière la goutte (celle-ci étant retenue par les aspérités). A partir d'une certaine rugosité, la goutte d'eau ne pénètre plus les aspérités et repose à leur sommet: on passe de l'état de Wenzel à celui de Cassie-Baxter (voir section III.1). L'angle de reculée augmente drastiquement et rattrape l'angle d'avancée, ce qui donne une hystérésis très faible, signe annonciateur de la superhydrophobie (Figure 9).

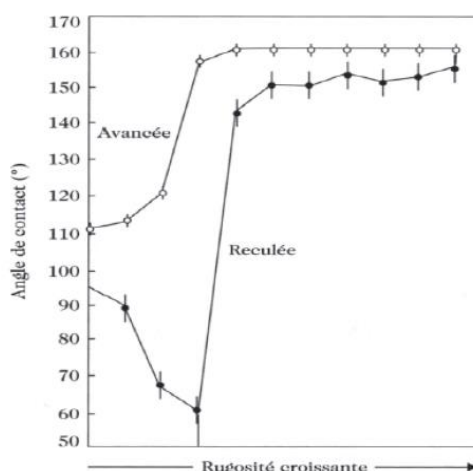


Figure 9: Courbe représentative des angles d’avancée et de reculée en fonction de la rugosité de la surface. Adapté de Dettre et al. [14].

II.2.2. Rugosité à double échelle et rugosité simili-fractale

La rugosité à double-échelle est couramment rencontrée dans le cas des surfaces superhydrophobes. Il s’agit d’une rugosité à l’échelle micrométrique présentant d’autres aspérités à l’échelle nanométrique (Figure 10). Cette structure exacerbe l’hydrophobie de la surface et augmente l’angle de contact d’une goutte d’eau. La goutte d’eau ne repose plus sur le sommet de quelques aspérités micrométriques mais sur les sommets de quelques aspérités nanométriques. Cela minimise la surface d’interaction entre l’eau et la surface solide.

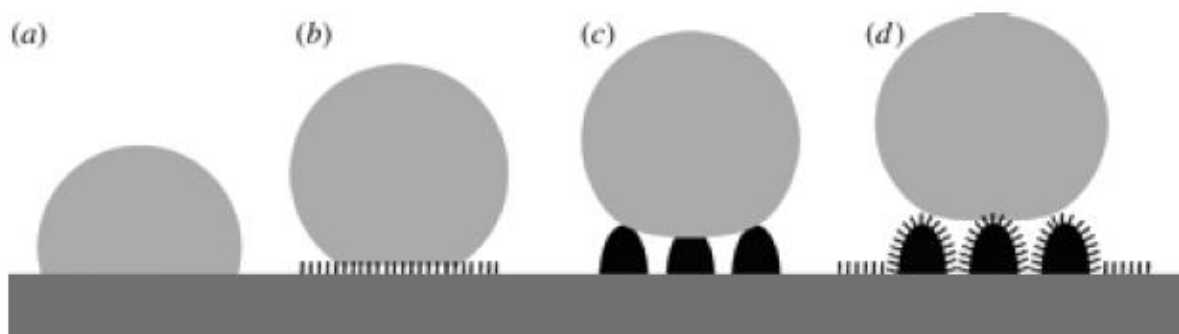


Figure 10: Schéma de l’évolution de la superhydrophobie en fonction de l’échelle de la rugosité. a. surface lisse, b. surface à rugosité nanométrique, c. surface à rugosité micrométrique, d. surface à rugosité à double échelle. Adapté de [15].

Le cas particulier de la rugosité dite « simili-fractale » permet une plus grande superhydrophobie que la rugosité à double-échelle « classique », car cela augmente la valeur de l’angle de contact, sans pour autant augmenter le glissement à la surface [16]. Cette augmentation de l’angle de contact est due au fait que la rugosité simili-fractale n’est pas « simplement » à double échelle, mais à trois niveaux, voire davantage. Cela peut se rencontrer,

par exemple, avec une surface recouverte de plots d'une dizaine de micromètres, eux-mêmes recouverts de plots à l'échelle du micromètre, eux-mêmes recouverts de plots de quelques dizaines de nanomètres, eux-mêmes couverts de plots d'un nanomètre.

II.2.3. Méthode pour observer la rugosité: microscopie de force atomique (AFM)

Un microscope de force atomique (AFM) consiste en un cantilever muni d'une pointe très fine qui balaye une surface (Figure 11). Lorsque la pointe est positionnée suffisamment près de la surface, les forces d'attraction font dévier le cantilever vers la surface. Alors que la pointe est attirée jusqu'à toucher la surface, les forces de répulsion surpassent celles d'attraction, et la pointe est rejetée. Le cantilever est rejeté de la surface. C'est cette oscillation qui est mesurée et qui permet de déterminer le relief de la surface. Cette méthode est utilisée pour observer une surface, la profondeur des aspérités et/ou la géométrie des bulles présentes et/ou la topographie de la surface.

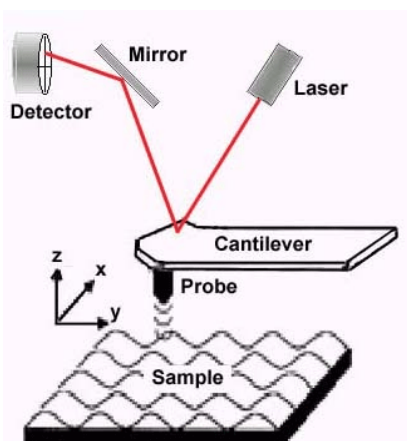


Figure 11: Schéma d'un microscope de force atomique au-dessus d'une surface rugueuse. La sonde (probe) balaie la surface, et chaque changement d'altitude va faire bouger le cantilever, et donc induire un changement de l'angle de réflexion du laser.

II.2.4. Méthode pour mesurer l'épaisseur de la couche d'air : ellipsométrie.

L'un des intérêts de la SH est l'apparition de micro ou nanobulles d'air entre une surface SH et une phase aqueuse. Ces bulles d'air formant un tapis à l'interface liquide/solide, permettant une diminution de la surface de contact (et donc une diminution des interactions possibles) entre les deux. La mesure de l'épaisseur de cette couche d'air peut être réalisée par ellipsométrie. L'ellipsométrie est une méthode de mesure des couches minces sur une surface plane reposant sur la mesure du changement d'état de polarisation de la lumière. En connaissant les indices de réfractions des couches traversées, il est possible de mesurer l'écart de polarisation entre un

rayon lumineux réfléchi à l'interface eau-air et un rayon issu du même faisceau polarisé mais qui lui a traversé la couche d'air et est réfléchi à l'interface air-solide (le solide étant par exemple du verre). Cet écart de polarisation permet de calculer l'épaisseur de la couche d'air.

II.3. Le glissement de surface

II.3.1. Longueur de glissement b

En mécanique des fluides classique, tant que les échelles étudiées sont macroscopiques, les conduits étudiés sont considérés sans glissement. C'est-à-dire que les molécules du fluide directement en contact avec la paroi du conduit sont considérées comme immobiles. C'est l'une des conditions limites permettant de représenter le profil d'écoulement du fluide selon la loi de Poiseuille:

$$u(z) = -\frac{R^2 dP}{2\eta dx} \left[1 - \frac{z^2}{R^2} \right] \quad (4)$$

où la vitesse à la distance (altitude) z de la paroi, $u(z)$, dépend du rayon du capillaire R (R est la plus haute valeur de z possible), η la viscosité du fluide, P la pression, et x la distance selon l'axe longitudinal du tube.

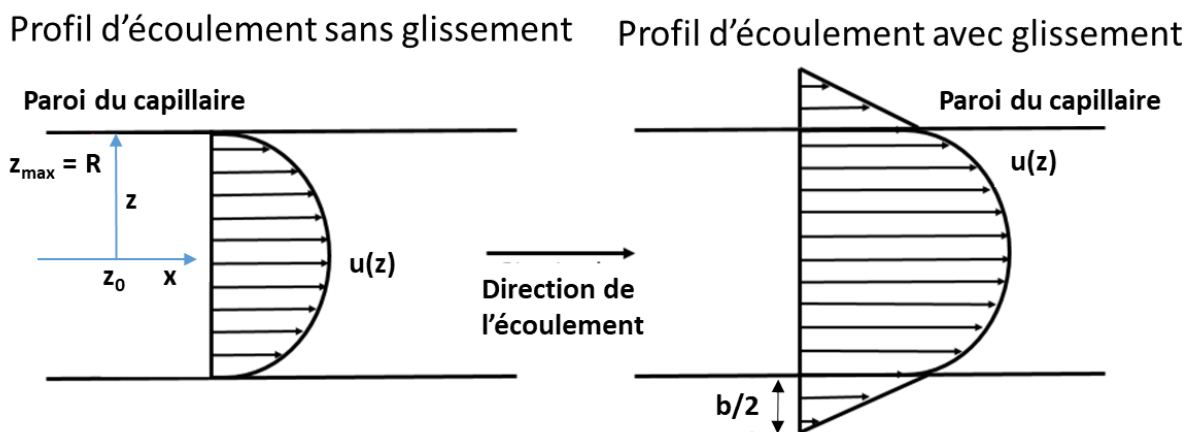


Figure 12: Schéma du profil de Poiseuille d'un fluide sans (à gauche) et avec glissement (à droite). La longueur de glissement b caractérise l'importance du glissement à l'interface solide/liquide. Les flèches représentent les vecteurs vitesse et la direction de l'écoulement. Adapté de Y.C. Jung et al. [3].

Dans certains cas, un glissement peut être observé à la surface du conduit. Ce glissement peut varier selon la nature du fluide et des parois [17,18]. L'absence d'interaction entre le fluide et la surface est le facteur clé à l'origine de ce phénomène. Ainsi, les capillaires (super)hydrophobes canalisant de l'eau présentent un plus fort glissement que les capillaires hydrophiles. Afin de caractériser le glissement, la longueur de glissement, notée b , exprimée la

plupart du temps en nanomètres et parfois en micromètres, correspond à la distance au-delà de la surface solide à laquelle la vitesse tangentielle du fluide s'extrapole à une valeur nulle (Figure 12) [3]. Plus la longueur de glissement est grande, plus le glissement est important, et plus le capillaire ou le canal considéré est superhydrophobe (dans le cas où le liquide étudié est une phase aqueuse). Il a par ailleurs été montré par Truesdell et al. [19] que la longueur de glissement ne dépend pas de la pression de cisaillement (c'est-à-dire la pression exercée par le fluide sur les parois du capillaire, perpendiculaire à la pression ordinairement appliquée à l'entrée du capillaire), du moins tant que cette pression n'est pas assez forte pour affecter le mouillage de la surface (voir vitesse critique d'empalement – section III.1.3).

En considérant que la longueur de glissement ne dépend que de la nature du fluide et des parois, il est possible d'approximer une équation reliant l'angle de contact d'une goutte de ce fluide sur une surface et la longueur de glissement (Figure 13).

$$b = -(1 + \cos \theta)^{-2} \quad (5)$$

où b est la longueur de glissement en nm, et θ est l'angle de contact en degrés.

Cette formule reste approximative et ne pourra que servir à donner une idée grossière de la longueur de glissement attendue dans un capillaire avec un revêtement dont on connaît l'angle de contact. Mais il faudra recourir à des méthodes expérimentales pour déterminer plus précisément la longueur de glissement.

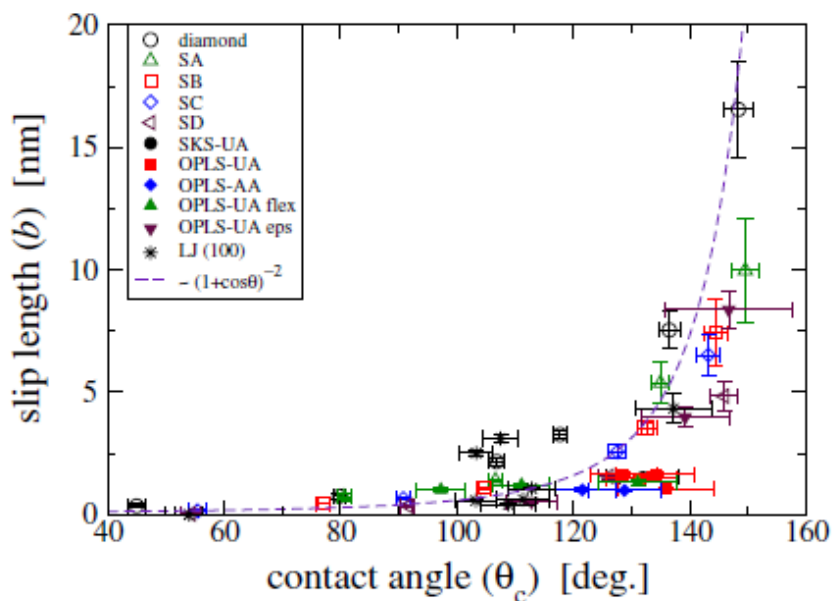


Figure 13: Longueur de glissement b selon l'angle de contact de différentes surfaces étudiées, et approximation de l'équation de la courbe empiriquement tracée ainsi. SA, SB, SC, SD: différentes

surfaces de diamant rendues rugueuses ; SKS et OPLS: surfaces issues des travaux de Smit, Karabomi et Siepman, AA (all atoms) ou UA (United Atoms) ; LJ: surface issue des travaux de Lennard-Jones. Adapté de D.M. Huang, et al. [20]. Voir la référence bibliographique EPAPS Document No. E-PRLTAO-101-025849 pour les détails de la simulation et plus d'informations sur la nature des surfaces. Voir également le site <http://www.aip.org/pubservs/epaps.html>

II.3.2. Les méthodes pour mesurer la longueur de glissement

Il existe de nombreuses méthodes différentes, reposant sur des principes physiques différents (flu X, viscosité, force atomique...), pour mesurer la longueur de glissement [21]. Mais la plupart sont assez spécifiques ou difficiles à appliquer pour certaines géométries. Par exemple les méthodes reposant sur un faisceau lumineux, peu adaptées à une surface non-plane comme la paroi d'un capillaire cylindrique, ou les méthodes intrusives qui nécessitent de pouvoir introduire la sonde dans un capillaire micrométrique, dépendent de paramètres difficiles à contrôler et impliquant une forte incertitude sur la mesure. Néanmoins certaines méthodes permettent une mesure satisfaisante tout en étant relativement simples à mettre en place.

-Vélocimétrie par Imagerie de Microparticules

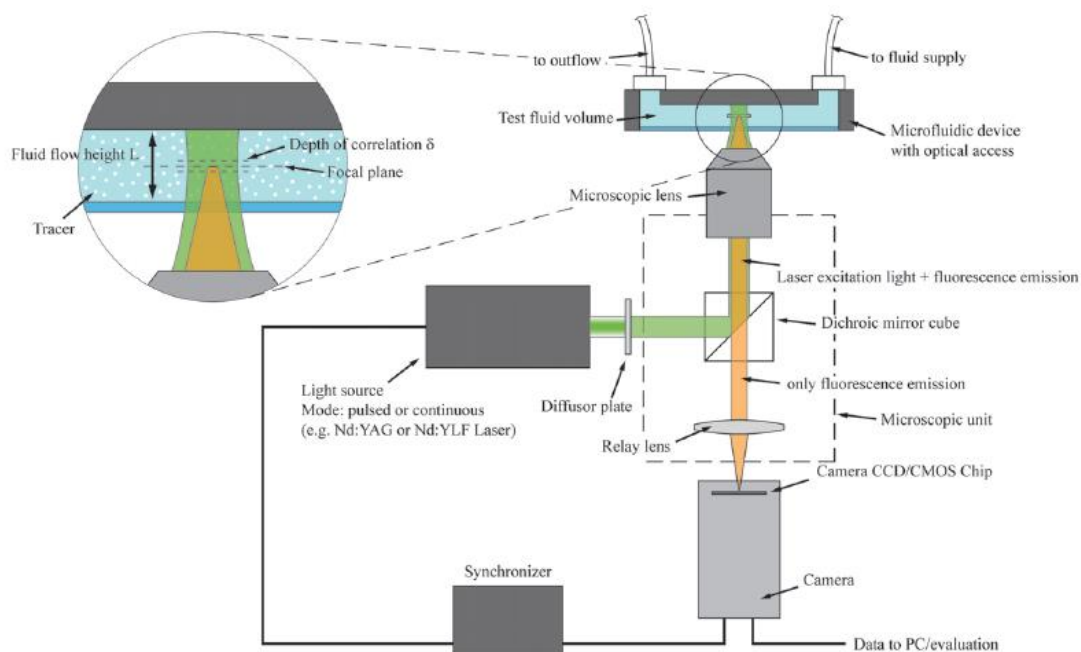


Figure 14: Schéma décrivant le principe d'un μ PIV. Adapté de R. Lindken et al. [22].

La vélocimétrie par imagerie de microparticules (μ PIV) fonctionne sur le même principe que le PIV, mais elle est appliquée à une grande échelle (échelle micrométrique au lieu de nanométrique, Figure 14). On mesure la vitesse d'une particule en prenant plusieurs images à intervalles de temps réguliers, et en mesurant la distance de déplacement de la particule dans l'intervalle de temps considéré. La vélocimétrie est faite par microscopie optique sur des

particules considérées comme se déplaçant dans un plan. Selon le microscope utilisé, la région scannée en μPIV varie de $1 \times 1 \text{ mm}^2$ à $50 \times 50 \text{ mm}^2$.

-Fluorimétrie par réflexion interne totale (TIRF):

Le principe de la fluorimétrie par réflexion interne totale (TIRF) est similaire à celui du PIV, cependant les particules observées sont fluorescentes et sont excitées par un faisceau de lumière à la longueur d'onde adéquate et focalisé à l'interface solide-liquide. Les particules les plus excitées sont celles situées à l'interface. Plus elles en sont éloignées (plus leur « altitude » sera élevée), moins elles émettent de lumière (Figure 15). Il est ainsi possible de mesurer la distance à la surface de ces particules selon leur intensité lumineuse, et ensuite comme pour le PIV, de calculer la distance parcourue dans un intervalle de temps donné pour avoir leur vitesse. Il est possible de retracer le profil de la vitesse des particules selon leur distance à la surface, et par conséquent, de tracer leur écoulement de Poiseuille, et de calculer la longueur de glissement de ce couple liquide/solide.

Cette méthode largement utilisée ne permet cependant pas une mesure précise de la longueur de glissement à cause de différents phénomènes limitant la précision des mesures sur la vitesse des particules, tels que le mouvement brownien. On obtient généralement des longueurs de glissement avec une incertitude de + ou - 30 nm, ce qui peut être significatif (surtout si l'on est en présence d'une longueur de glissement de quelques dizaines de nanomètres) [23,24].

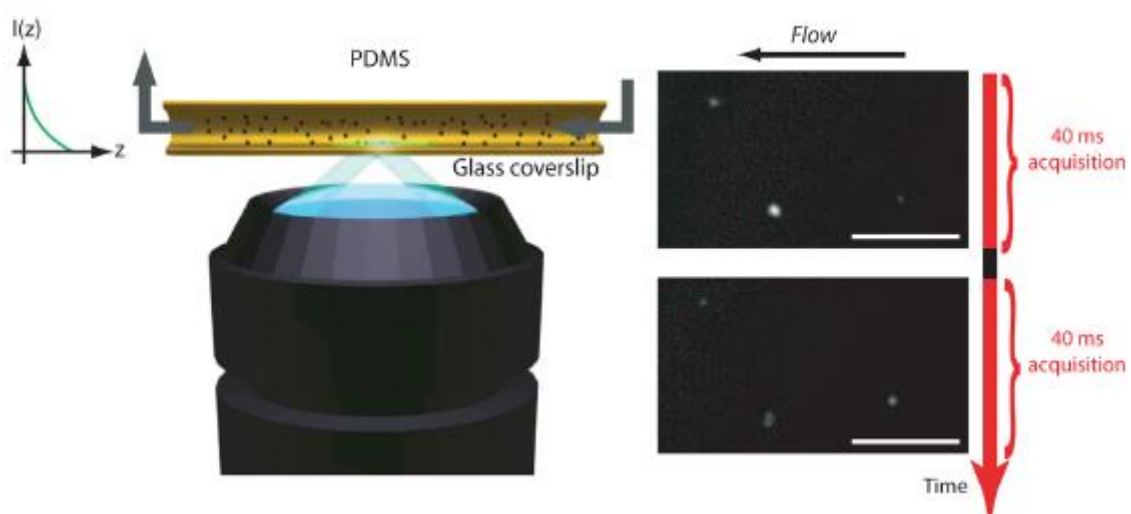


Figure 15: Schéma du Fluorimètre à Réflexion Interne Totale (à gauche). Un laser est collimaté à travers un objectif grand angle avec un angle d'incidence plus grand que l'angle de réflexion totale. L'onde évanescente créée dans le canal ne permet qu'aux particules situées contre la paroi du canal de

s'illuminer. Images consécutives obtenues par TIRF (à droite). Les deux images sont séparées de 5 ms.
Adapté de C.I. Bouzigues et al. [25].

-Appareillage de mesure des forces de surface (SFA):

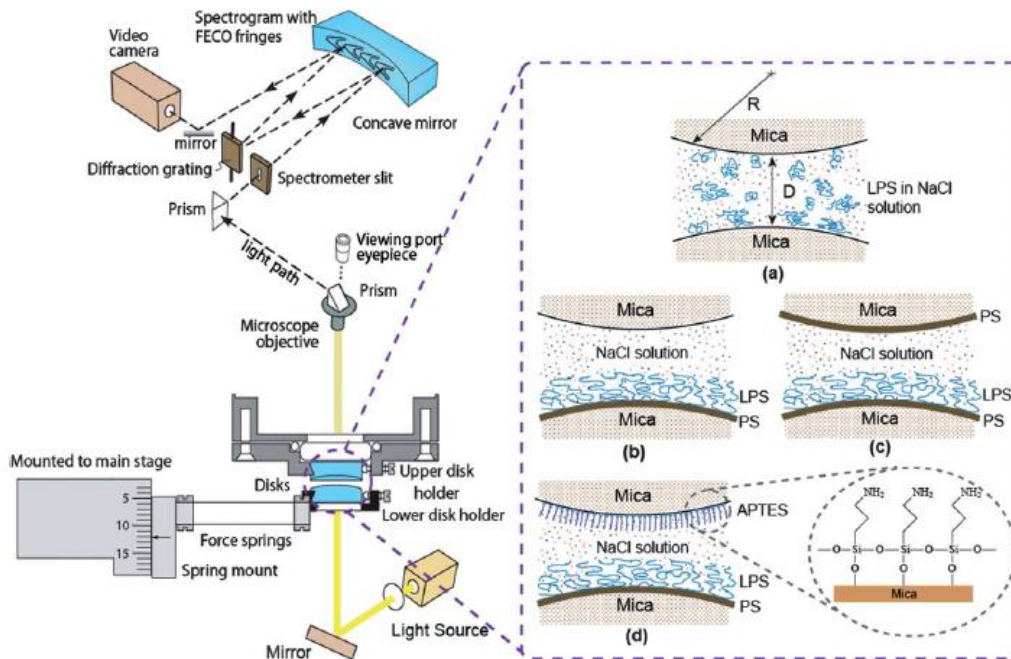


Figure 16: Schéma du SFA pour l'étude de différentes surfaces. L'inset montre les différentes configurations pouvant être adaptées aux deux disques de mesure. Adapté de Q. Lu et al. [26].

Dérivé de l'AFM, la mesure des forces de surface (SFA) consiste en une sphère placée très près d'une surface statique. Entre ces deux surfaces, dont l'une ou l'autre (ou les deux) peuvent être modifiées pour être superhydrophobe, le liquide à étudier est placé (Figure 16). En mesurant la force hydrodynamique exercée sur la surface statique lorsque la sphère est déplacée le long de celle-ci (on la fait osciller à une fréquence choisie), la longueur de glissement est déterminée. Cette méthode permet une très bonne précision sur la mesure de la longueur de glissement (± 2 nm), mais ne peut être utilisée que sur une surface ouverte, et pas dans un capillaire ou un microcanal [27].

-Mesure du débit:

En géométrie plane 2D correspondant à une coupe longitudinale d'un capillaire, la vitesse dans le sens de l'axe du capillaire selon la distance par rapport au centre est exprimée ainsi:

$$u(z) = -\frac{R^2 dP}{2\eta dx} \left[1 - \frac{z^2}{R^2} + \frac{2b}{R} \right] \quad (6)$$

où R est le rayon du capillaire, η est la viscosité, P est la pression et b est la longueur de glissement. Le facteur -1 est dû au fait que la différence de pression est dans la direction inverse

de la vitesse [28] (Figure 17). Il s'agit simplement de l'équation de Poiseuille (Equation (4)) corrigée pour tenir compte du glissement.

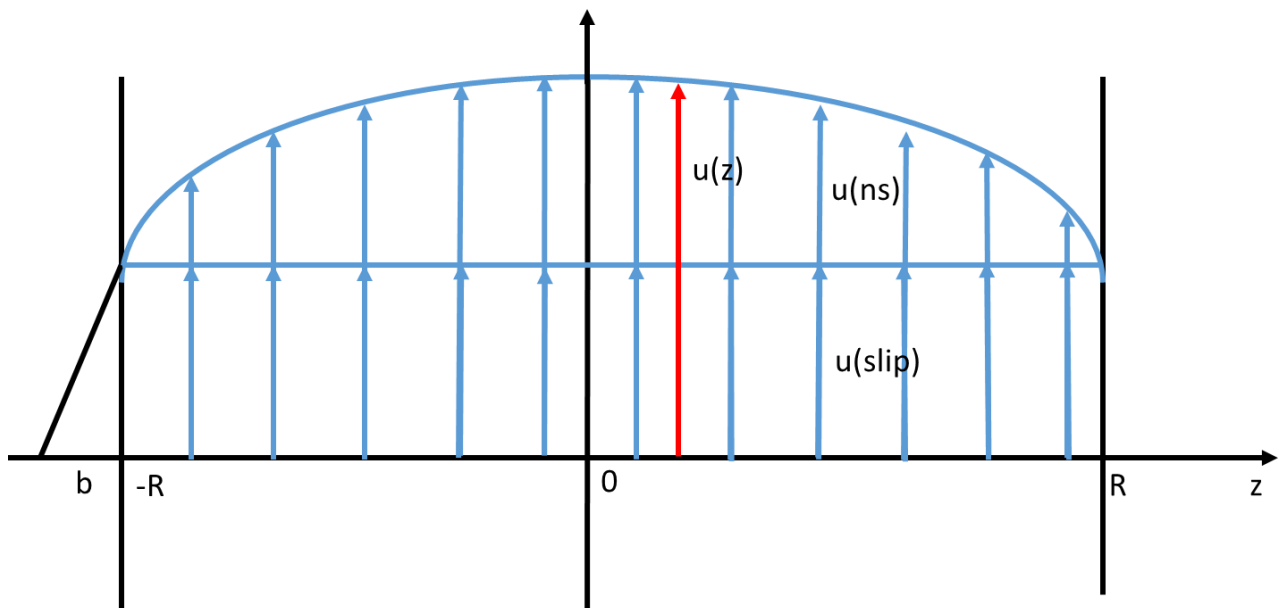


Figure 17: Schéma du profil de Poiseuille d'un fluide en 2D (dans un canal ou un capillaire) avec x l'axe parallèle à l'écoulement, z l'axe parallèle à l'altitude entre les parois, h et $-h$ l'altitude des parois par rapport au centre, et b la longueur de glissement.

Le débit Q s'exprime ainsi:

$$Q = u_{moyen} \pi R^2 \quad (7)$$

avec

$$u_{moyen} = u_{slip} + u_{no-slip,moyen} \quad (8)$$

où u_{slip} est la vitesse due au glissement (et indépendante de z), et $u_{no-slip,moyen}$ est la vitesse moyenne due à l'écoulement de Poiseuille, qui peut s'exprimer comme suit:

$$u_{moyen} = \frac{u_{max}}{2} = \frac{u_{no-slip,z=0}}{2} \quad (9)$$

En combinant les équations (6-9), on obtient:

$$Q = -\frac{\pi R^4 \Delta P}{4\eta L} \left[\frac{1}{2} + \frac{2b}{R} \right] \quad (10)$$

Il suffit de mesurer Q selon la pression appliquée ΔP , la longueur et le diamètre du capillaire, et la viscosité de l'électrolyte pour obtenir la longueur de glissement b . Cette méthode a l'avantage de ne pas faire intervenir d'appareillage complexe et de pouvoir être appliquée à

toutes les surfaces imaginables (qu'elles soient ouvertes, cylindriques, etc), tout en offrant une sensibilité de l'ordre de la centaine de nm sur la mesure de b . Compte tenu des appareils disponibles, cette méthode sera privilégiée dans les travaux de cette thèse.

-Autre méthode utilisant la mesure de débit:

Il s'agit de comparer les débits obtenus en appliquant la même pression sur le même fluide dans deux capillaires de géométrie identique, l'un étant considéré comme sans aucun glissement (la condition « no-slip » est posée comme réelle), l'autre étant superhydrophobe (et présentant la longueur de glissement à mesurer). Les expressions mathématiques sont les mêmes que précédemment, mais, afin de s'affranchir de tous les paramètres secondaires qui sont les mêmes dans les deux capillaires (pression, longueur, viscosité, etc), il est nécessaire de faire le rapport des deux débits mesurés, ce qui donne l'expression suivante [29]:

$$\frac{Q_{GLISSEMENT}}{Q_{NO-SLIP}} = 1 + \frac{4b}{R} \quad (11)$$

où $Q_{GLISSEMENT}$ est le débit dans le capillaire avec du glissement et $Q_{NO-SLIP}$ est le débit dans le capillaire sans glissement.

II.3.3. Superhydrophobie sans glissement

Le glissement est une grandeur très utilisée dans la recherche sur la superhydrophobie, car il permet de qualifier rapidement et simplement la superhydrophobie d'un conduit (capillaire, canal ou autre). De plus, une grande part des recherches sur les surfaces superhydrophobes étant tournée vers la problématique de la réduction de la perte de charge importante existant dans des conduits de faible diamètre (micro et nanométrique), un glissement le plus important possible est souvent mis en avant comme enjeu majeur.

Différentes études montrent cependant l'existence de surfaces superhydrophobes ne présentant pas de glissement [30,31]. Elles mettent notamment en avant l'apparition d'une goutte presque parfaitement sphérique posée sur une surface (ce qui démontre la superhydrophobie de cette surface), mais ne glissant pas lorsqu'on penche la surface. Ce type de superhydrophobie peut être observé dans la nature et sur des surfaces synthétiques. Il a été nommé « effet pétale » par opposition à « effet lotus » mis en évidence par Barthlott et Neinhuis. La Figure 18 compare ces deux effets.

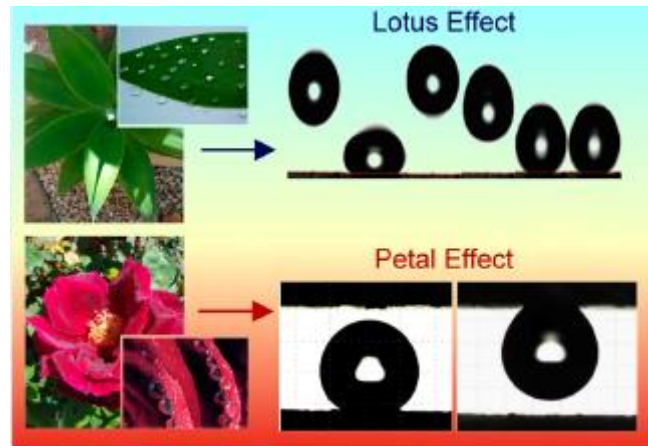


Figure 18: Effet lotus: la goutte rebondit sur la surface ; Effet pétale: la goutte adhère à la surface, même retournée. Adapté de M. Nine et al. [30].

Deux paramètres expliquent cette superhydrophobie sans glissement. En premier lieu, la densité de la rugosité joue un rôle important. Une surface très rugueuse peut, en effet, être constituée de grandes poches d'air coincées entre des pics de matériau assez espacés les uns des autres (grande porosité), ou être constituée de multitudes de petites poches d'air emprisonnées entre des pics de matériau beaucoup plus proches les uns des autres (faible porosité). La Figure 19 compare les deux types de rugosité menant aux deux types de superhydrophobie.

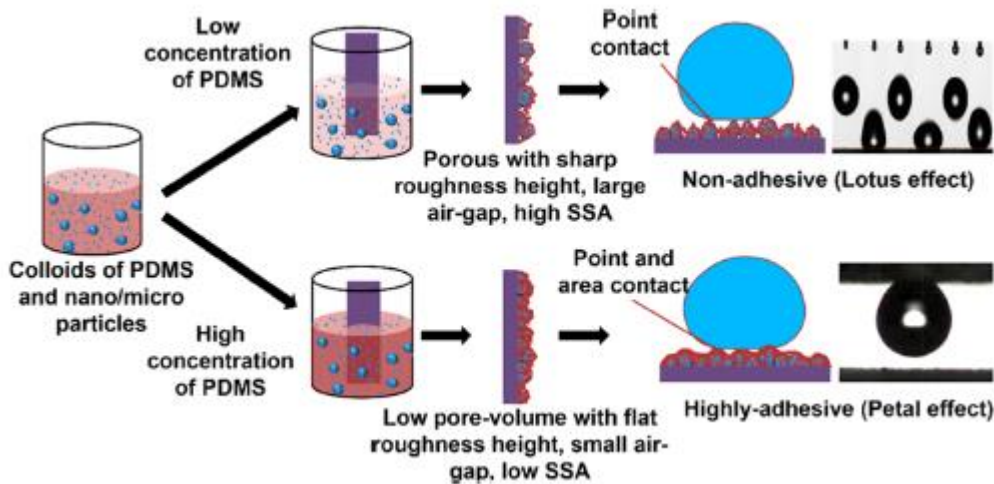


Figure 19: Schéma de fabrication de surfaces superhydrophobes adhésives et non-adhésives en fonction du type de porosité. Adapté de M. Nine et al. [30].

La rugosité à faible porosité est souvent observée sur des surfaces à rugosité dite simili-fractale, car les nano-picots recouvrant les micro-picots sont autant de pointes de matériau proches les uns des autres. Ces surfaces simili-fractales présentent donc l'avantage de stabiliser le film d'air emprisonné dessus (puisque les nombreuses nano-bulles risquent moins facilement de s'échapper que des bulles plus grosses). Cependant, le glissement est réduit voire inexistant

[23]. Cet effet pétale a été reproduit en laboratoire, et les surfaces alliant grand angle de contact et forte adhésion de l'eau ont été nommées parahydrophobes [32].

Un autre paramètre expliquant cette absence de glissement est la concavité des bulles piégées [31]. Si la bulle d'air est trop convexe ou trop concave, elle entraîne des perturbations dans l'écoulement du fluide qui contrebalancent l'absence de friction entre les deux phases et provoque donc une perte de charge plus importante qu'entre le fluide et une surface solide plane. La Figure 20 compare les deux configurations de bulle et ses conséquences sur l'écoulement.

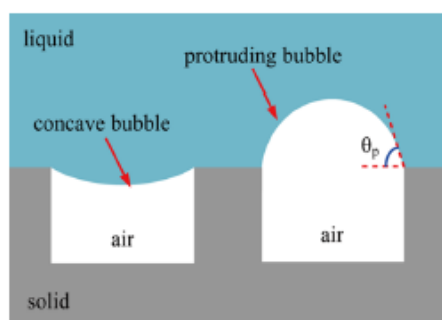


Figure 20: Schéma d'une bulle concave et d'une bulle convexe avec l'angle de protrusion θ_p [33].

III. Le (non-)mouillage d'une surface superhydrophobe

III.1. Les modèles de mouillage (Cassie et Wenzel)

Deux modèles ont été développés pour caractériser le mouillage d'une surface: le modèle de Wenzel, décrit en 1936 et le modèle de Cassie-Baxter, décrit en 1944 [34]. Ces modèles sont des cas idéaux et il est tout à fait possible de se trouver dans un cas intermédiaire, où le fluide va pénétrer dans les aspérités de la surface, mais pas totalement, laissant des poches d'air au fond des cavités (Figure 21).



Figure 21: Schéma du régime a. de Cassie-Baxter, b. de Wenzel, c. régime mixte. Adapté de [15].

III.1.1 Wenzel

Ce modèle considère qu'une goutte posée sur une surface s'accroche à toutes les aspérités et que l'angle de contact d'une telle goutte est donné par la Loi de Young-Dupré. Lors d'un déplacement de la goutte, l'angle de reculée (i.e. l'angle de contact de la traînée de la goutte) est très faible, et, par conséquent, l'hystérésis est très grande. C'est par exemple le cas de la goutte de pluie sur une vitre, qui va glisser en laissant une traînée derrière elle (traînée qui se subdivisera ensuite en petites gouttelettes pour minimiser son énergie).

III.1.2 Cassie-Baxter

Ce modèle considère qu'une goutte posée sur des aspérités ne va pas suivre leur contour, mais plutôt reposer à leur sommet. Initialement, ce modèle a été développé car, à partir d'une certaine rugosité, les calculs des angles d'hystérésis selon le modèle de Wenzel ne donnent plus de résultats en accord avec les expériences (voir expérience de Dettre et Johnson, section II.c.). Puisque la goutte ne pénètre pas dans les aspérités, les angles d'avancée et de reculée sont grands et très proches. La goutte ne forme plus de traînée en se déplaçant, ce qui donne une valeur d'hystérésis très faible ($<10^\circ$). De plus, puisque la goutte repose partiellement, voire majoritairement, sur de l'air, la surface réelle de contact entre la goutte et le solide est plus faible que dans le premier modèle, d'où une plus faible énergie d'interaction (et donc une plus faible adsorption) entre la goutte et le solide.

III.1.3. Transition d'un modèle/régime à l'autre: exemple de la vitesse critique d'empalement

La vitesse critique d'empalement est la vitesse de chute d'une goutte à partir de laquelle cette goutte va pénétrer le matériau sur lequel elle tombe, et ne plus s'en détacher, au moins partiellement. En-dessous de cette vitesse, le modèle de mouillage est proche de celui de Cassie-Baxter, avec la goutte ne pénétrant pas les aspérités de la surface, et rebondissant plusieurs fois dessus (Figure 22). Au-delà de cette vitesse, le modèle de mouillage est celui de Wenzel. La goutte pénètre le matériau sur lequel elle tombe (à cause de son énergie cinétique lui permettant de dépasser la barrière de l'énergie de la tension de surface de la goutte). Même si une partie de la goutte rebondit, une autre partie reste accrochée entre les aspérités, et l'on observe un mouillage important de la surface (Figure 23).

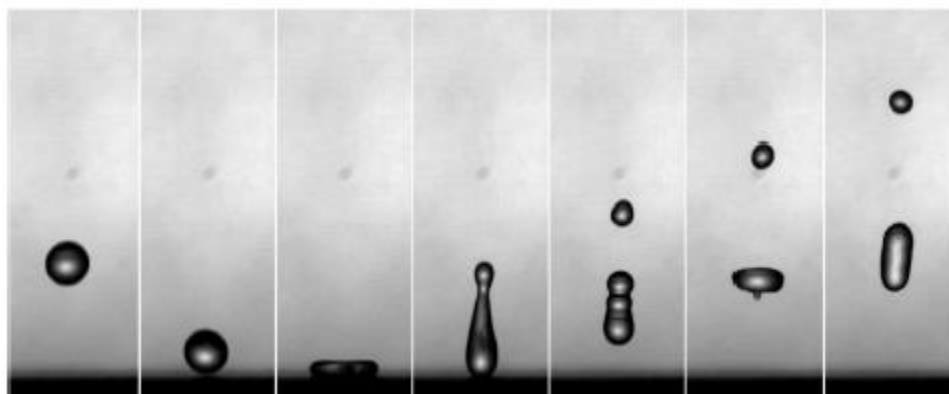


Figure 22: Rebond d'une goutte millimétrique tombant sur une surface ayant un revêtement superhydrophobique à une vitesse d'environ $1\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Toute la goutte rebondit, ce qui montre que l'on reste en régime de Cassie-Baxter. L'intervalle entre chaque photo est de 5 ms. Adapté de M. Reyssat et al. [35].

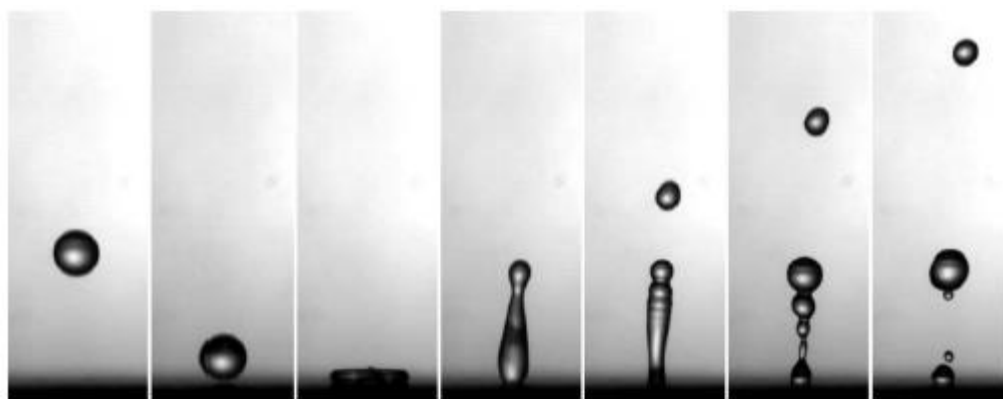


Figure 23: Rebond d'une goutte millimétrique tombant sur une surface ayant un revêtement superhydrophobique à une vitesse d'environ $1,2\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Une partie de la goutte ne rebondit pas mais reste empalée sur la surface rugueuse, ce qui correspond au régime de Wenzel. L'intervalle entre chaque photo est de 5 ms. Adapté de M. Reyssat et al. [35].

Le phénomène peut aussi apparaître avec une pression: si l'eau placée sur un matériau superhydrophobe subit une forte pression [36], elle va finir par pénétrer la surface, et le mouillage devient alors total (régime de Wenzel, Figure 24).

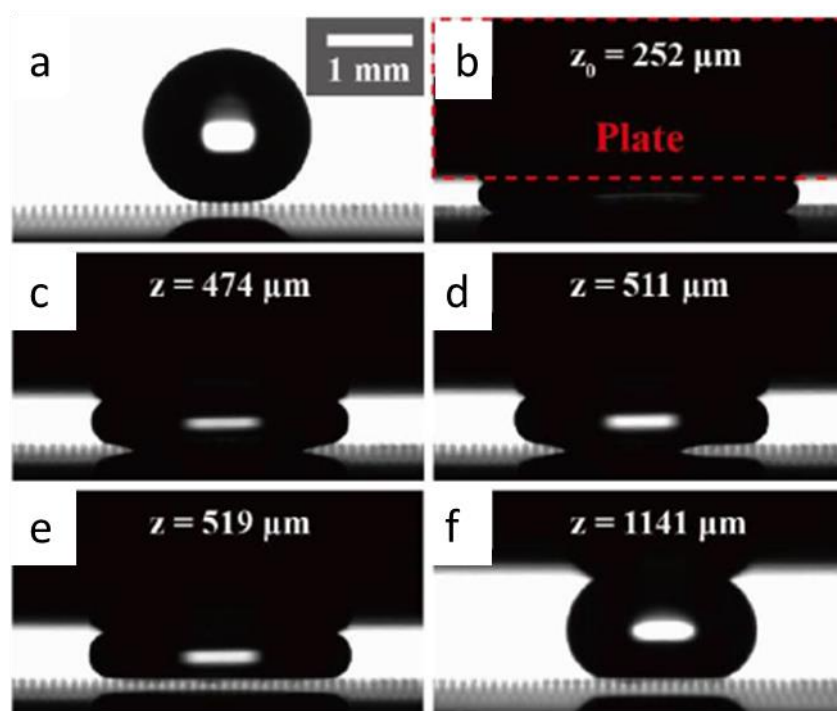


Figure 24: Transition du régime de Wenzel au régime de Cassie-Baxter. a. goutte déposée sur la surface superhydrophobe sans contrainte. b. exercice d'une forte pression sur la goutte, résultant en un mouillage important de la surface (la goutte pénètre les interstices situés sous elle et la surface apparaît aussi noire que la goutte). c, d, e et f. Décroissance graduelle de la pression et diminution simultanée du mouillage de la surface, jusqu'au retour à un état de non-mouillage: régime de Cassie-Baxter. Adapté de Y. Li et al. [36].

Lorsqu'une surface superhydrophobe est mouillée, elle perd évidemment sa propriété de non-mouillabilité, et des problèmes liés à une interaction entre la phase aqueuse et la surface superhydrophobe peuvent apparaître [37]. On peut notamment observer un effondrement de la nanostructure, qui va faire perdre définitivement la superhydrophobie de la surface, même après le retour à une pression moins forte. Ce risque dépend cependant largement de la géométrie et de la robustesse de la nanostructure.

Même si elles n'ont pas été abordées jusqu'à présent, il y a des entités très importantes qui permettent de caractériser les différents régimes. Il s'agit des nano-bulles d'air présentes sous la goutte d'eau dans le régime de Cassie-Baxter (et qui sont absentes dans le régime de Wenzel). Puisqu'elles représentent ce qui sépare la condition mouillante de la condition non-mouillante, l'étude de ces nano-bulles est primordiale.

III.2. Le comportement des nanobulles

Les nano-bulles de surface sont des domaines gazeux nanoscopiques apparaissant sur des surfaces immergées. Leur existence a été démontrée en 2000 lors de la mise en place du premier

dispositif de Microscopie à Force Atomique (AFM). Leur existence a été mise en évidence par d'autres méthodes pour éviter toute contestation, tant elle semble paradoxale. Selon la loi de Laplace, la pression au travers d'une interface est reliée au rayon de la bulle:

$$P_b - P_a = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (12)$$

où a et b sont les deux milieux de chaque côté de l'interface considérée, R_1 et R_2 sont les deux rayons de courbure principaux de la surface au point considéré, γ est la tension de surface du liquide étudié, et P est la pression exercée (d'un côté et de l'autre de l'interface gaz-liquide). Dans le cas d'une goutte sphérique, ces deux rayons sont égaux et l'équation se simplifie:

$$P_b - P_a = \frac{2\gamma}{R} \quad (13)$$

Cette loi illustre le fait que, pour une tension superficielle γ constante (par exemple, à l'interface air-eau), la différence de pression est d'autant plus forte que le rayon de la goutte observée est petit. Dans notre étude, les objets étant micro voire nanométriques, la différence de pression de ces bulles est telle qu'elles doivent se dissoudre en quelques microsecondes (la pression extérieure étant bien supérieur à la pression intérieure). De plus, leur forme est très éloignée de celle d'une bulle macroscopique: au lieu d'être sphériques, les bulles ont une hauteur de quelques nanomètres alors qu'elles peuvent s'étaler sur plusieurs micromètres de largeur, ce qui leur donne un angle de contact très faible (il s'agit en fait de films de gaz plutôt que de « bulles ») [38].

Dans le modèle de Wenzel, il n'existe pas de bulles entre les aspérités, sous les gouttes. Mais dans tous les autres cas, qu'il s'agisse du modèle de Cassie-Baxter ou d'un modèle hybride, il existe des micro voire des nano-bulles d'air dans les aspérités du matériau, là où l'eau ne pénètre pas. En fonction de la structure exacte du matériau et des conditions du milieu, ces gouttes peuvent présenter une plus ou moins grande surface, une plus ou moins grande épaisseur et un angle variable à l'interface air/eau. La valeur de cet angle joue un grand rôle dans l'importance du glissement du liquide sur la surface. Le liquide repose en partie sur ces bulles d'air, et c'est ce qui crée le glissement. Plus le liquide repose sur de l'air, plus il y a du glissement. D'autre part, si les bulles d'air sont concaves ou convexes, les inégalités ainsi créées le long de la surface vont accentuer les frottements entre le liquide et cette surface faite de solide et de gaz [39]. Comme cela est montré à la Figure 25, si les bulles sont « trop » convexes, les frottements

engendrés peuvent contrebalancer le glissement voire les surpasser, rendant la surface plus adhérente au fluide qu'une surface non-superhydrophobe. Dans ce cas, il apparaît une situation qui peut sembler paradoxale avec une non-mouillabilité (toujours forte même si les bulles sont très bombées) et une longueur de glissement qui devient négative (Figure 25).

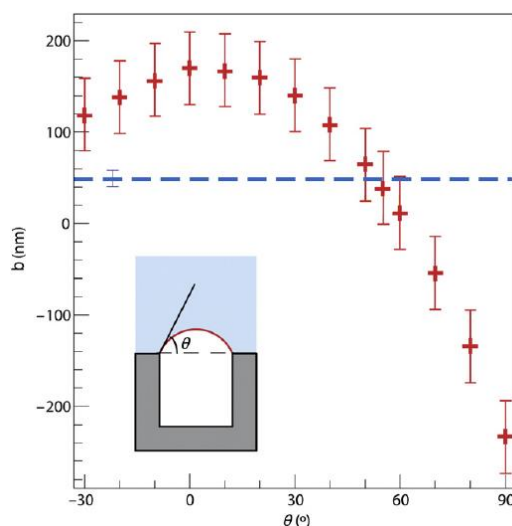


Figure 25: Evolution de la longueur de glissement selon l'angle du ménisque de la cavité d'air du régime de Cassie-Baxter. La longueur de glissement obtenue en régime de Wenzel est représentée par la ligne en pointillés bleus. Adapté de T. Lee et al. [39].

La morphologie de ces bulles, dépendante en premier lieu de la géométrie des aspérités de la surface, est influencée par la tension appliquée, la salinité, et le taux de gaz dissous dans le liquide [38].

III.2.1. Influence de la salinité, de la quantité de gaz dissous et du champ électrique sur les caractéristiques des bulles

Afin d'étudier les bulles se formant sur une surface de polystyrène (PS) immergée, certains paramètres ont été considérés par Pan et al. [40], tels que la salinité de la solution et la quantité d'oxygène dissous. La solution saline (chlorure de sodium (NaCl) à 8 g.L^{-1} , chlorure de potassium (KCl) à 200 mg.L^{-1} , phosphate de sodium dibasique $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})_2$ à 160 mg.L^{-1} , phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) à 100 mg.L^{-1}) produit des bulles d'un diamètre plus petit que l'eau dé-ionisée, comme montré dans la Figure 26. La solution saline 1 (solution saline précédente diluée à 0.9% et saturée en oxygène dissous) génère des bulles plus petites que la solution saline 2 (ayant seulement 50-60 ppm d'oxygène dissous et une même concentration en sel). La Figure 26 montre qu'il y a quelques bulles de diamètre plus gros dans la solution non saturée en oxygène, alors que dans la solution saturée en oxygène comporte de très nombreuses bulles de diamètre plus petit.

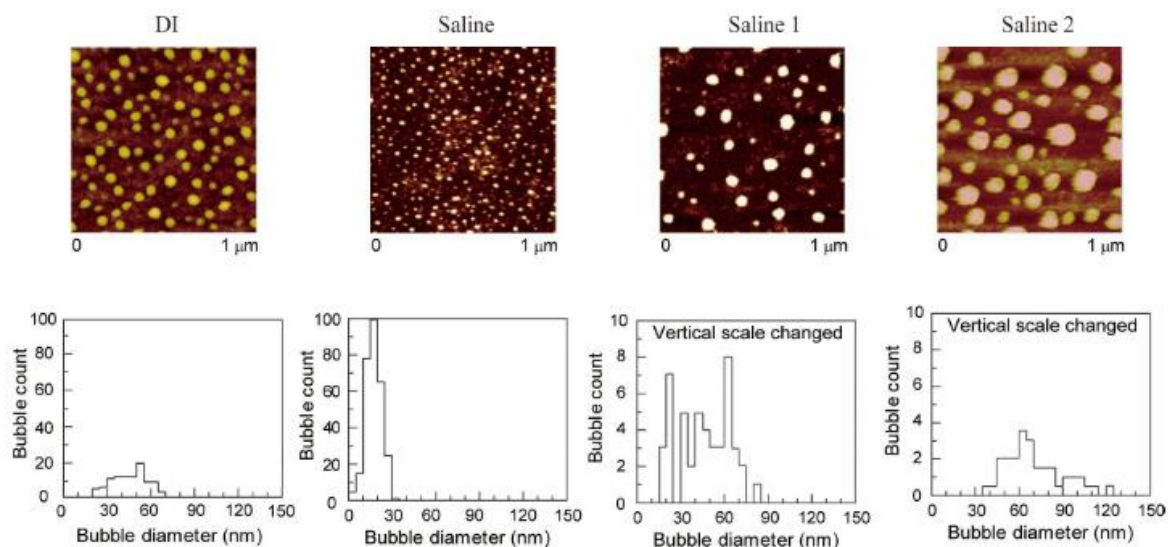


Figure 26: Images SEM de nanobulles générées dans l’eau dé-ionisée (DI), de l’eau salée, et deux solutions d’eau salée diluée et plus ou moins oxygénées, et distribution en taille des bulles observées. Composition des solutions: Saline: chlorure de sodium (NaCl) 8000 mg.L⁻¹, chlorure de potassium (KCl) 200 mg.L⁻¹, phosphate disodique (Na₂HPO₄·7H₂O)₂ 160 mg.L⁻¹, phosphate de potassium (KH₂PO₄) 100 mg.L⁻¹. Saline 1: dilution de la solution Saline à 0.9% w/v et saturation en oxygène. Saline 2: dilution de la solution Saline à 0.9% w/v et oxygénation (50–60 ppm d’oxygène dissout). Adapté de Y. Pan et al. [40].

Cet équilibre entre oxygène gazeux et oxygène dissous a été aussi étudié par Zhang et al. Outre des interrogations provoquées par la surprenante longévité de ces nano-bulles dans l’eau, la taille des nano-bulles dépend du taux de gaz dissous, comme nous venons de le discuter. Par exemple, les bulles deviennent plus petites lorsqu’elles sont plongées dans de l’eau partiellement dégazée [38].

L’influence de l’application d’un champ électrique sur les bulles a été étudiée par Pan et al. (Figure 27). Comme dans le cas de l’effet de la salinité, le comportement des bulles sous champ électrique s’explique par l’évolution des forces électrostatiques. Lorsque la tension électrique appliquée augmente, le potentiel de surface entre la paroi et la solution augmente et les bulles s’aplatissent, ce qui se traduit par un grossissement vue du dessus.

Les nanobulles sont également influencées par des paramètres secondaires, comme la température qui influe à la fois sur la dilatation des bulles et sur la solubilité de l’air dans l’eau, et par conséquent, sur l’équilibre d’échange entre l’oxygène libre et l’oxygène dissous.

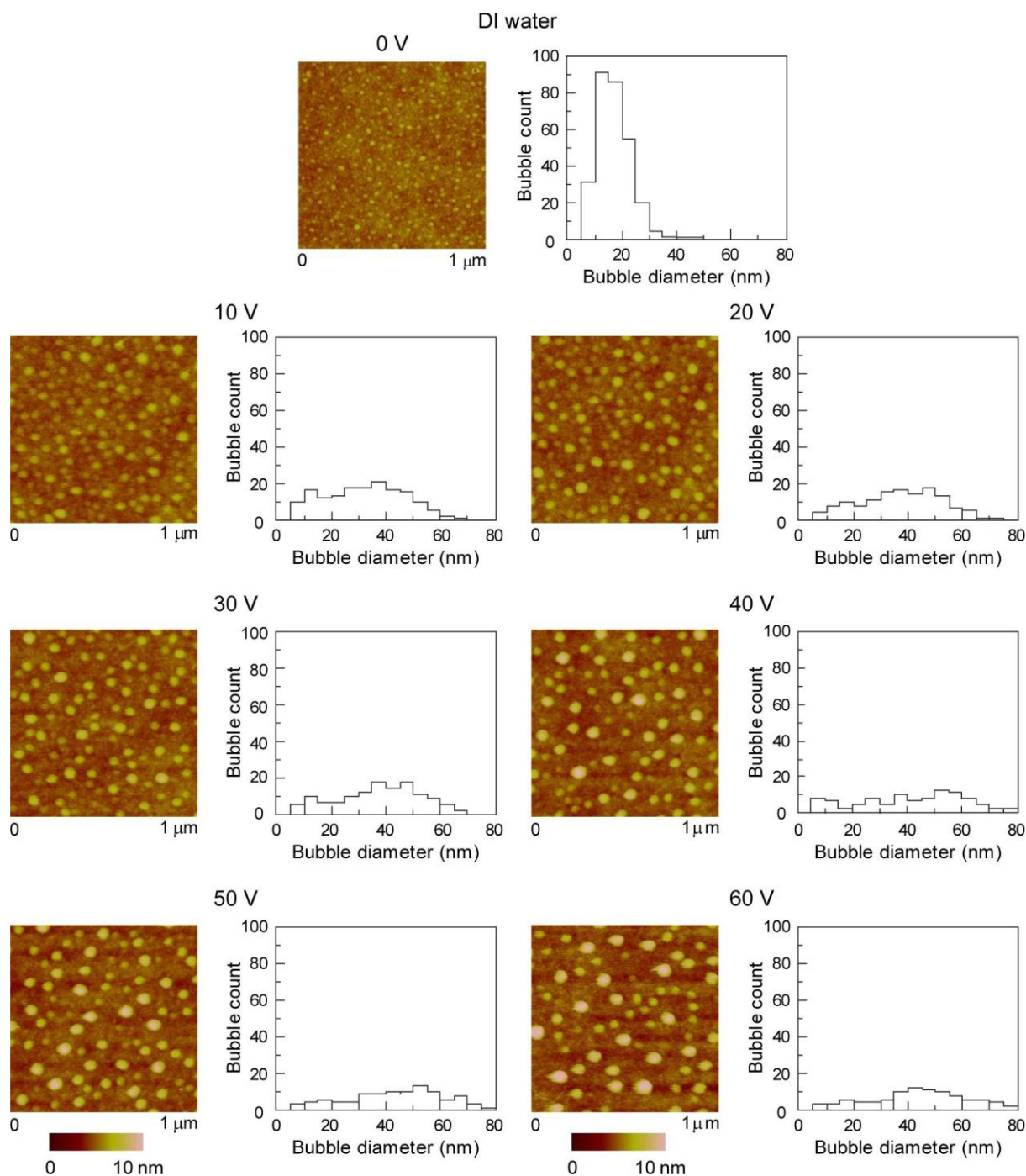


Figure 27: Images AFM et histogrammes correspondants de la taille des bulles à différentes tensions appliquées sur des surfaces de polystyrène dans de l'eau déionisée. Adapté de M. Mazumder et al. [41].

III.2.2. Caractéristiques de la couche de gaz et état métastable

Lorsqu'un glissement est observé, la couche de gaz est en régime de Knudsen [42], qui établit que pour qu'il y ait glissement, l'épaisseur moyenne du film de gaz doit être inférieure au libre parcours moyen du gaz. Dans l'air, le libre parcours moyen est de 70 nm. Le film de gaz a une épaisseur inférieure à 70 nm, ce qui illustre la morphologie particulière des nano-bulles d'air:

latéralement très étendue, au point d'être comparable à une couche continue, et de très faible hauteur (inférieure à 70 nm). Cette couche de gaz, aussi appelée plastron, est parfois instable et disparaît même sous l'effet de la pression hydrodynamique [43]. C'est pour cette raison que l'on considère généralement que le régime de Cassie–Baxter est métastable. Les paramètres présentés précédemment (salinité, taux de gaz dissous) jouent un rôle dans la stabilisation du plastron, mais la pression appliquée doit toujours être contrôlée pour se situer dans un intervalle donné. Une pression trop basse signifie que l'air n'est plus plaqué à la paroi, et il y a donc un risque que des bulles d'air soient emportées par l'écoulement. A l'opposé, une pression trop élevée force le mouillage de la paroi SH, et lui fait donc perdre tout intérêt (voir section III.1 sur le mouillage de la surface).

IV. Elaboration d'une surface superhydrophobe

De nombreuses méthodes ont été mises en place pour la réalisation de matériaux superhydrophobes, qu'on peut classer en différentes catégories, selon les techniques utilisées et le type de micro et nanostructure qu'elles permettent de produire [44]. De façon générale, une surface superhydrophobe est obtenue en revêtant une surface rugueuse avec un matériau hydrophobe selon le principe d'une fabrication « bottom-up », ou bien la surface, constituée d'un matériau hydrophobe, est rendue rugueuse selon le principe d'une fabrication « top-down », comme c'est le cas pour la lithographie. Les méthodes « bottom-up » peuvent être un dépôt chimique, un assemblage de colloïdes, une méthode couche par couche, de l'électrospray ou de l'électrodéposition[45]. A l'échelle industrielle, les applications pour des matériaux superhydrophobes sont très variées et en plein développement: parebrises de voitures, coques de bateaux de course, pales d'éoliennes, poêles antiadhésives, panneaux solaires autonettoyants...

La Figure 28 donne quelques exemples d'applications de la superhydrophobie dans le domaine de la médecine.

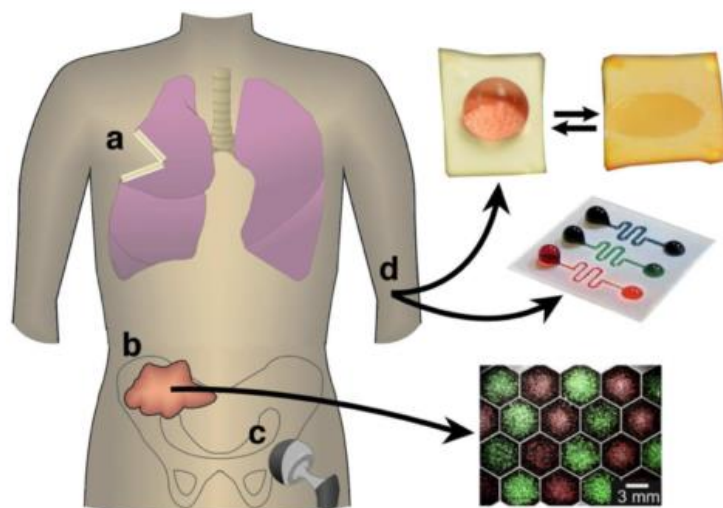


Figure 28: Exemples d'intérêts des matériaux superhydrophobes pour des applications médicales: a. Contrôle de l'application locale de médicaments après ablation d'une tumeur, b. Croissance de cellule de façon ordonnée pour l'étude de la communication cellulaire, c. Réduction de l'adhésion des bactéries sur des implants, d. Stabilisation de gouttes ou d'écoulements de diagnostics en microfluidique. Adapté de E. Falde et al. [45].

IV.1 Dépôt de nanoparticules

La méthode la plus répandue, car souvent simple à mettre en place, est le dépôt de nanoparticules qui consiste à recouvrir une surface, à l'origine lisse ou rugueuse, de micro ou nanoparticules à la géométrie plus ou moins définie pour augmenter la rugosité de cette surface. Les nanoparticules en elles-mêmes peuvent être très variées: polymères, billes de silice greffée, colloïdes divers, nanotubes de carbone, etc. Les méthodes de dépôt ont comme avantages de pouvoir servir à la fabrication de nombreux matériaux SH et de pouvoir s'appliquer sur de grandes surfaces. Il est cependant impossible de contrôler précisément la mise en forme du matériau avec cette méthode, ce qui rend cette dernière inutilisable pour la réalisation de matériaux ordonnés (comme par exemple une peau de requin synthétique avec toutes ses écailles orientées dans le même sens). De par la très grande variété des nanoparticules développées, le protocole de dépôt est variable (dépôt en phase vapeur, dépôt sol-gel, pulvérisation sur la surface, immersion de la surface dans une solution contenant des colloïdes, etc.). Quelques exemples sont décrits par la suite.

IV.1.1. Colloïdes de silice modifiée

Privett et al. ont synthétisé des colloïdes de silice modifiée en passant aux ultrasons une solution d'heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl triméthoxysilane (17FTMS) et de tetraéthylortho silicate (TEOS). La solution a ensuite été versée goutte-à-goutte dans une solution composée

d'ethanol, d'eau et d'hydroxyde d'ammonium pour former les colloïdes. La solution résultante a enfin été déposée sur une lame de verre et laissée à sécher pendant une nuit. Les auteurs ont constaté que la structure du matériau est à l'échelle nanométrique, et qu'elle est totalement statistique: aucun motif n'est visible (Figure 29). Pour obtenir un revêtement non ordonné, cette méthode semble donc satisfaisante, bien que les étapes de réalisation des colloïdes puissent se révéler assez complexes.

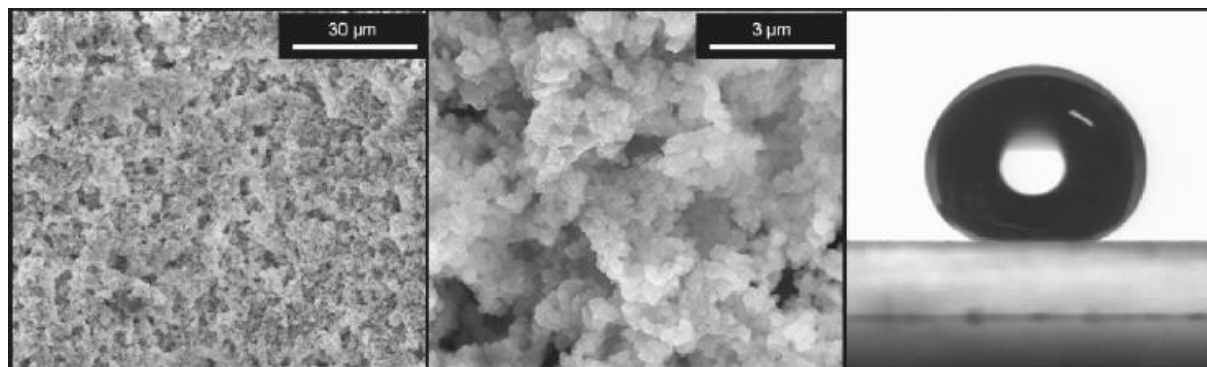


Figure 29: Images SEM d'une surface de silice greffée de 17FTMS (gauche et centre) à différents grossissements. Goutte d'eau déposée sur cette surface (droite, angle de contact: $167,7^\circ$). Adapté de B. J. Privett, et al. [46].

IV.1.2. Nanotubes de carbone

Les nanotubes ont été fonctionnalisés aux extrémités de façon à les déposer perpendiculairement à la surface traitée, mais leur agencement n'est pas du tout contrôlé (Figure 30) [44].

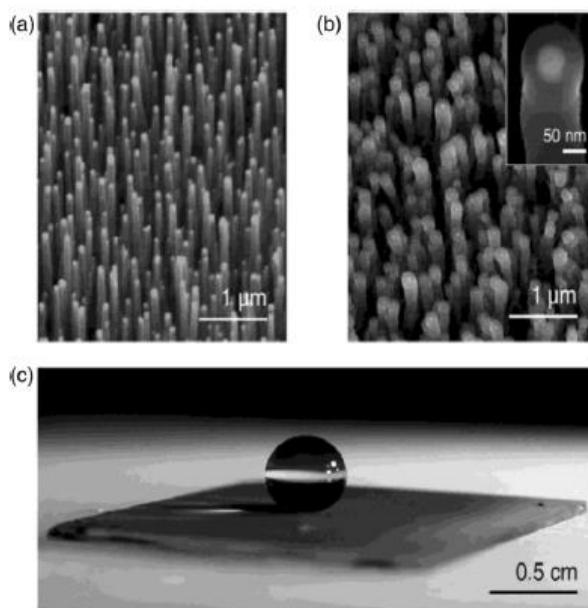


Figure 30: Images SEM d'une forêt de nanotubes de carbone (a. et b.), photographie d'une goutte d'eau posée sur cette forêt (c.). Adapté de Y. Yoon et al. [44].

IV.2. Lithographie

Si on veut parfaitement contrôler la structuration de surface, il faut utiliser la lithographie, dont la plus répandue est la photolithographie. La photolithographie repose sur plusieurs étapes successives. D'abord, une résine photosensible qui sert de matériau superhydrophobe est déposée sur la surface à traiter. Un filtre présentant le motif désiré est ensuite placé au-dessus, et un rayonnement UV est appliqué pour réticuler la résine non protégée. Le filtre est ensuite enlevé et il ne reste plus que la résine réticulée, disposée de la façon désirée (voir Figure 31) [47].

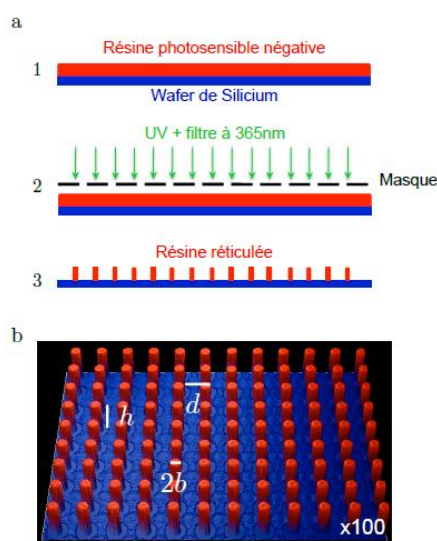


Figure 31: Procédé de photolithographie (a.): étalement de la résine photosensible sur une galette de silicium (1), insolation par des rayons UV de la résine à travers un masque (2), puis dissolution dans un solvant de la résine non réticulée (3). Forêt de micro-piliers obtenus par photolithographie (b.), de diamètre $2b$, de hauteur h et de pas d . Adapté de [12].

IV.3. Combinaison de plusieurs méthodes

Comme cela a été décrit précédemment, la rugosité à double échelle est un moyen très répandu pour obtenir une surface superhydrophobe dans la nature. En laboratoire, on s'attache par conséquent à obtenir une rugosité à double échelle (voire plus) lors de la synthèse de surfaces superhydrophobes. Pour cela, on a souvent recouru à deux étapes distinctes. La première va donner la structure microscopique (première échelle de rugosité) et la seconde, la structure nanoscopique (deuxième échelle de rugosité). Dans la plupart des cas, la première structure est ordonnée, obtenue par lithographie. On recouvre ensuite cette structure ordonnée d'une couche nanométrique statistique.

Dans l'exemple de la Figure 32, la surface ayant une rugosité à double échelle est constituée d'une partie micrométrique (obtenue par lithographie) sur laquelle est déposée une couche nanométrique. La structure nanométrique a un angle de contact de 167° , la microstructure a un angle de contact de 160° et la structure à double échelle a un angle de contact de 173° . Les trois surfaces sont superhydrophobes, mais la surface la plus superhydrophobe est celle ayant une rugosité à double échelle combinant les deux techniques.

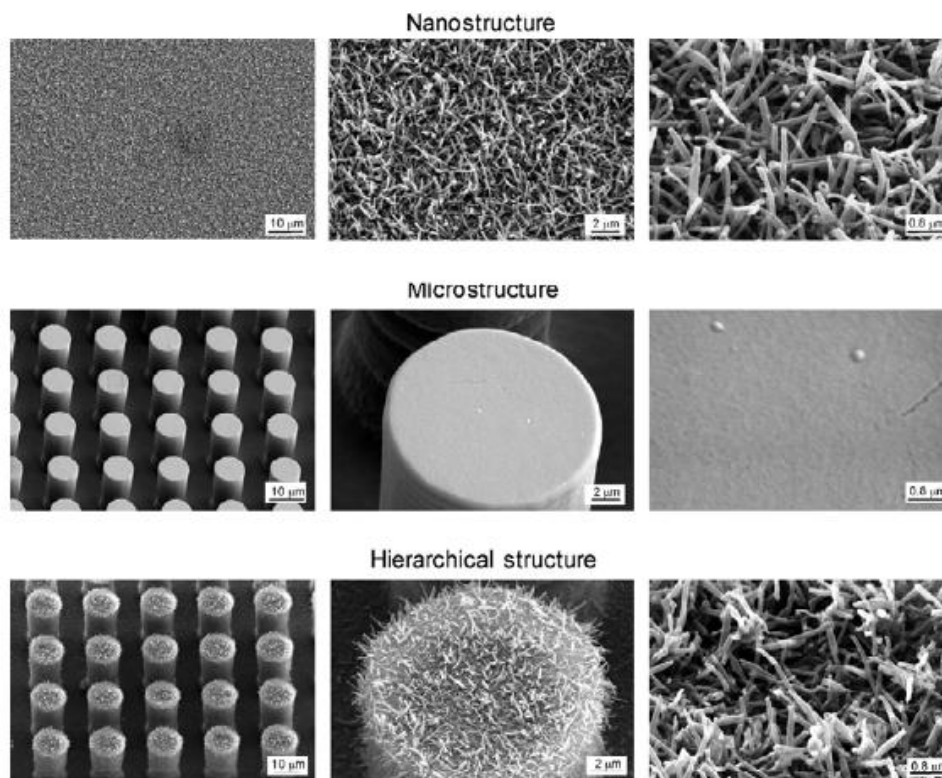


Figure 32: Image SEM d'une structure nanométrique (statistique), d'une structure micrométrique (ordonnée) et de la combinaison des deux. Adapté de Y. C. Jung et al. [3].

Il est aussi possible de recourir à une première étape qui ne donne pas de structure ordonnée. La Figure 33 présente l'addition d'un dépôt de polymère et d'un dépôt de nanoparticules. Ce mélange présente de nombreux avantages, car il est simple à appliquer, et permet de combiner la rugosité basse fréquence des polymères, ainsi que leur bonne adhésion à la surface greffée, à la rugosité haute fréquence des nanoparticules, ce qui rend le greffage superhydrophobe, homogène et robuste.

Même si la combinaison des deux méthodes est possible, l'une donnant un motif ordonné à l'échelle micrométrique et la seconde, ordonnée ou non, recouvrant la première d'aspérités à l'échelle nanométrique, certains matériaux présentent l'avantage de réaliser des surfaces ayant une rugosité à double-échelle intrinsèque. C'est le cas, par exemple, du Glaco™.

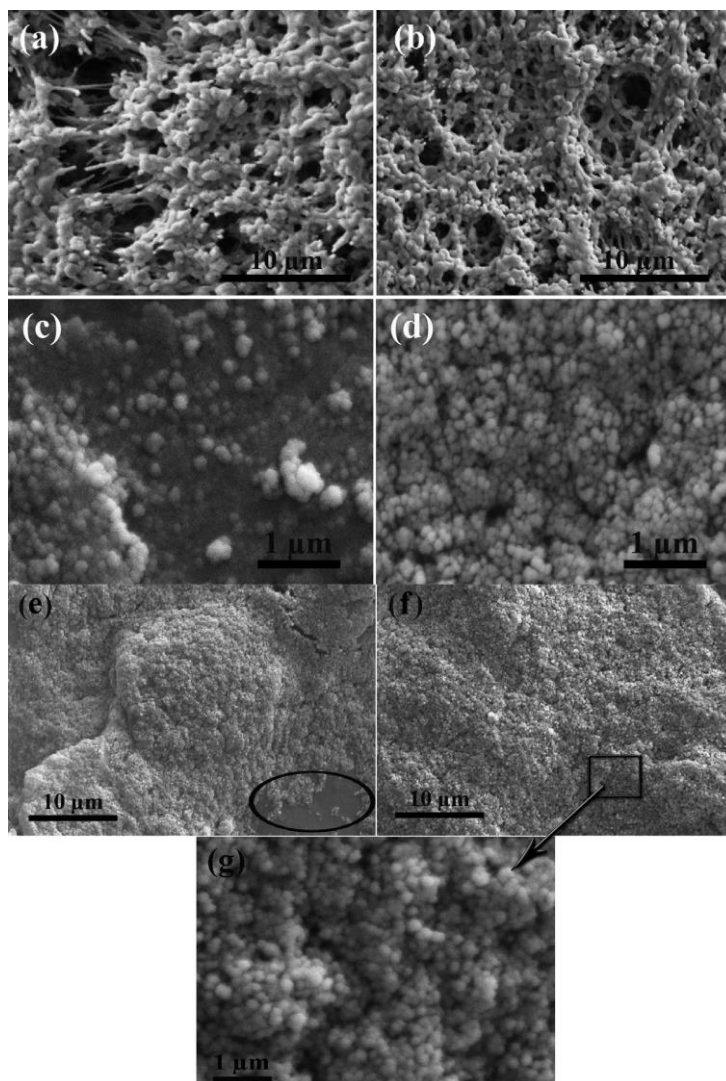


Figure 33: Image SEM de surfaces traitées avec des polymères: a. MEK4, b. MEK6, avec des nanoparticules: c. Si50, d. Si100, et avec des mélanges de polymères et de nanoparticules: e. MEK2Si10, f. MEK2Si20 et g. zoom de f. Adapté de I. Hejazi et al.[48]. MEKx désigne la méthyl éthyl cétone, ou butanone, qui est le solvant utilisé en combinaison avec du p-xylène pour solubiliser le polymère déposé (polypropylène). Le nombre x désigne le volume en mL ajouté à 10 mL de p-xylène pour la préparation de la solution. Les mentions Si10 et Si20 font références à la masse de nanoparticules de silice (10 et 20 mg, respectivement) ajoutés à la solution de p-xylène.

De nombreuses autres méthodes de fabrication de surfaces superhydrophobes existent, et peuvent être aisément trouvées dans la littérature (comme par ex. le dépôt de résine époxy sur laquelle on greffe des nanoparticules qui sont ensuite fonctionnalisées par des groupements hydrophobes ; ou la photolithographie puis l'attaque de la résine réticulée pour la rendre rugueuse) [44,49].

IV.4. Le Glaco™

De nombreux produits commerciaux permettent d'utiliser la superhydrophobie dans la vie courante. La grande majorité d'entre eux sont utilisés comme imperméabilisants des textiles, des parebrises voire même des coques de bateaux. Parmi ces composés, le Glaco™ s'utilise sous la forme d'un aérosol à pulvériser sur une vitre pour la rendre superhydrophobe (et offrant un angle de contact au moins supérieur à 155°). Le procédé est simple et permet de traiter de grandes surfaces facilement. Le Glaco est composé de nanoparticules de silice fonctionnalisées par des groupements hydrophobes et dispersées dans l'isopropanol [50]. Comme pour tout revêtement superhydrophobe, c'est surtout la structure de ces nanoparticules de silice qui va jouer un rôle important: le Glaco est sous forme de micro-picots, eux-mêmes recouverts de nano-picots. Le produit en lui-même présente une rugosité à double-échelle sans avoir recours à plusieurs méthodes différentes. Il s'agit même d'un cas de rugosité à double-échelle particulier: le cas des matériaux dits « simili-fractals » [51].

La méthode de dépôt du Glaco™ est très simple: il suffit de couvrir la surface à traiter de la suspension de Glaco™, puis de la mettre à l'étuve pour que le solvant s'évapore (250°C pendant 30 min), et de répéter l'opération 3 à 4 fois afin d'obtenir une surface uniformément couverte d'une couche de Glaco™ [51]. Le Glaco™ a été utilisé comme revêtement pour des billes d'acier afin d'étudier la formation d'un film de vapeur autour de celles-ci lorsqu'elles étaient chauffées puis immergées dans l'eau [52]. Il a aussi été utilisé pour étudier la condensation de gouttelettes d'eau sur une surface SH [51]. Plus récemment, il a été utilisé dans des travaux sur l'entraînement sous l'eau d'un film d'air grâce à la superhydrophobie [12]. Il n'a cependant encore jamais été utilisé comme revêtement de capillaire ou de micro-canal. Dans toutes ces applications, il présente un angle de contact d'au moins 155,5°, et une rugosité de l'ordre de la centaine de nanomètres. Cette rugosité importante du Glaco™ est une des causes de sa superhydrophobie. La Figure 34 montre les images SEM et AFM d'une surface traitée au Glaco™, mettant en évidence la rugosité et la distribution statistique des particules.

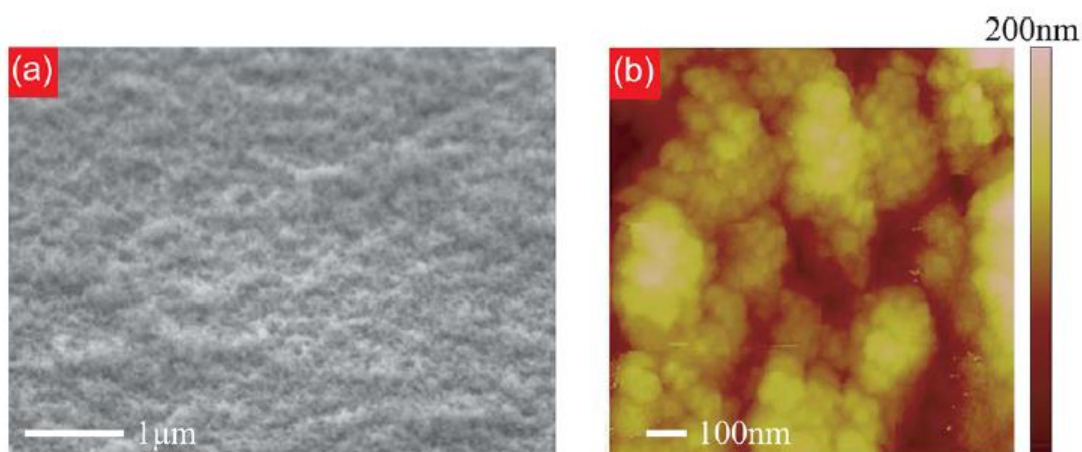


Figure 34: Image SEM (a.) et image AFM (b.) d’une surface lisse recouverte de Glaco™. Adapté de C. Lv et al. [51].

Une bille d’acier recouverte de Glaco™ posée à la surface de l’eau déforme cette dernière, un peu à la manière des pattes des gerridés (araignées d’eau, Figure 35). Si cette bille est totalement immergée, elle se recouvre d’un film d’air qu’elle entraîne avec elle, ce qui lui donne cet aspect argenté. La bille n’a donc aucune interaction directe avec l’eau, ce qui correspond bien à une superhydrophobie [52].

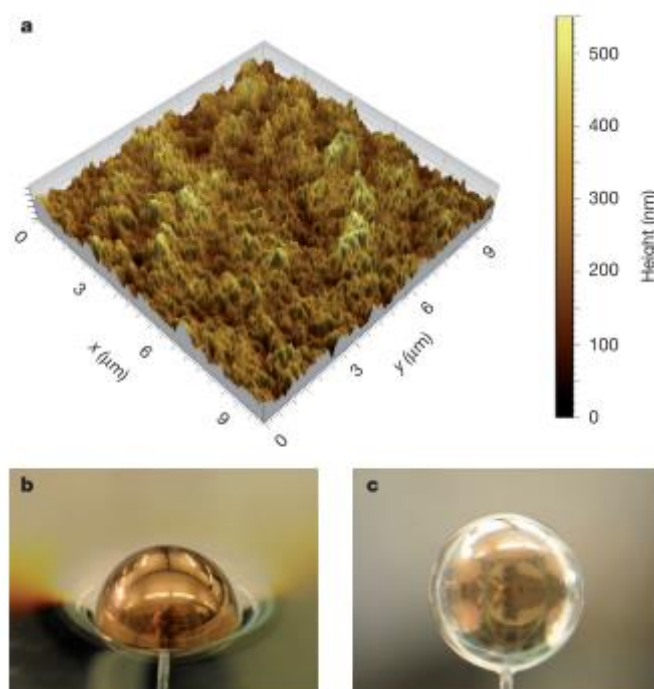
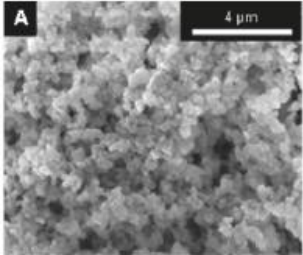
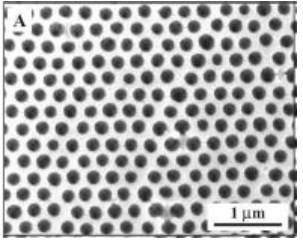
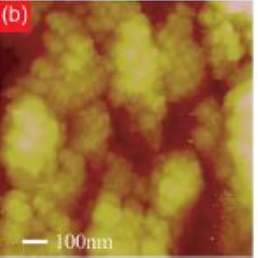


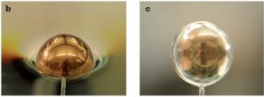
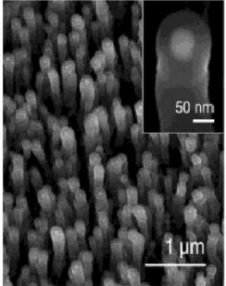
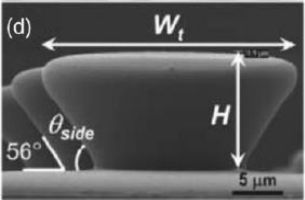
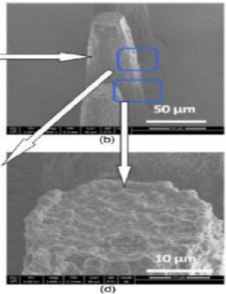
Figure 35: Représentation 3D d’une surface traitée au Glaco™ (a.) et photographies d’une bille d’acier traitée au Glaco™ posée à la surface de l’eau (b.) et sous l’eau (c.). Adapté de I. U. Vakarelski et al. [52].

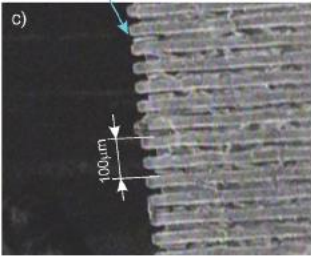
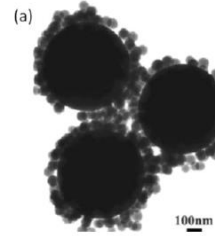
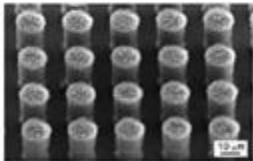
V. Exemple de matériaux aux surfaces superhydrophobes

Le Tableau 1 rassemble les différents revêtements SH présentés dans ce chapitre bibliographique, avec les caractéristiques d'angle de contact, de rugosité, de longueur de glissement, d'angle d'inclinaison et d'hystérésis (lorsqu'ils sont renseignés). Le Tableau 1 présente aussi, à titre de comparaison, certains revêtements hydrophobes ($\theta < 120^\circ$). Ce tableau montre l'importance de la structuration du matériau pour l'obtention de la superhydrophobie. Il montre aussi la variété de la nature chimique des revêtements permettant d'obtenir la superhydrophobie

Tableau 1: Exemples de revêtements superhydrophobes ($\theta > 120^\circ$). A titre de comparaison, certains revêtements hydrophobes sont mentionnés ($\theta < 120^\circ$). n.r., pour non renseigné: signifie que le paramètre en question n'a pas été mesuré/n'est pas indiqué).

	θ (angle de contact)	b (nm)	Nature et structure du revêtement	Rugosité (nm)	Angle d'inclinaison	Hystérésis	Référence
	167°	n.r.	Silice dopée par des colloïdes de xérogels fluorés	900	n.r.	n.r.	[46]
	155°	n.r.	Composite silice/polymère à surface modifiée par du trichlorosilane	n.r.	3-4°	1-2°	[53]
	155,5°	n.r.	Glaco™ sur une couche de silice	100-300	<5°	n.r.	[51]

	>160°	n.r.	Glaco™ sur de l'acier inox	n.r.	n.r.	n.r.	[52]
	170°	n.r.	Nanotubes de carbone alignés et fluorosililés	n.r.	n.r.	2°	[44]
	164,6°	n.r.	« bols » de PDMS	n.r.	n.r.	n.r.	[44]
	166°	n.r.	Composite de SU-8 et de PTFE sur du verre	n.r.	n.r.	n.r.	[44]

	156°	n.r.	PDMS rainuré	n.r.	n.r.	n.r.	[19]
	165°	n.r.	Nanoparticules de silice regroupées en « framboise »	n.r.	3°	2°	[44]
	73,1	n.r.	SU-8 lisse	n.r.	n.r.	n.r.	[44]
	95°	29	OTS sur verre	0.44	n.r.	n.r.	[40]
	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	[3]

Bien que les surfaces superhydrophobes aient été identifiées depuis longtemps (l'effet lotus a été caractérisé en 1997), les surfaces SH naturelles ont longtemps été plus performantes que celles synthétisées en laboratoire, car la nature atteint des niveaux de complexité contrôlée difficile à reproduire au laboratoire. Cette complexité et l'efficacité apportée par cette complexité sur le glissement de surface ont été illustrées par Ensikat et al. [54]. Leurs travaux montrent que les différences observées entre la superhydrophobie d'une surface régulière (moins élevée) et la superhydrophobie d'une surface statistique (plus élevée) proviennent du mécanisme de formation de la goutte sur ces surfaces. Ainsi, lorsqu'une goutte tombe sur une surface au relief irrégulier (voir Figure 36), elle repose d'abord sur toutes les aspérités, puis est repoussée par la superhydrophobie de la surface, jusqu'à ne plus être en contact qu'avec les reliefs les plus hauts, reposant alors quasiment uniquement sur de l'air. Dans le cas d'une surface régulière, tous les reliefs sont au même niveau, et la goutte repose sur tous leurs sommets, ce qui crée une interaction plus forte (voir Figure 36.d). Ainsi, bien que les surfaces régulières permettent une géométrie parfaitement contrôlée et une possible anisotropie des propriétés de la surface, elles atteignent la plupart du temps une superhydrophobie moins élevée qu'une surface au relief statistique.

La superhydrophobie a déjà été utilisée en micro et nanofluidique, notamment dans le cas de micropuces [55]. Cependant, les greffages SH utilisés sont la plupart du temps des greffages ordonnés afin de pouvoir modéliser les surfaces obtenues plus aisément que dans le cas de greffages à distribution statistique. De ce fait, les systèmes utilisés sont souvent des micro-canaux plutôt que des capillaires. Le Tableau 2 rassemble les différents greffages superhydrophobes utilisés en microfluidique en reprenant les principales caractéristiques, notamment la longueur de glissement (et la méthode utilisée pour cette mesure), et la géométrie du canal.

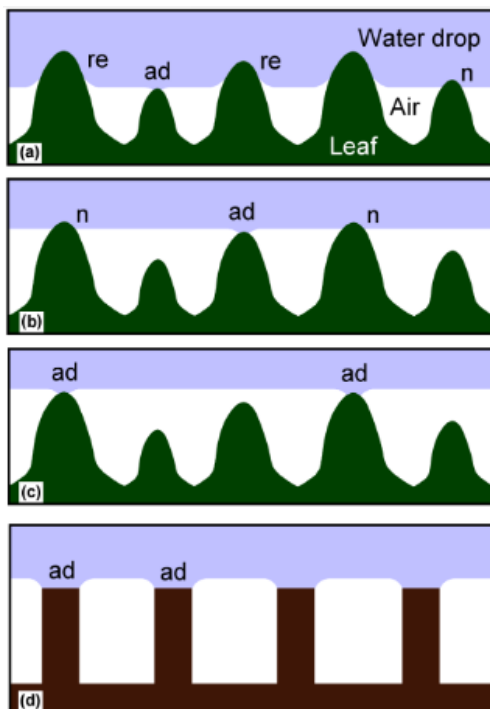


Figure 36: Schéma du contact entre l'eau et les plots superhydrophobes sous différentes pressions. A une pression modérée (a.), l'eau s'enfonce dans l'espace entre les plots, mais une couche d'air reste entre l'eau et le fond des cavités de la surface. La superhydrophobie des plots repousse l'eau (re). Lorsque l'eau s'éloigne, elle rompt le contact avec les plots les uns après les autres (b. et c.). A un certain moment, le ménisque est plat et les forces sont neutres (n). Juste avant une séparation totale, une force d'adhérence (ad) entre le sommet des plus hauts plots et l'eau constitue la seule surface de contact. Sur une surface artificielle régulière (d.), les plots ayant exactement la même taille, restent en contact avec la phase aqueuse, ce qui induit une plus grande surface de contact.

Tableau 2: Revêtements SH utilisés avec des méthodes hydrodynamiques et longueur de glissement correspondante.

b (nm)	Méthode de mesure de b	Nature/structure du revêtement	ΔP ou cisaillement	Géométrie	Référence
21-29 nm	TIRF	Octadecyltrichlorosilane (OTS) sur du verre	« Centaines de pascals »	Canal de 10 x 100 μm	[25]
920 nm	μPIV	OTS sur du verre (rugosité 2-3 Angström)	200 $\mu\text{L.h}^{-1}$	Canal de 30 x 300 μm	[56]
47 μm		ZnO sur du verre		2 disques séparés de 40 μm	[57]
80-100 nm	DF-FCS	OTS sur un polymère. Rugosité 0.7 nm	Taux de cisaillement: 800-3000 s^{-1}	Canal de 100 μm de large	[58]
3-5 nm	TIRF-FCCS	PDMS sur du verre (borosilicate)		5 cm x 4 mm x 100 μm	[59]
100-400 nm	TIRF	OTS ou FDS sur Al_2O_3	Taux de cisaillement: de 100 à 10000 s^{-1}	Deux disques parallèles séparés de 190 μm	[60]

5-10 nm	AFM	OTS silanisé		[61]
1-2 μm	μPIV	PDMS	Canal rectangulaire 40 x 100 μm	[62]
1 μm	μPIV	OTS	Canal rectangulaire 30 x 300 μm	[63]
63 nm	AFM + équation	Graphite	Surface plane	[64]
200 nm	μPIV	Polystyrène	Surface plane	[33]
70-220 μm		Revêtement de fibres tissées		[65]
1,2 μm				[66]
50 μm	TIRF	Feuille de laiton avec des trous de 150 μm		[13]
44 nm	CP-AFM	Rangées de cônes de silicone (10 nm à la pointe) couvertes de OTS	Surface plane de quelques cm^2	[67]

Centaine de nm		Feuille de lotus dans un tube millimétrique	Tubes de 7 à 19 mm de diamètre	[68]
180 μm	Rhéométrie	Plots ou rainures de silicone recouverts de téflon	Surface plane	[69]
7 μm	Différence de vitesse d'écoulement entre système avec et sans glissement	Cylindre de PDMS avec une paroi interne reproduisant la rugosité d'une feuille de lotus	Cylindre de diamètre interne 125 μm ,	[70]

VI. Comportement électrocinétique de surfaces superhydrophobes

De nombreuses modélisations ont été effectuées concernant des nano ou micro-canaux ayant des zones de leurs parois ne présentant aucune résistance au passage d'un fluide, mais peu d'expériences concrètes ont été menées, et celles-ci n'ont jamais été réalisées dans des capillaires mais sur des micro-puces ou microsystemes. Néanmoins, l'effet potentiel de la superhydrophobie sur l'écoulement électroosmotique (EOF), ainsi que les caractéristiques de l'EOF [71–73] dans des systèmes micrométriques [74] (et même nanométriques [75]) ont fait l'objet de nombreux calculs et modélisations.

VI.1. Modélisations de l'effet de glissement sur l'écoulement électroosmotique

Différents modèles ont été étudiés sur les effets du glissement sur l'EOF. Ces modèles prennent différents paramètres en compte, ce qui aboutit parfois à des conclusions opposées. La paroi SH est généralement modélisée comme présentant une alternance de zones sans glissement et de zones avec glissement, qui correspondent respectivement aux zones de la surface en contact direct avec le fluide et à celles où une bulle permet au fluide de glisser sur la surface.

- Certains modèles affirment qu'il n'y a aucun potentiel de surface générant un EOF au travers d'une bulle d'air, et qu'il y a une alternance entre des zones sans glissement mais avec EOF, et des zones sans EOF mais avec du glissement. Le fluide étant entraîné par l'EOF, seules les zones où il existe un potentiel de surface gouvernent le déplacement du fluide, et, même si les zones sans potentiel de surface n'entravent pas ce déplacement (puisqu'elles ont du glissement et ne présentent aucune perte de charge), elles n'aident en aucun cas au déplacement du fluide [76–78].

- D'autres modèles considèrent qu'il y a bien un potentiel de surface générant un EOF au travers d'une bulle d'air (quoique plus faible qu'en situation sans bulle). Dans ce cas, un capillaire superhydrophobe présentant des zones de glissement améliore le flux électroosmotique, ajoutant au déplacement dû au potentiel l'absence de perte de charge intrinsèque aux zones de glissement [79].

Ces deux grandes « familles » de modèles sont elles-mêmes subdivisées en différents cas particuliers. Certains, ayant comme postulat qu'il existe un potentiel électrique à travers la

bulle, prévoient la formation d'arcs électriques à travers cette bulle, d'autres n'en font pas mention [60,78]. Parmi les autres modèles prévoyant qu'il n'y a aucun potentiel là où il y a des bulles, certains affirment que non seulement les zones de glissement n'améliorent pas l'EOF, mais elles l'amouindrissent à cause de la rugosité créée par les bulles devenues concaves sous l'action du champ électrique, créant des turbulences supplémentaires s'opposant à l'écoulement du fluide.

La différence entre les modèles amenant à une augmentation de l'EOF par la présence de longueur de glissement à certains intervalles des parois, et les modèles concluant à une compensation entre glissement et absence de potentiel zéta à ces mêmes intervalles, trouve une explication possible dans l'alternance des intervalles ayant du glissement et des intervalles sans glissement entre les deux parois opposées d'un capillaire, comme illustré par la Figure 37 [80]. En prenant une coupe de capillaire (par analogie avec un nano-canal [80]), lorsque les deux parois opposées ont une alternance de zones avec et sans glissement en phase: les intervalles sans glissement n'améliorent pas l'EOF; l'intervalle formé de deux zones face-à-face sans glissement mais avec un potentiel zéta (interface solide-liquide) engendre un EOF; et l'intervalle suivant, formé de deux zones présentant du glissement (interface gaz-liquide), ne modifie rien. En revanche, si les deux parois opposées ne sont pas en phase dans leur alternance des zones de glissement et des zones sans glissement, l'EOF est amélioré. Cependant, l'effet combiné des deux parois opposées n'a d'influence que dans le cas où ces parois sont proches, c'est-à-dire lorsque le rayon du capillaire est à l'échelle nanométrique. Cet effet ne serait pas observable sur un capillaire de quelques dizaines de μm de diamètre interne.

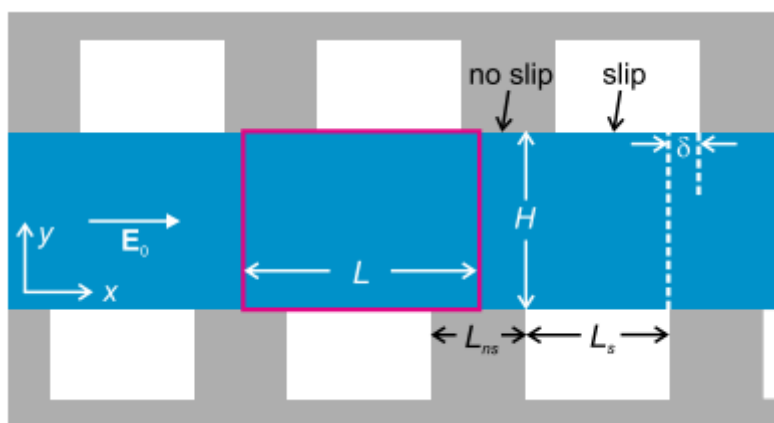


Figure 37: Schéma de la géométrie étudiée dans le cas d'un canal présentant des zones de glissement (nanobulles) et des zones de non-glissements. E_0 le champ électrique, L la longueur étudiée, avec L_s la part de cette longueur présentant du glissement et L_{ns} la part n'en présentant pas, et H la hauteur étudiée [80].

La vitesse de l'EOF selon le champ électrique et la longueur de glissement peut être exprimée ainsi [25]:

$$v(z) = -\frac{\varepsilon}{\eta} E \left[-\psi(z) + \psi_0(1 + b\kappa_{eff}) \right] \quad (14)$$

où $v(z)$ est la vitesse électroosmotique en fonction de l'altitude z , ε est la constante diélectrique de l'électrolyte, η est la viscosité, E est le champ électrique (en $V.m^{-1}$), $\psi(z)$ est le potentiel entre la paroi et une particule située à l'altitude z , $\psi(0)$ est le potentiel de surface (potentiel s'exerçant sur une particule à l'altitude $z = 0$, soit une particule contre la paroi), b est la longueur de glissement, et $\kappa = l/\lambda$, où λ est l'épaisseur de la couche de Reynolds.

Il est impossible de mesurer expérimentalement ψ . Mais, si on considère les deux potentiels équivalents, que le capillaire soit superhydrophobe ou non (ce qui est largement discutable), il est possible de déterminer b en faisant le rapport des deux débits:

$$\frac{Q_{GLISSEMENT}}{Q_{NO-SLIP}} = 1 + b\kappa_{eff} \quad (15)$$

où $Q_{GLISSEMENT}$ est le débit dans le capillaire avec du glissement et $Q_{NO-SLIP}$ est le débit dans le capillaire sans glissement.

VI.2. Applications électrocinétiques de surfaces superhydrophobes

Outre de nombreuses modélisations, quelques expériences en électrocinétique ont été réalisées sur des surfaces planes ou dans des micro-canaux (aucune dans des capillaires) ayant un revêtement superhydrophobe. Dans ces séparations, le flux électroosmotique et la longueur de glissement associée aux micro-canaux étudiés ont été parfois mesurés. Vourdas *et al.* ont, par exemple, fabriqué des surfaces de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) extrêmement rugueuses par « etching » au plasma de dioxygène, les rendant très hydrophiles [81]. Ils ont ensuite recouvert ces surfaces hydrophiles d'un film mince de téflon, ce qui les a rendues superhydrophobes. La mobilité électroosmotique est ainsi passée de $2.83 \times 10^{-4} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour la surface hydrophile à $3.89 \times 10^{-4} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour la surface SH, soit une augmentation d'environ 130%.

Bouzigues *et al.* ont étudié l'écoulement de particules fluorescentes sur les parois de canaux étant soit en verre soit en OTS. Bien que ce dernier revêtement ne donne qu'une surface hydrophobe, et pas SH, ils ont pu observer une augmentation de l'amplitude de l'EOF ainsi

qu'un glissement des particules observées par rapport à l'écoulement sur la paroi de verre, comme montré par la Figure 38 [25].

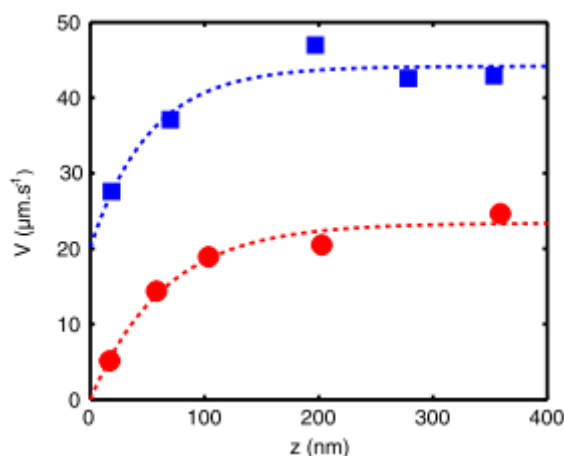


Figure 38 : Vitesse électroosmotique près de la surface de verre hydrophile (●) et de la surface d’OTS hydrophobe (■) en fonction de la position par rapport à la paroi (z étant la distance à la paroi). Concentration en sel $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Champ électrique $E = 500 \text{ V.m}^{-1}$. Longueur de glissement sur le verre $b = 0 \pm 10 \text{ nm}$ et sur l’OTS $b = 38 \pm 6 \text{ nm}$.

Papadopoulos *et al.* ont comparé les mobilités électrophorétiques de colloïdes de polystyrène (PS) sur différentes surfaces [82]. Comme le montre le Tableau 3, la mobilité électrophorétique est améliorée sur un revêtement SH par rapport à une surface hydrophile. En revanche, dans le cas de revêtement donnant des profils de mouillage hybrides, il semble impossible de dégager une grande tendance de l'influence de la superhydrophobie sur les mobilités (électrophorétiques, et par extension, puisqu'il s'agit toujours des mêmes colloïdes, électroosmotiques). Certaines surfaces augmentent la mobilité, et d'autres la diminuent, et semblent adsorber une grande partie des colloïdes.

Tableau 3 : Mobilité électrophorétique apparente de colloïdes de polystyrène sur des surfaces de différents degrés d'hydrophilie/hydrophobie. La fraction de colloïdes mobiles comparée aux colloïdes adsorbés est indiquée dans la dernière colonne.

	Mobility close to the surface ($10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Fraction of mobile colloids (%)
Coating 1: hydrophilic	-3.4 ± 1.0	>90
Coating 2: superhydrophobic, Cassie	-4.6 ± 1.0	>90
Coating 3: Cassie composite, Ar plasma treated	-4.8 ± 1.0	20
Coating 4: Cassie composite, PEI treated	-1.8 ± 0.5	<10
Coating 5: Cassie composite, PSS treated	-6.1 ± 0.4	>95

Enfin, une expérience menée par Duffy *et al.* compare la séparation d'une protéine par électrophorèse sur un microcanal de PDMS oxydé (hydrophobe) ou dans un capillaire de silice vierge (hydrophile) (Figure 39) [83].

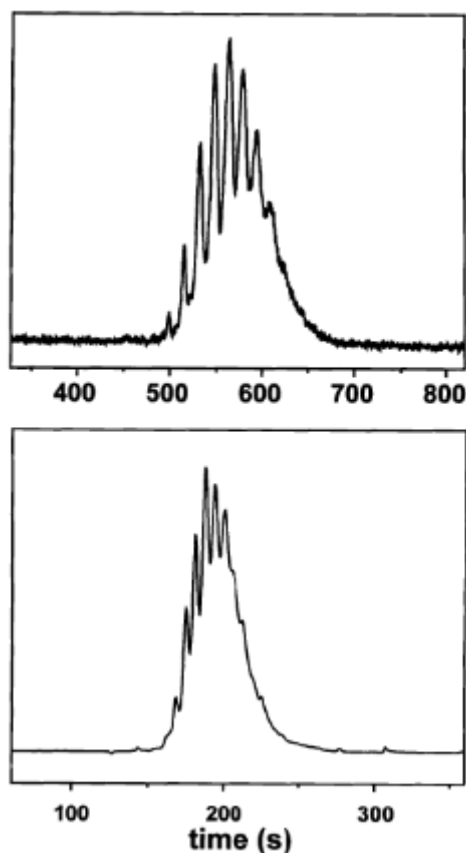


Figure 39 : Electropherogrammes de l'anhydrase carbonique bovine marquée par fluorescence. Electrolyte support : 25 mM Tris/192 mM Glycine, pH 8.4. Le microcanal de PDMS oxydé (top) fait 42 cm de long (35 cm au détecteur) et a une section de $50 \times 50 \mu\text{m}$ et la tension appliquée est 5 kV. Le capillaire de silice vierge (bottom) le capillaire de I.D. $50 \mu\text{m}$ fait 37 cm de long (30 cm au détecteur), et la tension appliqué de 15 kV.

Bien que de nombreux paramètres diffèrent entre les deux systèmes (canal carré/capillaire et champ électrique), Duffy *et al.* concluent que l'usage d'un revêtement hydrophobe améliore les efficacités de séparation de leur protéine.

En conclusion, assez peu d'expérimentations ont été menées sur l'effet de la superhydrophobie sur l'écoulement électroosmotique et sur les efficacités de séparation, mais la tendance semble aller dans le sens d'une augmentation de l'amplitude de l'EOF. De plus, ces quelques expériences sont la preuve qu'il est possible d'appliquer un champ électrique sur une surface superhydrophobe immergée et de faire migrer des particules grâce à ce champ sans que cela pose problème vis-à-vis de la surface superhydrophobe où des nano-bulles sont présentes.

Partie 2 : Les revêtements SMIL

Si la superhydrophobie peut constituer un moyen original de s'affranchir des problèmes d'adsorption à la surface des capillaires, il existe des revêtements de capillaire plus classiques permettant de limiter l'adsorption des solutés/protéines à la surface des capillaires. Des polymères neutres (type oxyde de polyéthylène (PEO) ou polyacétate de vinyle (PVA)) ou cationiques sont souvent utilisés pour limiter l'adsorption des analytes. Des systèmes multicouches de polyélectrolytes (« Successive Multi Ionic polymer Layers » (SMIL)) sont également proposés dans la littérature. Ils présentent l'avantage d'être relativement simples à mettre œuvre et offrent une grande variété de paramètres physicochimiques ajustables. La nature des polyélectrolytes dans les différentes couches (force de l'acido-basicité des groupements chargés, densité de charge, nature chimique du squelette, rigidité) a une influence directe sur la robustesse du greffage SMIL (et donc la répétabilité/reproductibilité des mesures) ainsi que sur les efficacités de séparation [84]. Il est également possible de moduler l'amplitude de l'EOF [85], et donc le temps d'analyse.

I. Principe d'un revêtement SMIL

Un revêtement SMIL est constitué de plusieurs couches successives de polyélectrolytes différemment chargés (généralement un polycation et un polyanion) déposés en alternance, chaque couche adhérant à la précédente par interaction électrostatique (Figure 40). Une première couche de polycation est déposée sur la silice vierge (chargée négativement du fait de ses groupements silanols déprotonnés), puis les couches suivantes sont déposées jusqu'à obtenir le revêtement SMIL désiré. La dernière couche peut être anionique ou cationique, en fonction de la charge apparente voulue. La construction *in situ* d'un SMIL s'effectue par des rinçages successifs de solutions de polycations et de polyanions. Le capillaire est rincé entre chaque dépôt avec le même tampon de construction. En terminant le SMIL par un polycation, on évite (ou du moins on limite) l'adsorption de (poly)cations à la surface du capillaire (Figure 41).

L'atout majeur de l'usage des SMIL plutôt que d'autres méthodes de modification de la charge de surface du capillaire, est que leur mise en œuvre est simple, et permet de grandes modulations selon les effets recherchés, et le greffage obtenu est, de plus, très robuste.

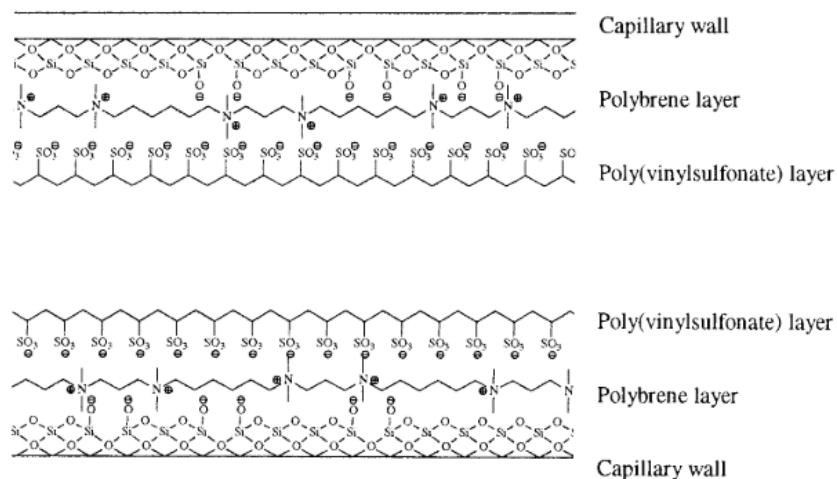


Figure 40: Schéma d’une double couche de polyelectrolyte formée par l’adsorption de polybrène (PB) (polycation) puis de poly(vinylsulfonate) (PVS) (polyanion). Adapté de [86].

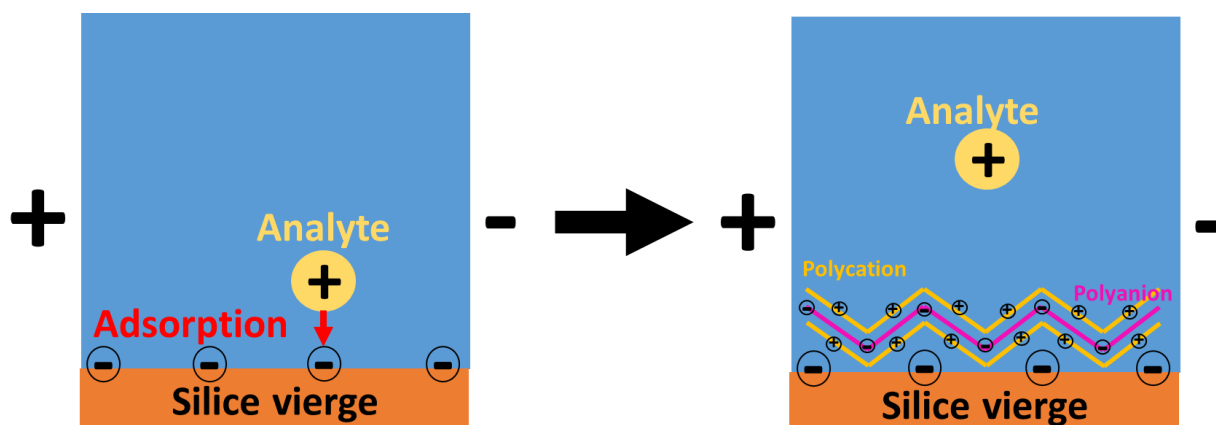


Figure 41: Schéma de l’effet d’un greffage SMIL sur l’adsorption en surface d’un analyte cationique. Les greffages SMIL suivent un procédé de mise en œuvre comprenant typiquement les étapes suivantes:

- 1- Activation du capillaire par un rinçage avec de la soude (pour déprotonner les groupes silanols à la surface du capillaire), puis avec le tampon de construction.
- 2- Application de la première couche de polycation par rinçage du capillaire. Les charges positives du polyelectrolyte interagissent électrostatiquement avec les groupes silanolates négativement chargés.
- 3- Rinçage du capillaire par le même tampon de construction pour enlever le polycation en excès.
- 4- Application de la première couche de polyanion par rinçage du capillaire avec la solution de polyanion. Les charges négatives interagissent électrostatiquement avec les charges positives non compensées du polycation.

- 5- Rinçage du capillaire par le même tampon de construction pour enlever le polyanion en excès.
- 6- Répétition des étapes 2 à 5 jusqu'au dépôt du nombre de couches désiré, en alternant à chaque fois polycation et polyanion.

Ces étapes sont résumées dans la Figure 42.

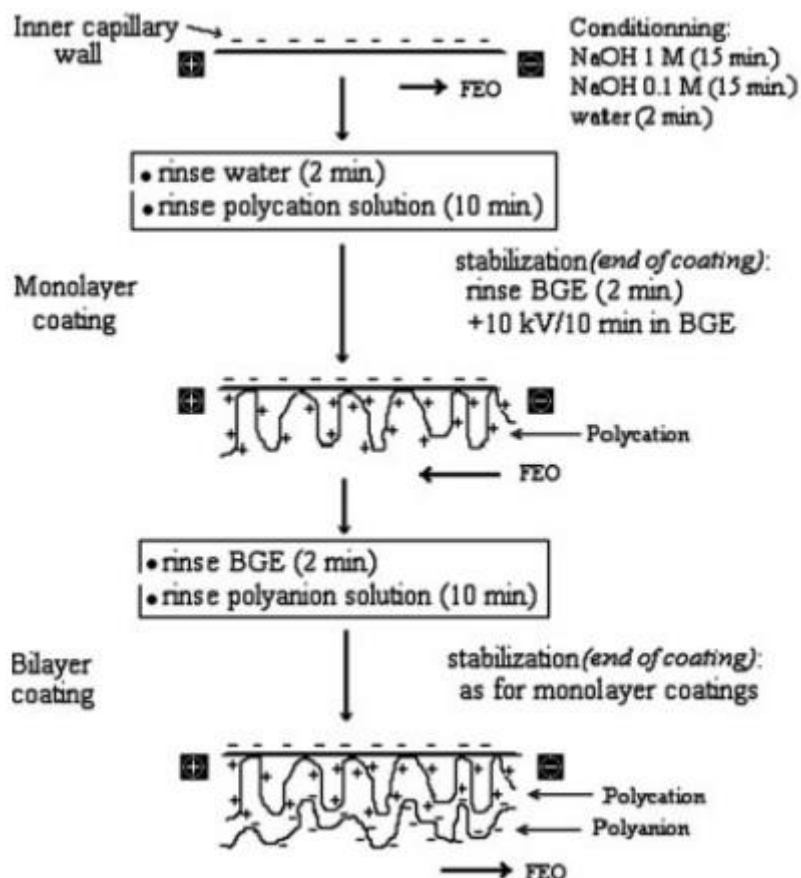


Figure 42: Méthode de greffage classique d'un revêtement SMIL. Adapté de [85].

Les temps de rinçage, les caractéristiques du tampon de construction (nature, force ionique, pH), la température et la nature du couple de polyélectrolytes, sont des paramètres ajustables. A la fin de l'étape 6, il est parfois nécessaire d'y ajouter une étape, qui consiste en l'application d'un champ électrique, afin de stabiliser les différentes couches du SMIL et l'EOF.

II. Historique et exemple d'applications des SMIL en CE

II.1. Séparations en CE et CE/MS

Historiquement, les SMIL ont été introduits par l'équipe de G. Decher à la fin des années 90. Par la suite, les SMIL ont été utilisés pour de très nombreuses applications. Le premier greffage

SMIL appliqué à des séparations en CE a été développé par Katayama et al. en 1998 [88]. Constitué d'une couche de PB et d'une couche de sulfate de dextrane (DS), il forme un revêtement anionique permettant la séparation de protéines acides dans un tampon phosphate (pH 7.0) de manière répétable sur plus de 100 analyses (voir section II.2.). Ce greffage PB-DS a ensuite été étendu à un greffage 3 couches (PB-DS-PB) pour la séparation de protéines basiques dans un tampon phosphate (pH 3). La Figure 43 compare une séparation de protéines sur une capillaire greffé SMIL et sur un capillaire revêtu de polyéthylène glycol (PEG). Ce même revêtement SMIL a aussi été utilisé pour l'analyse par couplage CE/MS de β -bloquants dans un tampon formate (pH 2.3) (Figure 44) [89].

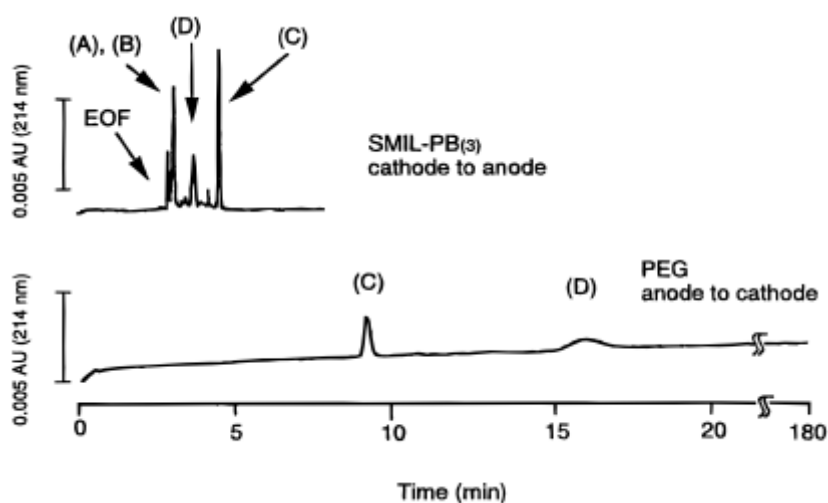


Figure 43 : Comparaison des électrophérogrammes d'un mélange de protéines obtenus sur un capillaire 3 couches SMIL (PB-DS-PB) ou PEG à pH 9. Dimensions du capillaire : 50 μ m I.D. \times 27 cm (20 cm au détecteur). Electrolyte support : tampon borate pH 9. Tension appliquée 7 kV. Détection : 214 nm. Echantillon : (A) R-chymotripsinogène A, (B) ribonucléase A, (C) lysozyme, and (D) cytochrome C.

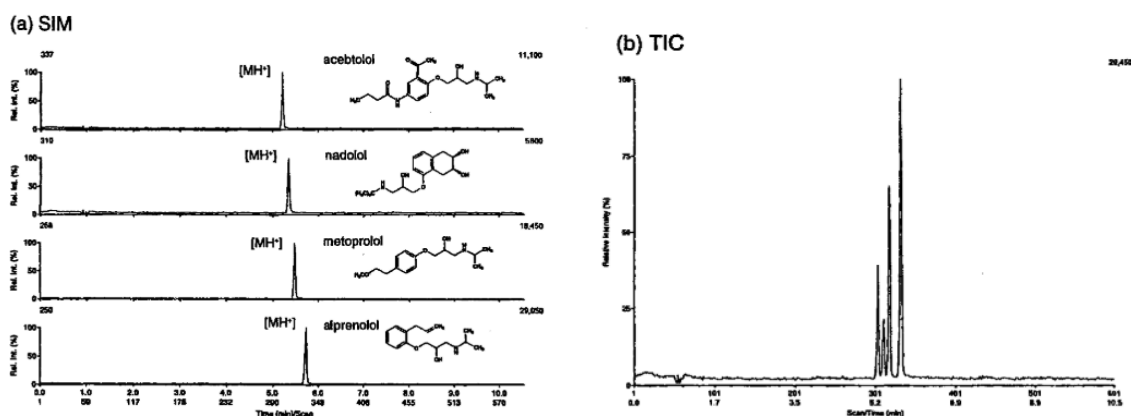


Figure 44: Analyse CE/MS de β -bloquants dans un tampon formate (pH 2.3), montrant les ions sélectionnés (a) et le chromatogramme total (b). Conditions expérimentales: Tension appliquée en CE - 5 kV. Tension appliquée pour l'électrospray +5 kV. Tampon de séparation: formate 0.5% (v/v), pH 2.26. Gaine liquide (sheath liquid): tampon phosphate de séparation et acetonitrile (25/75). Dimensions du capillaire: 40 cm \times 50 μ m I.D. Injection hydrodynamique manuelle.

D'autres revêtements SMIL anioniques ont par la suite été étudiés par Bendahl et al.(2001) [86]. Un SMIL bicouche composé de PB et PVS (poly(acide vinylsulfonique)) a été utilisé pour la séparation de petites molécules organiques (imidazole, *N*-benzylmethylamine, hydrochlorure de phenylpropanolamine, hemisulfate de terbutaline et alcool benzylique) par électrophorèse capillaire de zone (CZE) et chromatographie micellaire électrocinétique (MEKC). La Figure 45 compare les séparations obtenues sur un capillaire de silice vierge et sur un capillaire greffé SMIL.

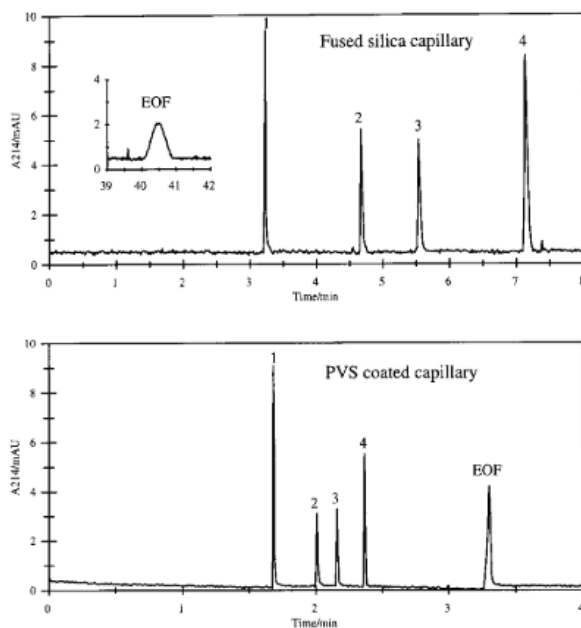


Figure 45: Séparation de quatre composés dans un capillaire de silice vierge (haut) et dans un capillaire greffé SMIL (bas). Attribution des pics: 1, imidazole ; 2, *N*-benzylmethylamine ; 3, phenylpropanolamine ; 4, terbutaline. Conditions expérimentales: capillaire: 55 cm longueur totale (46.8 cm au détecteur) x 50 μ m I.D., BGE: 25 mM NaCl + 5 mM KH_2PO_4 (pH 2), tension appliquée +25 kV, détection 214 nm. Le pic marquant la sortie du flux électroosmotique dans le capillaire de silice vierge est présenté en insert en haut à gauche. Adapté de [86].

Ce greffage PB-PVS a été aussi utilisé par Catai et al. [90] pour la séparation de protéines dans des tampons Tris-phosphate ou sodium-phosphate (pH 7). Catai et al. ont montré que l'efficacité de séparation des protéines est grandement affectée par la concentration de l'électrolyte support. Haselberg et al. ont ensuite étudié un greffage 3 couches (PB-DS-PB) pour l'analyse de protéines intactes dans un tampon Tris-phosphate ou acide acétique, en CE et CE/MS (Figure 46) [91].

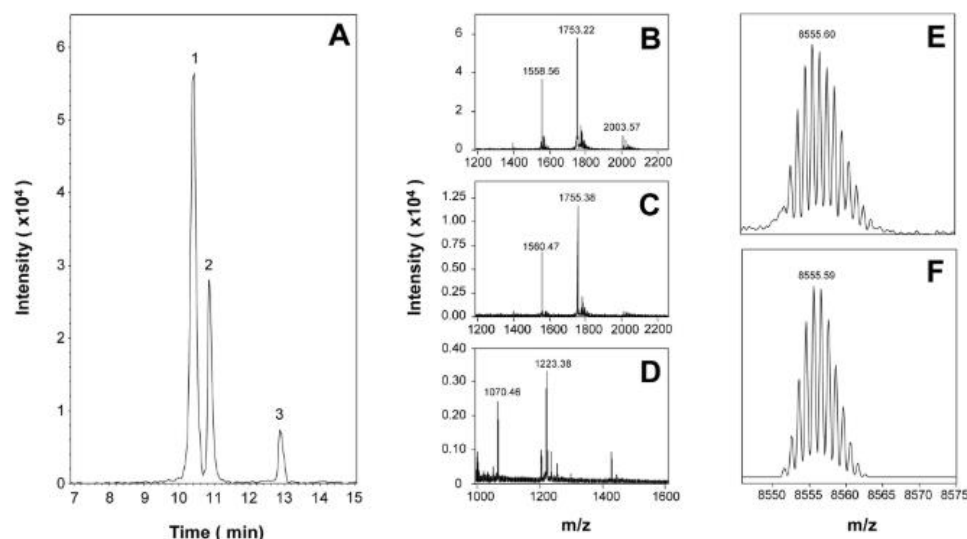


Figure 46: CE-ESI-TOF-MS de 14 μM de VHH-A52 (anticorps de lama). (A) Electrophérogramme brut obtenu dans l'intervalle de 1000 à 3000 de m/z . (B-D) Spectre de masse moyen obtenu à partir des pics 1,2, et 3, respectivement. (E) Spectre de masse déconvolué du pic 3. (F) **Massif isotopique** théorique de *S. cerevisiae ubiquitin* ($\text{C}_{375}\text{H}_{625}\text{N}_{105}\text{O}_{120}\text{S}_1$). Conditions expérimentales: capillaire greffé par un SMIL 3 couches PB-DS-PB, longueur totale du capillaire 100 cm, BGE: tampon acide acétique 175 mM (pH 2.7). Adapté de [91].

D'autres séparations de protéines ont été réalisées par Schlenoff et al. à l'aide de revêtements multicouches de polyélectrolytes forts: le chlorure de poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMA) et le polystyrène sulfonate (PSS). Les séparations ont donné des efficacités entre 150 000 et 200 000 plateaux. m^{-1} , selon les protéines et le pH utilisé. Aucune adsorption irréversible des protéines n'a été observée [92].

Enfin, des revêtements SMIL ont été étudiés dans le cas de séparations chirales (avec l'héparine comme sélecteur de chiralité) [93]. Ils ont aussi été utilisés en combinaison avec la MEKC pour la séparation chirale et achirale de petites molécules [94].

II.2. Stabilisation de l'écoulement électroosmotique et répétabilité/reproductibilité.

La Figure 47 montre le nombre de runs durant lesquels l'EOF reste stable sur des capillaires greffés avec 1 couche (PB) et 3 couches (PB-DS-PB) SMIL.

Katayama et al. constatent que les SMIL permettent: (i) un gain en efficacité de séparation, (ii) une modification/modulation de l'EOF, (iii) une stabilisation de l'EOF sur une large gamme de pH en choisissant des polyélectrolytes forts (Figure 48). A titre d'exemple, dans la Figure 48, l'EOF généré par une couche de PB (polycation) est de signe opposé à celui engendré par le

capillaire de silice vierge, et reste constant de pH 2 à pH 13, contrairement à la silice vierge où la mobilité électroosmotique varie entre pH 3 et pH 5.

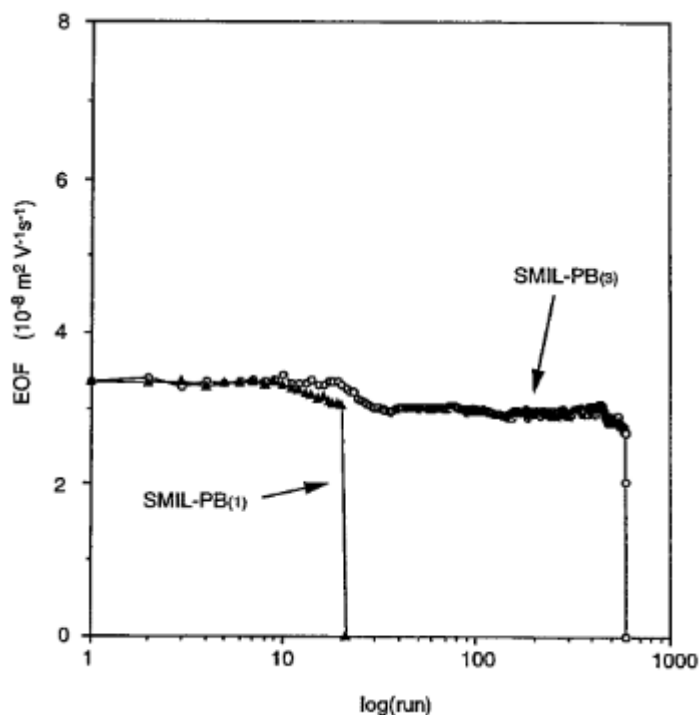


Figure 47: Robustesse d'un capillaire SMIL greffé monocouche (SMIL-PB(1)) et 3 couches (PB-DS-PB nommé SMIL-PB(3)). Conditions expérimentales: détection 214 nm, tension appliquée 7 kV, tampon phosphate pH 3.0, capillaire 27 cm longueur totale (20 cm au détecteur) \times 50 μm I.D. Adapté de [89].

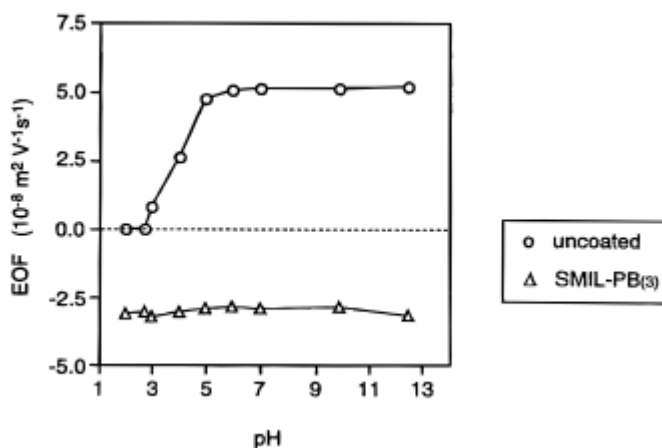


Figure 48: Mobilité électroosmotique d'un capillaire de silice vierge et d'un capillaire greffé cationique (3 couches, PB-DS-PB). Conditions expérimentales: Détection 214 nm, Tension appliquée 7 kV, Electrolytes: tampon phosphate à pH 2-3, acétate à pH 4-5, phosphate à pH 6-7, et borate à pH 8-13. Capillaire de longueur 27 cm (20 cm jusqu'au détecteur) \times 50 μm I.D. Adapté de [89].

Cette stabilisation de l'EOF permet une plus grande reproductibilité des séparations électrophorétiques grâce aux greffages SMIL (Figure 49 et Figure 50).

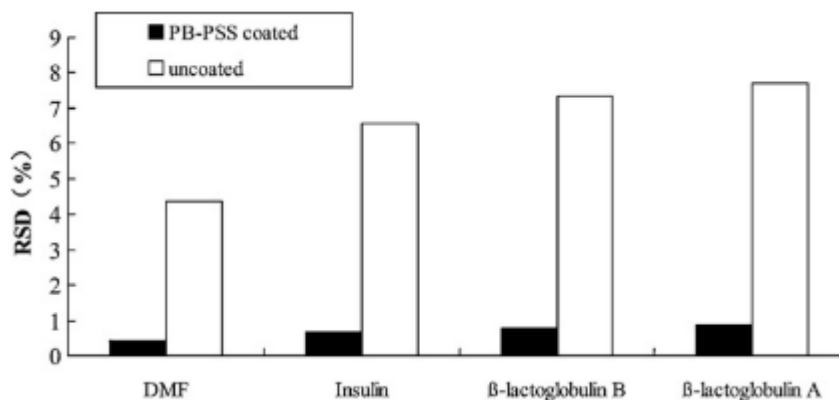


Figure 49: Comparaison de la reproductibilité des temps de migration pour l'analyse de protéines en CE entre un capillaire de silice vierge et un capillaire greffé SMIL (PB-PSS). Conditions expérimentales: Capillaire de longueur 55 cm (46.7 cm jusqu'au détecteur) x 50 μ m I.D. Tampon Tris-phosphate pH 7.5. Tension appliquée 25 kV. Détection 220 nm. Injection hydrodynamique 35 mbar, 6s. Adapté de [95].

La Figure 50 montre les gains en efficacité et en répétabilité obtenus sur un capillaire greffé SMIL par rapport à un capillaire de silice vierge.

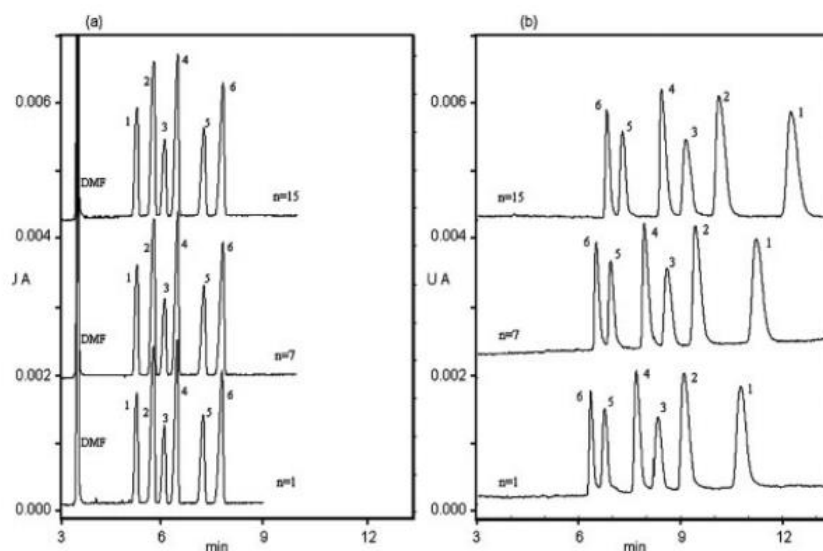


Figure 50: Répétabilité des mesures pour la séparation de peptides. Electrophérogrammes obtenus pour les 1^{ère}, 7^{ème} et 15^{ème} injections sur (a) un capillaire greffé SMIL 5 couches (PDADMA et PSS) et (b) un capillaire de silice vierge. Identification: 1, Val₄; 2, Ala₄; 3, Leu-Gly-Gly; 4, Ala₃; 5, D-Ala-Ala; 6, Ala₂.

En plus du gain en efficacité de séparation Zheng et al. ont utilisé un SMIL bicouche composé de PB et de poly(styrène sulfonate) (PSS) pour l'étude de la stabilité de séparation de protéines allergènes dans les fluides gastro-intestinaux dans différents tampons: borate (pH 8.5), Tris-phosphate (pH 7.5) ou phosphate (pH 2.5) [95]. La Figure 51 donne les résultats obtenus pour la séparation dans le tampon Tris-phosphate à pH 7.5. Le RSD sur les temps de migration est beaucoup plus faible sur un capillaire greffé SMIL que sur un capillaire de silice vierge, d'où une meilleure reproductibilité des mesures et une meilleure stabilité du revêtement.

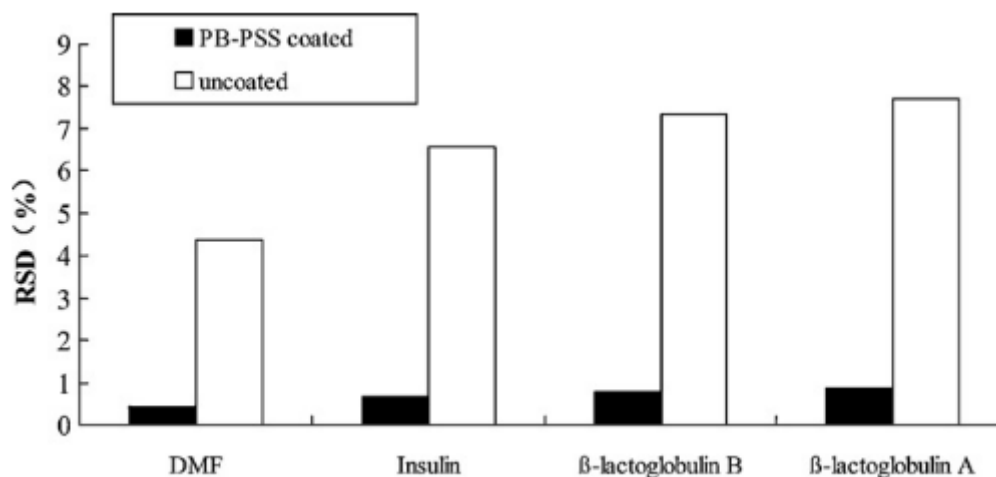


Figure 51: Comparaison de la reproductibilité sur les temps de migration pour l'analyse de protéines par CE entre un capillaire greffé SMIL (PB-PSS) et un capillaire de silice vierge. Conditions expérimentales: longueur totale du capillaire 55 cm (46.7 cm au détecteur) x 50 μm I.D., BGE: tampon 400 mM Tris- H_3PO_4 (pH 7.5), tension 25 kV, détection 220 nm, injection hydrodynamique: 35 mbar, 6 s. Adapté de [95].

III. Paramètres d'optimisation des SMIL

Nehmé et al. [85] ont étudié l'influence de nombreux paramètres expérimentaux (force ionique (0.01, 1.5, 4.5 mM), concentration en polyélectrolytes (0.04, 0.2, 1% w/v), nombre de couches (1, 3, 11), temps de rinçage (5, 10, 15 min), stabilisation ou non après greffage, conditions de stockage et de régénération) sur l'efficacité de séparation de peptides [85] et de protéines [96] dans un tampon Tris-phosphate (pH 2.5). Il a été montré que lorsque la concentration en sel de la solution de greffage (et de rinçage) augmente, l'épaisseur du greffage multicouche augmente de manière linéaire. Par ailleurs, les meilleures séparations ont été obtenues avec 5 couches de PDADMA et de PSS, une force ionique de 1.5 M pour le tampon de construction et une concentration en polyélectrolytes d'au moins 0.2 % (w/v).

L'influence de changements dynamiques dans le pH de l'électrolyte support (i.e. le changement de pH du tampon au cours d'une même analyse) sur l'EOF a été étudiée par Sword et al. en utilisant des couples de polyélectrolytes forts ou faibles [97]. Les auteurs ont remarqué que les changements de pH n'affectent pas les greffages construits avec des polyélectrolytes forts (pas de variation de l'EOF), mais que des changements, parfois irréversibles, sont observés dans le cas de greffages de polyélectrolytes faibles.

L'épaisseur et la morphologie des greffages SMIL ont été étudiées par AFM sur des greffages monocouches (PB), bicouches (PB-PVS et PB-DS) et 3 couches (PB-PVS-PB et PB-DS-PB)

[98]. Il s'est avéré que l'épaisseur du greffage dépendait du nombre de couches (ce qui était attendu), mais aussi de la salinité des solutions utilisées.

Des greffages SMIL constitués de deux ou quatre couches de polyélectrolytes PDADMA et DS ont été utilisés pour la séparation de variantes d'allergènes recombinants dans un tampon bicarbonate d'ammonium (pH 6.7) permettant le couplage en MS, et présentant d'excellentes répétabilité et reproductibilité [99].

Peu de travaux ont cherché à établir des corrélations entre les propriétés physicochimiques des polyélectrolytes utilisés comme greffage SMIL de capillaire (masse molaire, nature, densité de charge) et les efficacités de séparation. Il faut néanmoins citer deux études récentes sur l'influence de la nature du couple de polyélectrolytes et des conditions expérimentales (nombre de couches, force ionique, pH, nature du tampon de construction et de séparation) sur l'écoulement électroosmotique et les performances séparatives (efficacité des séparations, répétabilité et reproductibilité des mesures sur 100 runs) pour la séparation d'un mélange de protéines intactes de caractéristiques différentes (pI, taille, mobilité) en milieu acide compatible avec la spectrométrie de masse [84,100]. L'écoulement électroosmotique s'étale sur 23 TU (-39 à -62 TU, en fonction de la nature du polycation). Les efficacités de séparation sont non seulement dépendantes de la nature du polycation en couche terminale mais aussi de la nature du polyanion dans les couches intermédiaires. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un revêtement SMIL 5 couches construit avec un tampon 20 mM HEPES 10 mM NaOH (pH 7.4) sans sel ajouté. Les meilleurs SMIL associent le poly(L-lysine citramide) (PLC) comme polyanion (suivi de l'acide polyméthacrylique (PMA) et PSS)) et PB, PDADMA, la poly(ϵ -lysine) (ϵ PLL) ou le diéthylaminoéthyl dextrane quaternisé (DEAEDq) comme polycations avec un RSD sur les temps de migration inférieur à 1%. Si aucune corrélation évidente n'a pu être établie entre les propriétés physicochimiques des polyélectrolytes et les performances des différents greffages SMIL, il a néanmoins été constaté que les polyélectrolytes de faible densité de charge donnent les meilleurs résultats. De manière générale, ces études montrent la complexité des paramètres physicochimiques influençant le flux électroosmotique (tels que l'épaisseur et la densité des couches SMIL, la répartition des charges, et l'interpénétration des couches de polyélectrolytes).

III.1. Nature du couple de polyélectrolytes

Dans la littérature, les polyélectrolytes les plus couramment utilisés sont PB et PDADMA pour le polycation, DS et PSS, ou PVS, pour le polyanion. Plus récemment, Bekri et al. [84] et

Leclercq et al. [100] ont comparé un grand nombre de couple de polyélectrolytes comme revêtements SMIL en termes d'écoulement électroosmotique, d'efficacité de séparation et de stabilité (répétabilité intra-capillaire et reproductibilité intercapillaires) pour la séparation de protéines (lysozyme (Lys), β -lactoglobuline (β -lac), ribonuclease A (RNase A), myoglobine (Myo), inhibiteur de trypsine (TI)) en milieu acide acétique. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence l'importance non seulement de la nature du polycation en couche terminale, mais aussi de la nature du polyanion dans les couches intermédiaires [84]. La Figure 52 montre différentes séparations électrophorétiques de mélanges de protéines dans l'acide acétique obtenues pour différents revêtements SMIL [84]. Le Tableau 4 compare les valeurs de mobilité électroosmotique, d'efficacité de séparation, ainsi que de RSD sur les temps de migration des protéines.

Tableau 4: Tableau récapitulatif des couples de polyélectrolytes étudiés comme revêtements SMIL pour la séparation de mélanges de protéines en milieu acide incluant la mobilité électroosmotique μ_{eof} , l'efficacité de séparation (exprimée par N/l), et la stabilité (exprimée par leur déviation standard sur les temps de migration des analytes $RSD\% t_m$). Adapté de [84].

Polycation	Polyanion	Rank	Non-crosslinked multilayers			Crosslinked multilayers		
			μ_{eof} ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	N/l (10^3 plates/m)	$RSD\% t_m$	μ_{eof} ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	N/l (10^3 plates/m)	$RSD\% t_m$
PDADMA	Plc	1	-54.6	126	0.8			
PDADMA	PSS	2	-54.7	85	3.2			
PDADMA	Pma	7	-55.0	68	0.2			
PDADMA	Paa	18	-50.4	25	6.5			
Plys	Plc	3	-54.6	81	1.7			
Plys	Paa	4	-43.1	76	>20	-55.5	64	0.8
Plys	Pglu	8	-54.9	63	1.4			
Plys	PSS	21	-46.4	17	18.2			
Plys	Ha	22	-48.7	13	>20	-59.8	15	0.7
P(Lys ₈₀ Tyr ₂₀)	Plc	5	-51.8	74	0.4			
P(Lys ₇₅ Ser ₂₅)	Plc	16	-53.7	54	>20			
P(Lys ₇₅ Ser ₂₅)	Ha	23	-45.4	8	>20			
Paam	Plc	6	-50.0	69	4.0			
Paam	Pma	9	-54.8	62	0.2	-61.0	112	1.3
Paam	Paa ₂₀ am ₈₀	12	-50.2	57	7			
Paam	Paa ₈₀ am ₂₀	14	-50.8	55	4.7			
Paam	Paa	15	-53.7	55	0.9	-66.0	88	0.8
Pdmaema	Pma	10	-52.2	60	0.2			
Pdmaema	Paa	13	-51.6	57	0.3	-55.8	54	0.2
Pdmaema	Plc	17	-51.9	38	2.8			
Deaed	DS	11	-42.4	59	>20			
Pei	Paa	19	-45.7	24	0.5	-69.9	41	1.3
Pei	Pma	20	-45.5	22	0.8			

PDADMA: poly(diallyl dimethyl ammonium), PLys: alpha poly(L-Lysine), P(Lys₈₀Tyr₂₀): polypeptides basé sur des résidus de lysine et de tyrosine, P(Lys₇₅Ser₂₅): polypeptides basés sur des résidus de lysine et de sérine, Paam: Poly(allylamine), Pdmaema: Poly(diméthylaminoéthyl méthacrylate), Deaed: Diéthylaminoéthyl dextrane, Pei: polyéthylèneimine, Plc: Poly(L-Lysine citramide), PSS: Poly(styrène sulfonate) de sodium, Pma: Poly(acide méthacrylique), Paa: poly(acide acrylique), Pglu: Poly(L-glutamic acid), Ha: hyaluronic acid, Paa₂₀am₈₀ and Paa₈₀am₂₀: poly(acide acylique co-acrylamide) à 2 ratios différents aa/am, DS: sulfate de dextrane.

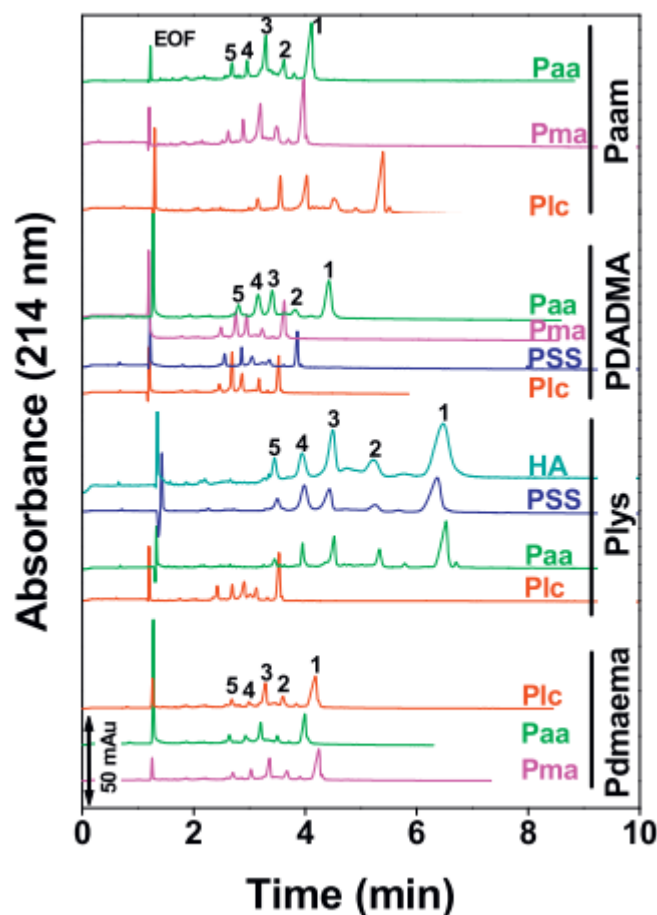


Figure 52: Influence de la nature des couches de polyélectrolytes sur les séparations électrophorétiques de cinq protéines modèles. Conditions expérimentales: Greffage SMIL 5 couches. Longueur totale du capillaire: 40 cm (29.6 cm au détecteur) \times 50 μ m I.D. Injection hydrodynamique: 30 mbar, 4 s. Electrolyte support: tampon acide acétique 0.5 M (pH 2.5). Tension appliquée: -30 kV. Identification des pics: Lys (1), β -lac (2), RNase A (3), Myo (4), TI (5), chacune à 1 g.L^{-1} dans l'eau. Température: 25°C. Détection: 214 nm. Adapté de [84].

Leclercq et al. ont étudié les greffages SMIL 5 couches en utilisant PB, ϵ -PLL et DEAEDq comme polycation. Les ordres de grandeur des temps de migration sont très différents, allant d'environ 3-4 min sur PB, à 6-7 min sur ϵ -PLL, et jusqu'à 20 min au moins sur DEAEDq, du fait de la grande gamme de mobilité électroosmotique obtenue (de -39.5 à -62.6 TU), comme cela est montré à la Figure 53. L'EOF décroît selon l'ordre PB > ϵ -PLL > DEAEDq. La possibilité de modifier l'EOF selon la nature du polycation (et du polyanion) sur un intervalle aussi large est intéressant d'un point de vue pratique, puisque cela permet d'accélérer les analyses, ou au contraire de gagner en résolution en diminuant la mobilité électroosmotique. Le RSD sur les temps de migration est généralement très bon (en dessous de 3-4%). La répétabilité intra-capillaire sur les temps de migration est très bonne (RSD inférieur à 2.5%, avec une moyenne sur 18 capillaires testés de 1.3%, sur la base de 7 séparations par capillaire, le RSD étant moyenné à chaque fois sur les 5 protéines séparées). La répétabilité sur la mobilité

electroosmotique est aussi très bonne (RSD inférieur à 1.1% avec une moyenne de 0.6% sur 18 capillaires testés). Les efficacités de séparation sont systématiquement supérieures à 100 000 plates.m⁻¹ (avec un RSD sur le nombre de plateaux.m⁻¹ de moins de 10% sur 18 capillaires testés).

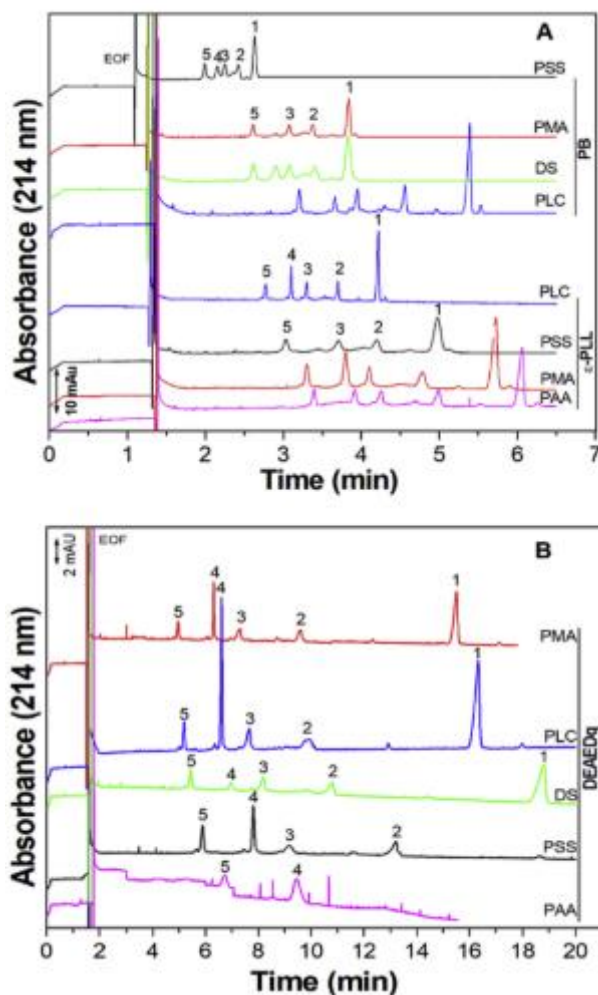


Figure 53: Séparation électrophorétique d'un mélange de 5 protéines dans l'acide acétique sur des capillaires greffés SMIL 5 couches avec différents couples polycation/polyanion. Conditions expérimentales pour la construction des SMIL: Polymères à 3 g.L⁻¹ dans tampon HEPES 20 mM pH 7.4. Capillaire: longueur totale 40 cm (31.75 cm au détecteur) x 50 μm. Injection: 30 mbar, 4 s. Electrolyte support: acide acétique 0.5 M. Tension appliquée: -30 kV. Identification des pics: Lyz (1), β-Lac (2), RNase A (3), Myo (4), T.I. (5), protéines à 1 g.L⁻¹ dans l'eau. Co-injection: DMF 0.01% comme marqueur de flux. Température 25°C. Détection: 214 nm. Adapté de [100].

Le Tableau 5 résume les données de mobilité électroosmotique, d'efficacités de séparation et de répétabilité/reproductibilité obtenues sur les capillaires greffés de la Figure 53. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le PLC comme polyanion, le meilleur couple étant PB-PLC qui donne des efficacités de séparation de l'ordre de 236 000 plateaux.m⁻¹.

Tableau 5: Reproductibilité inter-capillaire des revêtements SMIL 5 couches PB-PSS, PB-PMA, ϵ PLL-PLC, PB-PLC, DEAEDq/PMA, et DEAEDq/PLC. Trois capillaires testés pour chaque revêtement. Efficacités de séparation moyenne et incertitudes sur les temps de migration calculées sur la moyenne des cinq protéines et sur 7 séparations successives. Conditions expérimentales: voir Figure 53.

Couples	$\mu_{eof} (10^{-9} m^{-2} V^{-1} s^{-1})$		$\langle N/l_{5P} \rangle_{7 \text{ runs}} (10^3 \text{ plates/m})$		RSD% $\langle N/l_{5P} \rangle_{7 \text{ runs}}$		RSD% t_m		RSD% t_{eof}	
	intra	av.	intra	av.	intra	av.	intra	av.	intra	av.
PB/PSS	-62.6	-62.7 ± 1.3	87	115 ± 27	11.3	7.8 ± 3.7	2.5	1.3 ± 1.0	1.1	0.6 ± 0.5
	-64.0		118		8.0		0.9		0.5	
	-61.4		141		3.9		0.5		0.2	
PB/PMA	-55.3	-54.6 ± 0.5	130	188 ± 51	8.8	5.3 ± 3.1	1.1	1.3 ± 1.3	0.5	0.6 ± 0.5
	-56.1		226		4.1		2.7		1.1	
	-52.3		209		2.9		0.1		0.1	
ϵ -PLL/PLC	-53.9	-52.7 ± 0.8	297	200 ± 84	7.5	8.6 ± 2.2	1.0	0.8 ± 0.2	0.4	0.4 ± 0.1
	-52.1		156		11.1		0.8		0.4	
	-52.3		148		7.2		0.6		0.3	
PB/PLC	-50.5	-51.1 ± 0.5	266	236 ± 27	9.8	7.8 ± 3.4	2.3	1.9 ± 1.1	0.8	0.6 ± 0.4
	-51.5		227		9.8		2.8		0.8	
	-51.4		214		3.9		0.7		0.1	
DEAEDq/PMA	-44.8	-44.0 ± 0.8	120	115 ± 9	11.3	6.3 ± 4.4	3.4	2.3 ± 1.0	0.8	0.6 ± 0.2
	-43.9		120		4.3		2.1		0.5	
	-43.3		105		3.2		1.4		0.4	
DEAEDq/PLC	-43.2	-43.7 ± 0.8	128	146 ± 25	4.6	8.3 ± 3.3	0.5	1.9 ± 2.0	0.3	0.4 ± 0.3
	-43.3		136		10.8		0.9		0.2	
	-44.7		174		9.4		4.1		0.8	

La réticulation des couches, formant le revêtement SMIL, a été étudiée sur les revêtements les moins stables souvent composés de polyélectrolytes faibles, et a montré une amélioration significative de la stabilité de ces revêtements. Après le dépôt des couches, le capillaire est rempli d'une solution de réticulation (hydrochlorure de 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide à 50 g.L^{-1} et sulfate de *N*-hydroxysuccinimide à 11 g.L^{-1} dans l'eau à pH 5.5) pendant une nuit, à 4°C . La réticulation permet d'améliorer la répétabilité et l'efficacité des séparations effectuées sur les capillaires greffés les moins performants (PLys-PAA et PLys-Ha)[84]. Par comparaison, les couples menant aux séparations les plus efficaces et les plus répétables n'ont pas permis d'amélioration après réticulation.

III.2. Tampon de construction

La force ionique du tampon de construction est un paramètre primordial pour les séparations électrophorétiques sur des capillaires greffés SMIL [85]. La concentration en sel joue un rôle important dans la construction des SMIL, et notamment sur l'épaisseur des couches et la stabilité des revêtements. Nehmé et al. ont fait varier la force ionique du tampon de construction du SMIL (couple PDADMA-PSS, 5 couches) de 0.01 M à 4.5 M [85] pour la séparation de différents peptides (Ala_2 , Ala_3 , Ala_4 , Val_4 , Leu-Gly-Gly et D-Ala-Ala). Les résultats obtenus, présentés à la Figure 54, montrent qu'il existe une force ionique optimale de construction des multicouches issues d'un polyacide fort et d'une polybase forte.

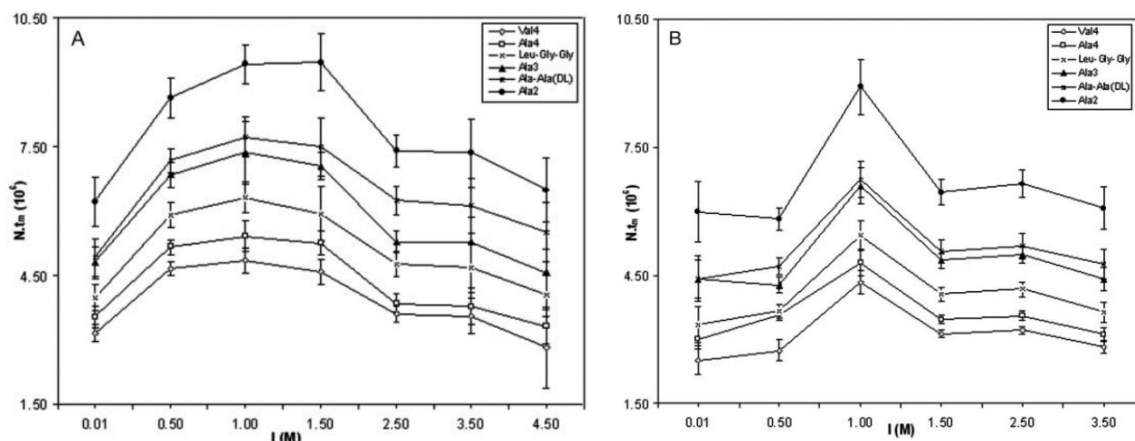


Figure 54: Effet de la force ionique du tampon de construction sur l'efficacité de séparation de 6 peptides avec (A) un capillaire greffé monocouche (PDADMA) et (B) un capillaire greffé 5 couches (couple PDADMA-PSS). Conditions expérimentales de greffage: solution de PDADMA et de PSS à 0.04% w/v. Conditions expérimentales: Longueur totale du capillaire 31.2 cm (21 cm au détecteur) × 50 μm I.D. Injection hydrodynamique: 0.5 psi, 5 s. Electrolyte support: tampon Tris-phosphate (pH 2.5). Tension appliquée: -10 kV. Détection: 214 nm. Co-injection de DMF (marqueur de flux): 0.3 psi 2 s., Adapté de [85].

En revanche, pour des couples incluant un ou des polyélectrolytes faibles, une augmentation de la force ionique du tampon de construction n'améliore pas les performances séparatives, voire même les détériore (Figure 55).

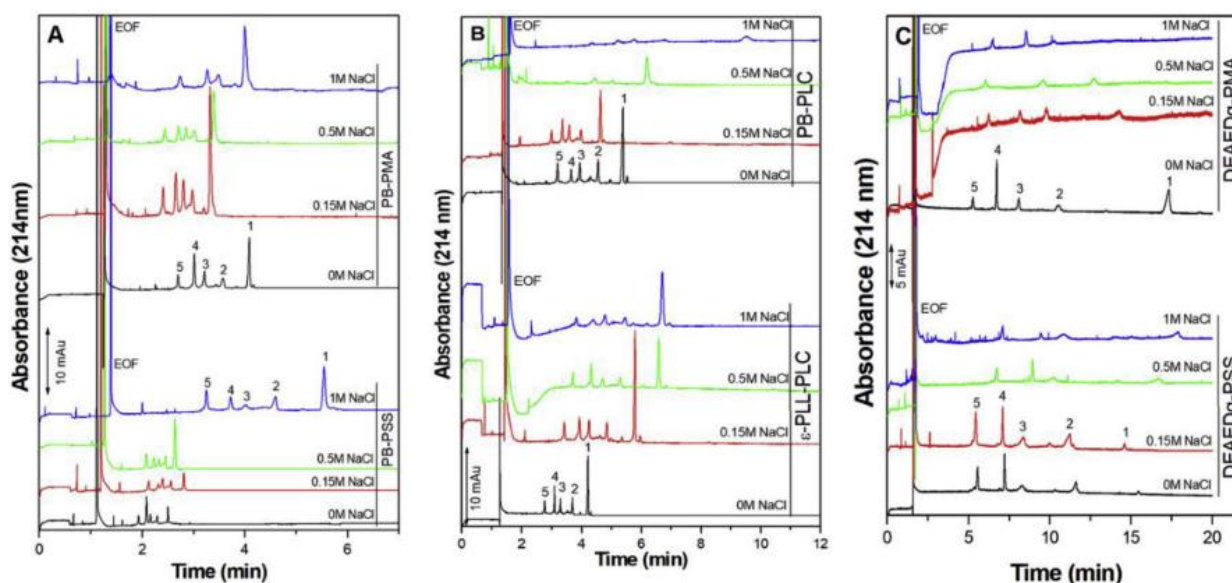


Figure 55: Influence de la concentration en NaCl dans le tampon de construction sur les séparations électrophorétiques d'un mélange de 5 protéines dans l'acide acétique 0.5 M. Conditions expérimentales: greffages SMIL 5 couches (PS-PSS, PB-PMA, PB-PLC, □ PLL-PLC, DEAE dq/PMA ou DEAE dq-PLC). Polymères à 3 g.L⁻¹ dans tampon HEPES 20 mM pH 7.4 et NaCl de concentration variable. Capillaire: Longueur totale 40 cm (31.75 cm au détecteur) x 50 μm. Injection: 30 mbar, 4 s. Electrolyte support: acide acétique 0.5 M, pH 2.5. Tension appliquée: -30 kV. Identification des pics: Lyz (1), β-Lac (2), RNase A (3), Myo (4), T.I. (5), protéines à 1 g.L⁻¹ dans l'eau. Co-injection: DMF 0.01% 30 mbar, 4 s comme marqueur de flux. Température: 25°C. Détection 214 nm. Adapté de [100].

Schlenoff et al. ont eu recours à une solution dite de trempage (solution dont on va remplir le capillaire greffé, pour observer les interactions entre le revêtement et les ions contenus dans cette solution de trempage) [101]. Avec un tampon fortement salin (3.5 M NaCl pour un greffage de polyélectrolytes forts, PDADMA-PSS [101]), les ions sodium et chlorure entrent en compétition avec le polyélectrolyte déposé de même charge pour les interactions avec les charges de surface de la couche précédente. Ils peuvent également rompre les interactions électrostatiques entre les couches de polyélectrolytes de charge opposée, entraînant une dissociation du greffage multicouches [102]. En-dessous de ces fortes concentrations en sel, des réarrangements structurels bénéfiques peuvent être observés avec une concentration en sel au-dessus de 0.5 M [103,104]. Avec un tampon moins salin (0.01 M NaCl pour un greffage PDADMA-PSS), le capillaire greffé génère un EOF inversé et instable à cause des chlorures adsorbés sur la couche de PDADMA, faisant passer la charge apparente de surface de positive (PDADMA) à négative (chlorures). L'EOF est instable car les chlorures sont désorbés avec le temps. Après plusieurs séparations, l'EOF se stabilise (passant d'une RSD sur la mobilité électroosmotique (μ_{eo}) de 4.97% sur les 9 premières répétitions à une RSD de 0.82% sur 15 répétitions suivantes [85]). Par comparaison, avec une concentration en sel intermédiaire (1.5 M de NaCl, donc au-dessus de 0.5 M permettant la stabilisation mais en-dessous de la limite de 3.5 M), le RSD de la μ_{eo} est de 0.60% sur les 9 premières séparations et de 0.11% sur 10 répétitions suivantes. Une fois l'EOF stabilisé, l'ordre de grandeur de la mobilité électroosmotique est le même que celui avant trempage d'une solution saline, ce qui renforce l'idée de l'adsorption et du relargage des ions de manière totalement réversible étudiée par Ladam et al.[105]. Tous ces résultats montrent que la présence de sel dans le tampon de construction (simulé ici par la solution de trempage) influence fortement les caractéristiques d'un greffage SMIL, mais ces changements sont totalement réversibles. Il n'est donc pas utile d'inclure une phase de trempage en solution saline avant de réaliser des séparations sur le capillaire, et lors de nos séparations, la concentration en sel du tampon de construction étant l'un des paramètres que l'on peut ajuster pour stabiliser l'EOF ou optimiser les efficacités de séparation.

Cette stabilité accrue s'explique par le fait que les polyélectrolytes adoptent une configuration enroulée (boucles) [106,107], ce qui génère de fortes interactions entre les polyélectrolytes de signe opposé et des inter-pénétrations entre les différentes couches [85,87,108–110]. En l'absence de sel, les chaînes de polyélectrolyte sont totalement étendues [106,107], ce qui limite l'interpénétration des couches [108] et donc la stabilité du greffage.

III.3. Concentration des solutions de polyélectrolytes

Plus les solutions de polyélectrolytes sont concentrées, plus la quantité de polyélectrolyte déposé est grande, du moins jusqu'à saturation des groupes chargés de la couche précédente [111,112]. Au-delà de la saturation, l'excès de polyélectrolyte sort du capillaire et la composition de la couche déposée ne varie pas. Cependant, si la concentration des solutions de polyélectrolyte utilisées est trop élevée (au-delà de 0.7% w/v pour PDADMA et PSS), l'EOF obtenu sur ces greffages n'est pas stable [85]. Il est donc intéressant de travailler avec des solutions de polyélectrolytes concentrées (~ quelques g.L⁻¹), pour un meilleur recouvrement de la couche précédente, sans toutefois dépasser une certaine limite pour éviter les instabilités. D'autre part, il faut noter que 99% du polyélectrolyte injecté est évacué lors du rinçage entre deux couches [111].

Une étude de l'influence du nombre de couches et de la concentration des solutions de polyélectrolytes sur l'écoulement électroosmotique et la stabilité de séparation est résumée dans le tableau 6 et la Figure 56. Il apparaît dans cette étude que la concentration des solutions de polyélectrolytes (0.04% ou 0.2% w/v) n'a pas une influence claire sur la stabilité de l'écoulement (voir Tableau 5) ni sur les efficacités de séparation (voir Figure 54).

Tableau 6: Influence de la force ionique du tampon de construction, du nombre de couches du revêtement SMIL, et de la concentration en polyélectrolytes sur la valeur de la mobilité électroosmotique et la répétabilité des mesures [96].

Ionic strength (M)	Number of layers	EOF measurements			
		Immediately after capillary coating		In the course of protein analysis	
		$\mu_{\text{EO}} (-10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$	% RSD ($n = 9$)	$\mu_{\text{EO}} (-10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$	% RSD ($n = 13$)
<i>(a) Polyelectrolyte concentration 0.04% w/v</i>					
0.01	1	3.52	0.34	3.58 ^{a)}	0.66
	5	3.21	0.80	3.53 ^{a)}	0.53
	11	3.12	0.46	3.16 ^{a)}	0.37
1.5	1	2.94	0.05	2.83 ^{a)}	0.99
	5	2.97	0.07	3.03	0.59
	11	2.82	0.20	2.86	1.24
<i>(b) Polyelectrolyte concentration 0.2% w/v</i>					
0.01	1	3.40	0.86	3.54	0.35
	5	3.04	0.25	3.16	0.59
	11	3.04	0.42	3.15	0.70
1.5	1	2.96	0.10	3.04	0.38
	5	2.90	0.18	2.99	0.35
	11	2.83	0.22	b)	b)

a) Results obtained with regeneration of the coating between successive protein runs.

b) No protein could be detected under these conditions.

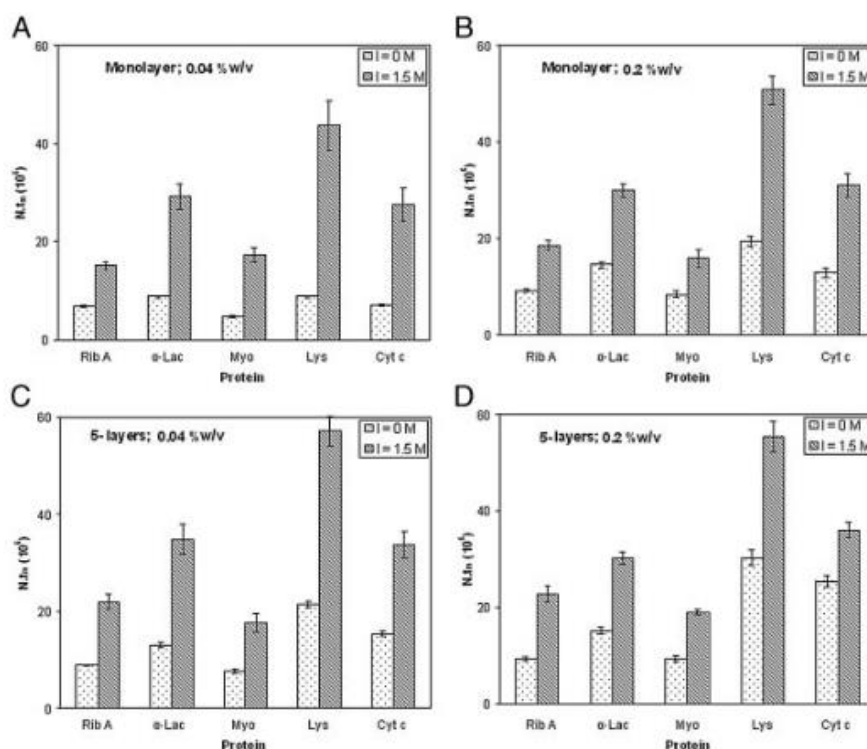


Figure 56: Effet de la force ionique du tampon de construction, de la concentration en polyélectrolytes, et du nombre de couches du revêtement SMIL sur les efficacités de séparation d'un mélange de protéines. SMIL monocouche à (A) 0.04% w/v et (B) 0.2% w/v de PDADMA ; et SMIL 5 couches à (C) 0.04% w/v et (D) 0.2% w/v de PDADMA et PSS. Les valeurs d'efficacité des pics sont indiquées à 0 et à 1.5 M en force ionique en insert. Conditions expérimentales: longueur totale du capillaire 31.2 cm (21 cm au détecteur) x 50 μm I.D., injection hydrodynamique 0.5 psi 5 s, co-injection de DMF (marqueur de flux) 0.3 psi 2 s, tension appliquée -10 kV, détection 214 nm, BGE: tampon Tris-phosphate (pH 2.5). Adapté de [96].

III.4. Nombre de couches

L'étude présentée dans le Tableau 6 concerne également le nombre de couches de SMIL, mais encore une fois il est difficile à partir des résultats du Tableau 6 de définir quel nombre de couches donne les résultats les plus stables.

Cependant, d'autres études montrent que la répétabilité des mesures et les efficacités de séparation sont améliorées pour des greffages SMIL multicouches par rapport à des greffages monocouche [96,102,106,107]. Au-delà d'un certain nombre de couches cependant, il n'y a plus d'amélioration de la stabilité du revêtement. Le revêtement devient trop épais et n'est plus utilisable pour la séparation de macromolécules [9].

Nehmé et al. [96] a observé que jusqu'à 11 couches, le revêtement SMIL (concentration en sel dans le tampon de construction 1,5 M) était stable. Un revêtement SMIL stable à 13 couches (couple PDADMA-PSS) a été utilisé par Graul et al. [92] avec les 7 dernières couches à partir d'une solution moins riche en sel (0.5 M) pour la séparation de protéines. Le revêtement est

donc plus fin (approx. 200 nm) que le revêtement à 11 couches de Nehmé et al. [96]. La stabilité des SMIL ayant un grand nombre de couches dépend donc de la concentration en sel. Cette présence de sel entre les couches empêchant une bonne stabilisation du greffage est étudiée par Sui et al. [113] et Farhat et al. [114].

La Figure 57A montre des séparations de protéines obtenues sur des capillaires greffés SMIL avec les couples PLys-PLC, PAAM-PAA, et PDADMA-PLC en fonction du nombre de couches construites (1, 5 ou 21) [84]. Les résultats en terme d'efficacité de séparation et de stabilité du greffage, présentés à la Figure 57B, montrent que les capillaires greffés 5 couches sont les plus performants.

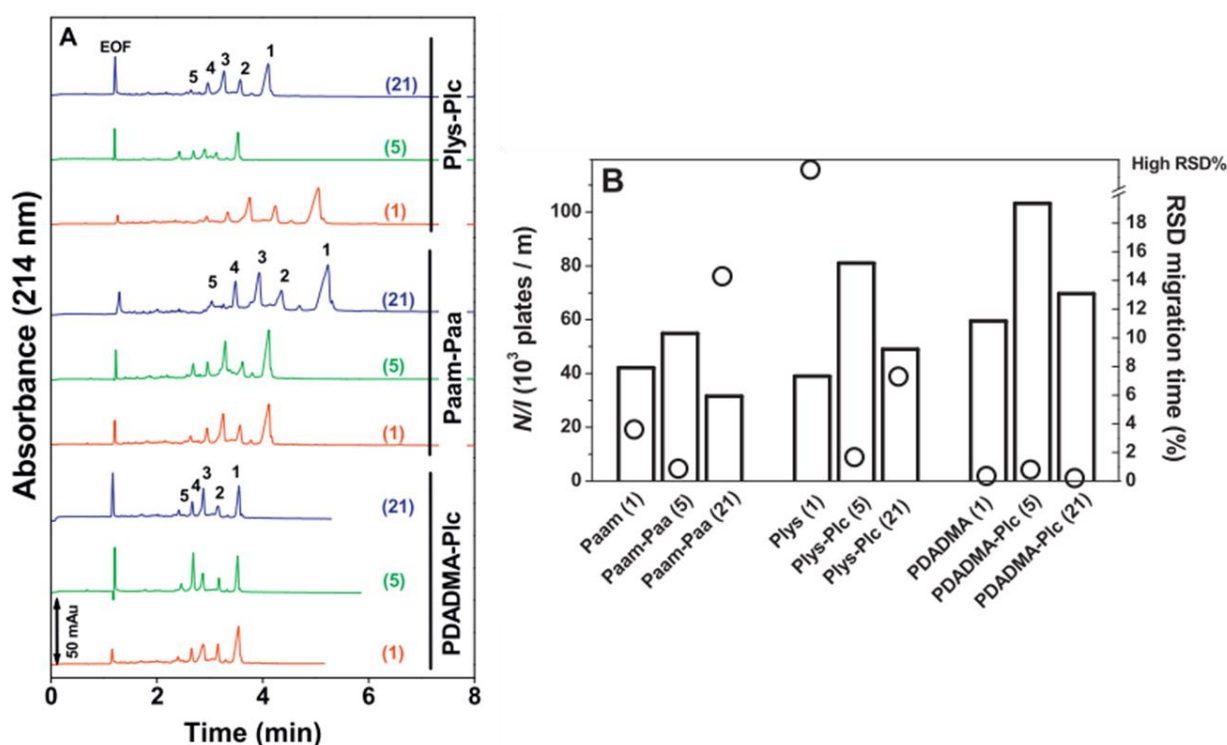


Figure 57: Influence du nombre de couches (1, 5 ou 21) dans les revêtements de capillaire SMIL sur la séparation d'un mélange de 5 protéines (A). Efficacités de séparation et répétabilité des temps de migration correspondants (B). Trois couples de polyélectrolytes testés. Conditions expérimentales: Polymères à 3 g.L⁻¹ dans tampon HEPES 20 mM pH 7.4. Capillaire: Longueur totale 40 cm (29.6 cm au détecteur) x 50 µm. Injection: 30 mbar, 4 s. Electrolyte support: Tampon: acide acétique 0.5 M, pH 2.5. Tension appliquée: -30 kV. Identification des pics: Lyz (1), β-Lac (2), RNase A (3), Myo (4), T.I. (5), protéines à 1 g.L⁻¹ dans l'eau. Co-injection: DMF 0.01% 30 mbar, 4 s comme marqueur de flux. Température: 25°C. Détection 214 nm. Adapté de [84].

III.5. Epaisseur du revêtement SMIL

L'épaisseur du revêtement SMIL varie en fonction du nombre de couches déposées et aussi de la concentration en sel du tampon de construction. La concentration en polyélectrolytes ne joue

pas de rôle prépondérant (tant qu'elle est suffisante pour saturer les charges de surfaces de la couche précédente) [87,101–103,106,107].

L'influence de l'épaisseur a été observée pour un greffage monocouche PB, bicouche PB-DS et 3 couches PB-DS-PB (Figure 58) [97]. La Figure 58 montre qu'un greffage monocouche de PB a une épaisseur d'environ 1 nm. Un greffage 2 couches PB-DS une épaisseur d'environ 4 nm, un greffage 2 couches PB-PVS une épaisseur d'environ 3 nm. Un greffage 3 couches PB-DS-PB une épaisseur d'environ 5 nm et un greffage PB-PVS-PB une épaisseur d'environ 4 nm. Il est clair que la nature des polyélectrolytes choisis joue un rôle sur la croissance du revêtement en fonction du nombre de couches.

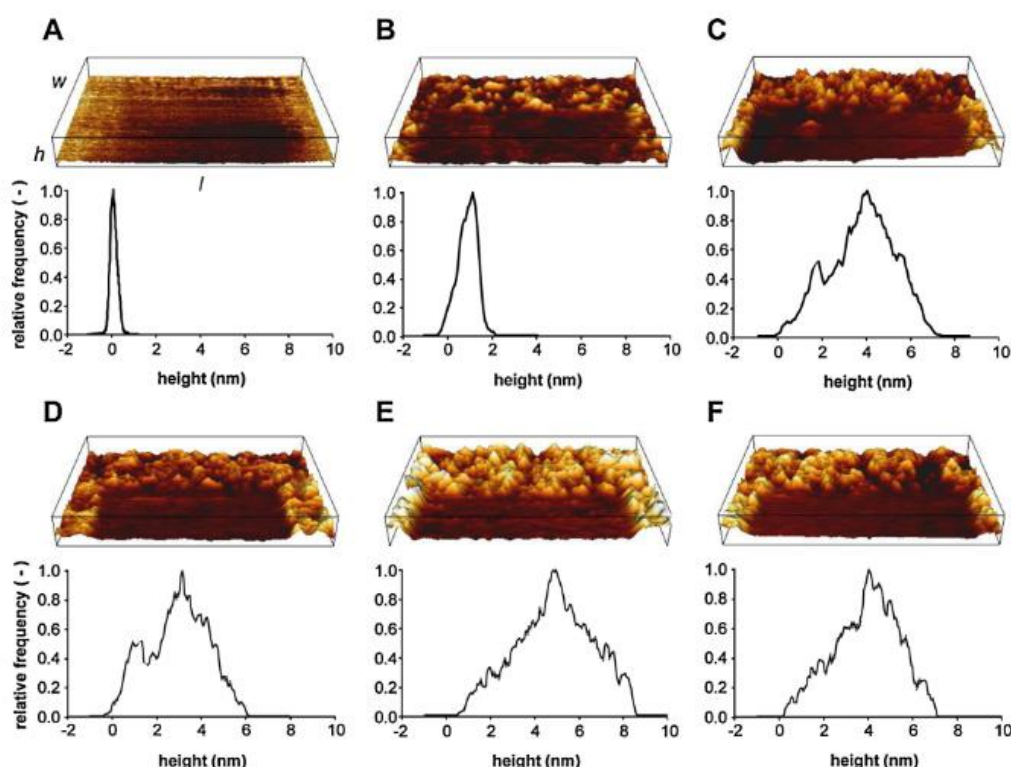


Figure 58: Images AFM et graphiques montrant la hauteur et la distribution de la hauteur de surface de silice vierge et de silice greffée SMIL. **A:** silice vierge, **B:** greffage monocouche (PB), **C:** greffage 2 couches PB-DS, **D:** greffage 2 couches PB-PVS, **E:** greffage 3 couches PB-DS-PB, **F:** greffage 3 couches PB-PVS-PB. Dimensions de la surface 1.5 μm (longueur) x 1 μm (largeur) x 10 nm (hauteur). Pour comparaison, les images AFM des revêtements montrent une portion greffée et une portion de silice vierge. La distribution de la hauteur est obtenue en comparaison d'une section de 1 μm x 1 μm de portion greffée adjacente à la portion de silice vierge de chaque surface. Adapté de [98].

III.6. Force ionique du tampon de séparation

Le choix du tampon de séparation influe également sur les séparations électrophorétiques. En effet, les ions du tampon, en se déplaçant sous l'effet du champ électrique, génèrent l'écoulement électroosmotique. La nature et la concentration des ions du tampon jouent donc

un rôle important. Par exemple, Catai et al. ont découvert que, sur un capillaire greffé avec un SMIL bicouche PB-PVS, plus la concentration du tampon est élevée à pH 7, plus la séparation est efficace (Figures 59 et 60) [90].

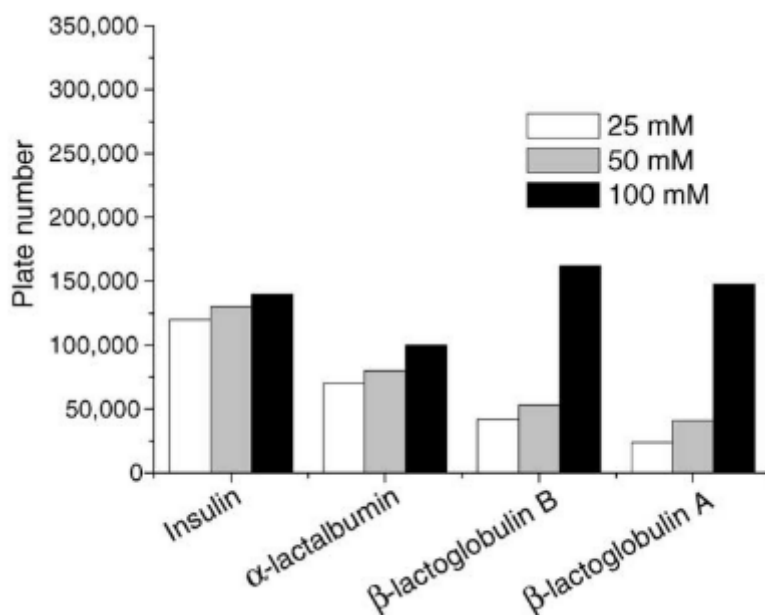


Figure 59: Nombre de plateaux obtenus lors de la séparation de protéines test par électrophorèse capillaire avec un capillaire greffé PB-PVS, en fonction de la concentration en ions phosphate dans le tampon de séparation (pH 7.0). Adapté de [90].

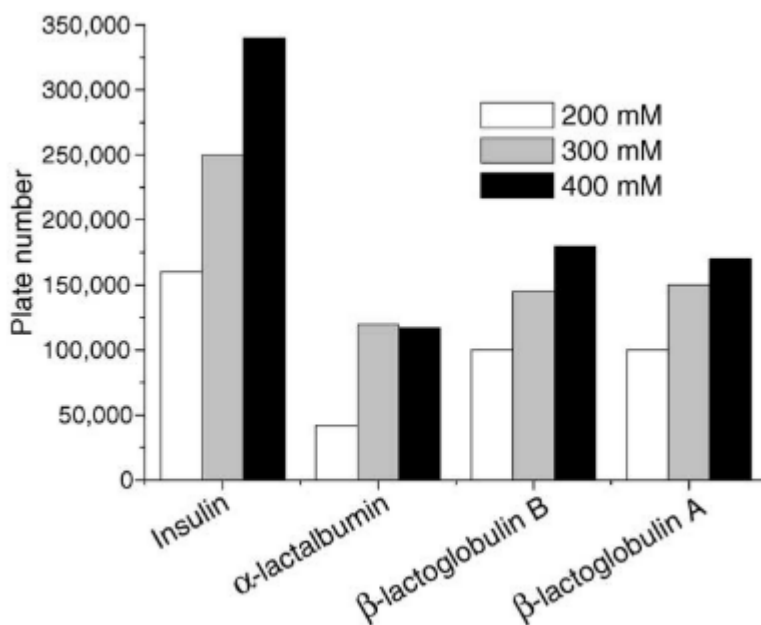


Figure 60: Nombre de plateaux obtenus lors de la séparation de protéines test par électrophorèse capillaire avec un capillaire greffé PB-PVS, en fonction de la concentration en tris-phosphate dans le tampon de séparation (pH 7.0). Adapté de [90].

Bekri et al. [115] ont étudié les efficacités de séparation de capillaires greffés SMIL 5 couches PDADMA-PSS en utilisant l'acide acétique et l'acide formique à différentes forces ioniques

(ajustée par ajout de NaCl) comme électrolyte de séparation (Tableau 7). Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 61.

Tableau 7: Caractéristiques des différents BGE étudiés par Bekri et al. pour l'étude de la force ionique sur la séparation d'un mélange de 5 protéines. Voir Figure 61 pour les autres conditions expérimentales. Adapté de [115].

	BGE	AcOH (mM)	NaCl (mM)	Ionic strength (mM)	Conductivity (S/m)	Applied voltage (kV)	Measured current (μ A)
Acetic acid	BGE 1	500 mM	-	3.1	0.120	-30	-22.8
	BGE 2	500 mM	10	13.3	0.240	-15	-21.4
	BGE 3	500 mM	22	25.4	0.376	-10	-21.5
	BGE 4	500 mM	47.5	51.1	0.654	-10	-40.2
	BGE	HCO ₂ H (mM)	NH ₄ ⁺ HCO ₃ ⁻ (mM)	Ionic strength (mM)	Conductivity (S/m)	Applied voltage (kV)	Measured current (μ A)
Formic acid	BGE 5	60 mM	-	3.4	0.133	-30	-27
	BGE 6	220 mM	10	13.4	0.251	-23	-41.5
	BGE 7	450 mM	25	28.5	0.423	-15	-42.5
	BGE 8	800 mM	50	53.6	0.696	-12	-57
	BGE 9	1100 mM	73	76.6	0.938	-10	-62

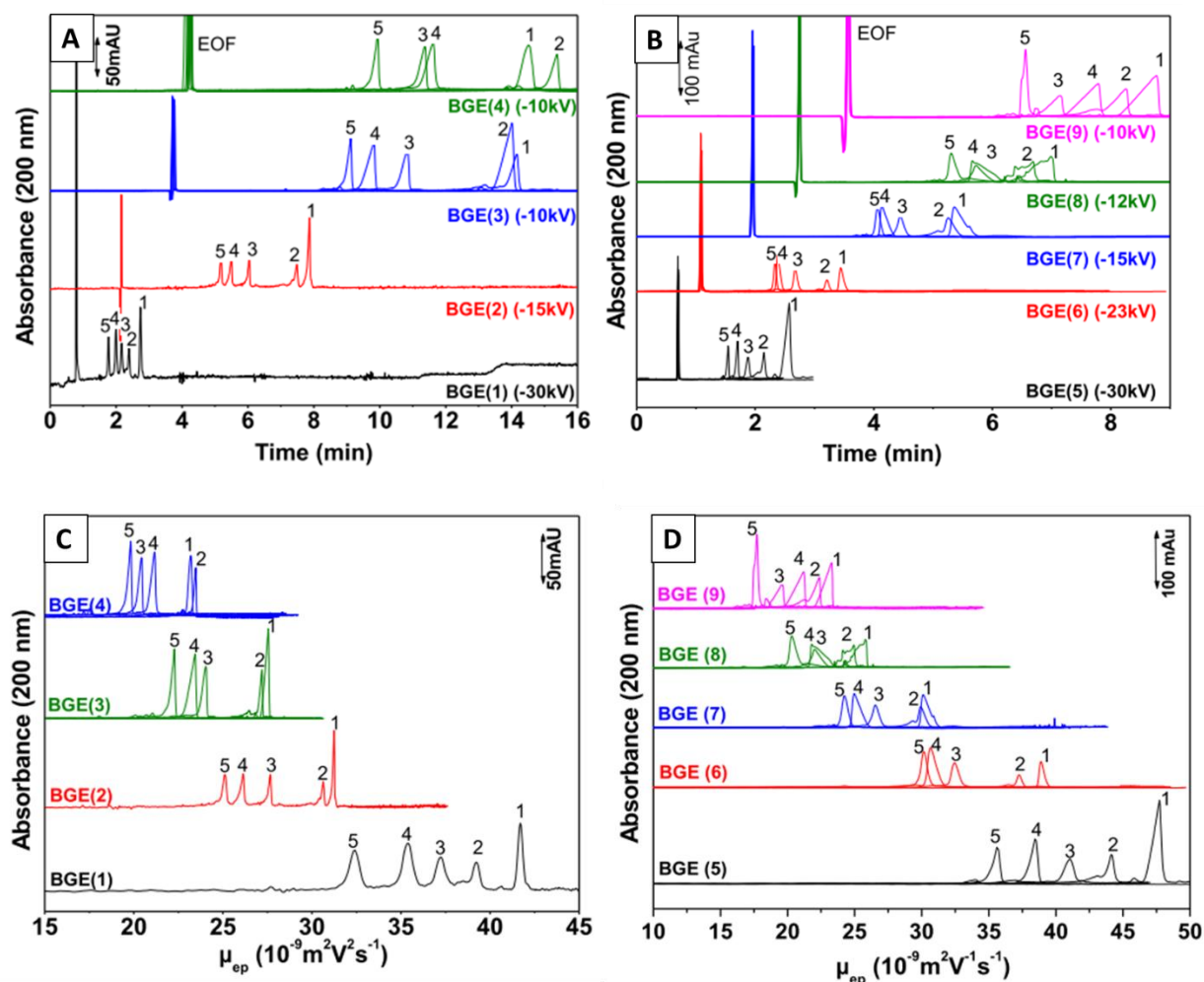


Figure 61: Electrophérogammes d'un mélange de 5 protéines sur un capillaire greffé SMIL 5 couches PDADMA-PSS en milieu acide acétique (A et C) ou acide formique (B et D) à différentes forces ioniques en échelle de temps (haut), ou en échelle de mobilité (bas). Conditions expérimentales: Polymères à $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ dans tampon HEPES 20 mM pH 7.4. Capillaire: Longueur totale 33.5 cm (25 cm au détecteur) $\times 50 \mu\text{m}$. Injection: 20 mbar , 5 s . Electrolyte support: BGE(1) 500 mM AcOH, (2) 500 mM AcOH + 10 mM NaCl, (3) 500 mM AcOH + 22 mM NaCl, (4) 500 mM AcOH + 47.5 mM NaCl, (5) 60 mM HCO_2H , (6) 220 mM HCO_2H + 10 mM $\text{NH}_4^+\text{HCO}_3^-$, (7) 450 mM HCO_2H + 25 mM $\text{NH}_4^+\text{HCO}_3^-$, (8) 800 mM HCO_2H + 50 mM $\text{NH}_4^+\text{HCO}_3^-$, (9) 1100 mM HCO_2H + 73 mM $\text{NH}_4^+\text{HCO}_3^-$, comme montrés dans le Tableau 7. Tension appliquée: de -10 kV à -30 kV , en fonction du BGE, comme montré dans le Tableau 7. Identification des pics: Lys (1), β -Lac (2), RNase A (3), Myo (4), T.I. (5), protéines à $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ dans l'eau. Co-injection: DMF 0.01% 50 mbar , 2 s . Température: 25°C . Détection: 214 nm . Adapté de [115].

L'augmentation de la force ionique diminue la mobilité électrophorétique des protéines (voir Figures 61C et 61D), mais diminue également, et plus fortement, l'écoulement électroosmotique, ce qui conduit à des temps d'analyses plus longs (diminution de la mobilité apparente, voir Figures 61A et 61B). Les séparations sont mieux résolues à une faible force ionique (3.1 mM), car la gamme de mobilité effective des protéines (et donc la sélectivité) est plus grande à faible force ionique.

III.7. pH du tampon de séparation

Les greffages SMIL peuvent être utilisés à n'importe quel pH. Cependant, afin que l'EOF (et donc l'état de charge de la surface) reste le même dans tout le capillaire, il est préférable de choisir des couples de polyélectrolytes forts, qui sont peu ou pas sensibles au pH. Des changements importants (parfois irréversibles) peuvent être observés sur des greffages issus de polyélectrolytes faibles [97], comme le montre la Figure 62. Dans le cas de polyélectrolytes faibles (cas A et B), le changement de pH au cours du temps va modifier la valeur de la mobilité électroosmotique. Cette modification peut être irréversible (cas A), où la valeur de la mobilité électroosmotique n'est pas la même au début et à la fin de l'expérience, alors que le pH du tampon est le même. Dans le cas de polyélectrolytes forts (cas C), le changement de pH n'influe pas sur la valeur du flux électroosmotique.

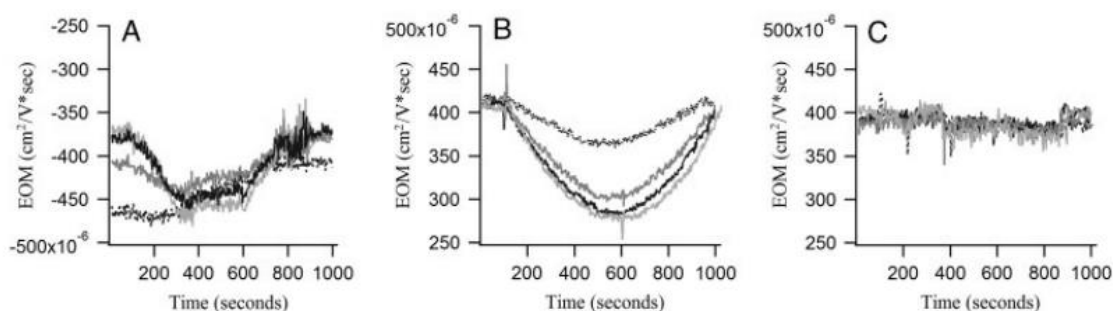


Figure 62: Influence du pH sur la mobilité électroosmotique de différents capillaires greffés SMIL. **A:** revêtement 3 couches PAH-PSS-PAH, **B:** revêtement 4 couches (PDADMAC-PMAA)₂, **C:** revêtement 4 couches (PDADMAC-PSS)₂. A t₀, le capillaire est rempli d'une solution à pH 7.1. Au bout de 100 s à 15 kV, le flacon d'entrée contenant ce tampon est remplacé par un flacon contenant un tampon à pH 6.6 (ligne pointillée), pH 6.1 (ligne gris sombre), pH 5.5 (ligne noire), pH 5.1 (ligne gris clair). Une fois le capillaire rempli du nouveau tampon (au bout d'environ 600 s), le flacon contenant le tampon pH 7.1 est remis à l'entrée. Adapté de [97].

III.8. Temps de rinçage du capillaire

Il a été montré qu'il était plus efficace d'augmenter le temps de rinçage avec la solution de polyélectrolytes plutôt que d'augmenter la concentration desdites solutions de polyélectrolytes afin d'accroître la quantité de polymère déposé. Rappelons que des problèmes de stabilité peuvent survenir si les solutions de polymères sont trop concentrées [111].

III.9. Stabilisation après greffage

Fritz et al. [116] ont remarqué qu'après le dépôt d'une couche de PDADMAC, l'application d'un champ électrique sur le capillaire rempli d'électrolyte donnait une ligne de base plus rapidement plate que si aucune tension n'était appliquée. L'application d'une tension semble

donc « induire un conditionnement du polyélectrolyte qui inclut un réarrangement et un resserrement des couches de polyélectrolytes » [116], ce qui mènerait à la stabilisation de la ligne de base. Des observations similaires ont été faites par Nehmé et al. [85] sur des greffages mono- et multicouches: l'application d'une tension de 10 kV pendant 10 min sur le capillaire greffé rempli de tampon après chaque couche déposée a permis l'obtention d'un EOF stable immédiatement après greffage et une bonne répétabilité des temps de migration. Sans cette étape, il faut attendre plusieurs séparations avant d'obtenir un flux stable. A noter que cette étape de stabilisation après chaque couche n'a pas eu d'influence sur la valeur de la mobilité électroosmotique.

III.10. Temps d'attente après greffage

Une étude cinétique [112] a montré que l'équilibre de conformation d'un polyélectrolyte adsorbé dans un greffage SMIL est différent de sa conformation en solution ou de sa conformation initiale lors du dépôt sur la surface à greffer. Ce qui veut dire qu'après dépôt, le polyélectrolyte a besoin de temps pour atteindre sa conformation finale. Un temps d'attente de 5-10 min après chaque couche déposée a été effectué [85]. Dans le cas d'un greffage effectué avec des solutions de polyélectrolytes diluées (0.04% w/v), l'addition d'un temps d'attente n'a pas changé significativement le temps nécessaire à la stabilisation de l'EOF, ni sa valeur. En revanche, dans le cas d'un greffage effectué avec des solutions de polyélectrolytes plus concentrées (0.2% w/v), le temps d'attente entre chaque dépôt s'est révélé nécessaire pour obtenir une stabilisation rapide de l'EOF.

III.11. Conditions de stockage et de régénération

Après greffage, des capillaires ont été rincés 10 min à l'eau, puis stockés tels quels ou rincés à l'air pendant 10 min [85]. Les capillaires remplis d'eau se sont révélés stables pendant au moins 4 mois, donnant un EOF stable immédiatement, de façon similaire à des capillaires utilisés juste après greffage ($RSD_{\mu_{eo}} < 0.3\%$ sur 9 répétitions). Par contre, les capillaires séchés à l'air n'ont pas donné de résultats aussi bons, en particulier les capillaires greffés 5 couches.

Références Bibliographiques:

- [1] A. Lafuma, D. Quéré, Superhydrophobic states, *Nat. Mater.* 2 (2003) 457–460. doi:10.1038/nmat924.
- [2] W. Barthlott, C. Neinhuis, Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces, 1997. doi:10.1007/s004250050096.
- [3] Y.C. Jung, B. Bhushan, Biomimetic structures for fluid drag reduction in laminar and turbulent flows, *J. Phys. Condens. Matter.* 22 (2010) 035104. doi:10.1088/0953-8984/22/3/035104.
- [4] T. Wagner, C. Neinhuis, W. Barthlott, Wettability and Contaminability of Insect Wings as a Function of Their Surface Sculptures, *Acta Zool.* 77 (1996) 213–225. doi:10.1111/j.1463-6395.1996.tb01265.x.
- [5] Y.L. Zhang, H. Xia, E. Kim, H.B. Sun, Recent developments in superhydrophobic surfaces with unique structural and functional properties, *Soft Matter* 8 (2012) 11217–11231. doi:10.1039/c2sm26517f.
- [6] X. Gao, L. Jiang, Biophysics: Water-repellent legs of water striders, *Nature.* 432 (2004) 36–36. doi:10.1038/432036a.
- [7] H. Gao, X. Wang, H. Yao, S. Gorb, E. Arzt, Mechanics of hierarchical adhesion structures of geckos, *Mech. Mater.* 37 (2005) 275–285. doi:10.1016/j.mechmat.2004.03.008.
- [8] X. Gao, X. Yan, X. Yao, L. Xu, K. Zhang, J. Zhang, B. Yang, L. Jiang, The dry-style antifogging properties of mosquito compound eyes and artificial analogues prepared by soft lithography, *Adv. Mater.* 19 (2007) 2213–2217. doi:10.1002/adma.200601946.
- [9] T. Darmanin, F. Guittard, Recent advances in the potential applications of bioinspired superhydrophobic materials, (2014) 16319–16359. doi:10.1039/c4ta02071e.
- [10] K.Y. Law, Definitions for hydrophilicity, hydrophobicity, and superhydrophobicity: Getting the basics right, *J. Phys. Chem. Lett.* 5 (2014) 686–688. doi:10.1021/jz402762h.
- [11] D. Quéré, J. Bico, Modulation du mouillage par des microtextures, *La Houille Blanche.* 4 (2003) 57–60.
- [12] R. Thévenin, Superhydrophobie active, Université Paris-Saclay, 2014.
- [13] D. Dilip, N.K. Jha, R.N. Govardhan, M.S. Bobji, Controlling air solubility to maintain “Cassie” state for sustained drag reduction, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 459 (2014) 217–224. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.07.006.
- [14] R.E. Johnson, R.H. Dettre, Contact Angle Hysteresis. III. Study of an Idealized Heterogeneous Surface, *J. Phys. Chem.* 68 (1964) 1744–1750. doi:10.1021/j100789a012.
- [15] C. Becker, Intérêt de la pulvérisation cathodique magnétron assistée par laser pour la réalisation de surfaces superhydrophobes ajustables, Université de Strasbourg, 2013.
- [16] C. Cottin-Bizonne, C. Barentin, L. Bocquet, Scaling laws for slippage on superhydrophobic fractal surfaces, *Phys. Fluids.* 24 (2012) 1–13. doi:10.1063/1.3674300.
- [17] L. Bocquet, J.L. Barrat, Flow boundary conditions from nano- to micro-scales, *Soft Matter.* 3 (2007) 685–693. doi:10.1039/b616490k.
- [18] M. Navier, Sur les lois du mouvement des fluides, *Mémoire.* (1822).
- [19] R. Truesdell, A. Mammoli, P. Vorobieff, F. Van Swol, C.J. Brinker, Drag reduction on a patterned superhydrophobic surface, *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006) 1–4. doi:10.1103/PhysRevLett.97.044504.
- [20] D.M. Huang, C. Sendner, D. Horinek, R.R. Netz, L. Bocquet, Water slippage versus contact angle: A quasiuniversal relationship, *Phys. Rev. Lett.* 101 (2008) 1–4. doi:10.1103/PhysRevLett.101.226101.
- [21] A. Maali, B. Bhushan, Measurement of slip length on superhydrophobic surfaces, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 370 (2012) 2304–2320. doi:10.1098/rsta.2011.0505.
- [22] R. Lindken, M. Rossi, S. Grosse, J. Westerweel, Micro-Particle Image Velocimetry (microPIV): recent developments, applications, and guidelines., *Lab Chip.* 9 (2009) 2551–2567. doi:10.1039/b906558j.
- [23] Z. Li, L. D’eramo, C. Lee, F. Monti, M. Yonger, B. Chollet, B. Bresson, Y. Tran, P. Tabeling, Near-wall nanovelocimetry based on Total Internal Reflection Fluorescence with continuous tracking, *J. Fluid Mech.* 766 (2014) 24. doi:10.1017/jfm.2015.12.

- [24] P. Huang, J.S. Guasto, K.S. Breuer, Direct measurement of slip velocities using three-dimensional total internal reflection velocimetry, *J. Fluid Mech.* 566 (2006) 447. doi:10.1017/S0022112006002229.
- [25] C.I. Bouzigues, P. Tabeling, L. Bocquet, Nanofluidics in the debye layer at hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Phys. Rev. Lett.* 101 (2008) 12–15. doi:10.1103/PhysRevLett.101.114503.
- [26] Q. Lu, J. Wang, A. Faghijnejad, H. Zeng, Y. Liu, Understanding the molecular interactions of lipopolysaccharides during *E. coli* initial adhesion with a surface forces apparatus, *Soft Matter* 7 (2011) 9366. doi:10.1039/c1sm05554b.
- [27] J. Baudry, E. Charlaix, A. Tonck, D. Mazuyer, Experimental evidence for a large slip effect at a nonwetting fluid - solid interface, *Langmuir* 17 (2001) 5232–5236. doi:10.1021/la0009994.
- [28] E. Lauga, Apparent slip due to the motion of suspended particles in flow of electrolyte solutions, *Langmuir* 20 (2004) 8924–8930. doi:10.1021/la049464r.
- [29] V. Tandon, S.K. Bhagavatula, W.C. Nelson, B.J. Kirby, Zeta potential and electroosmotic mobility in microfluidic devices fabricated from hydrophobic polymers: 1. The origins of charge, *Electrophoresis* 29 (2008) 1092–1101. doi:10.1002/elps.200700734.
- [30] M.J. Nine, T.T. Tung, F. Alotaibi, D.N.H. Tran, D. Losic, Facile Adhesion-Tuning of Superhydrophobic Surfaces between “Lotus” and “Petal” Effect and Their Influence on Icing and Deicing Properties, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9 (2017) 8393–8402. doi:10.1021/acsami.6b16444.
- [31] A. Steinberger, C. Cottin-Bizonne, P. Kleimann, E. Charlaix, High friction on a bubble mattress, *Nat. Mater.* 6 (2007) 665–668. doi:10.1038/nmat1962.
- [32] C.R. Szczepanski, T. Darmanin, Spontaneous , Phase-Separation Induced Surface Roughness : A New Method to Design Parahydrophobic Polymer Coatings with Rose Petal-like Morphology, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* (2016). doi:10.1021/acsami.5b10222.
- [33] D. Li, D. Jing, Y. Pan, B. Bhushan, X. Zhao, Study of the Relationship between Boundary Slip and Nanobubbles on a Smooth Hydrophobic Surface, *Langmuir* 32 (2016) 11287–11294. doi:10.1021/acs.langmuir.6b02877.
- [34] B.D. Cassie, Of porous surfaces, *Trans. Faraday Soc.* (1944) 546–551. doi:10.1103/PhysRevE.64.021514.
- [35] M. Reyssat, a Pépin, F. Marty, Y. Chen, D. Quéré, Bouncing transitions on microtextured materials, *Europhys. Lett.* 74 (2007) 306–312. doi:10.1209/epl/i2005-10523-2.
- [36] Y. Li, C. Lv, D. Quéré, Q. Zheng, Monostable Superantiwettability, (2016) 17. <http://arxiv.org/abs/1602.02880>.
- [37] D. Gentili, G. Bolognesi, A. Giacomello, M. Chinappi, C.M. Casciola, Pressure effects on water slippage over silane-coated rough surfaces: Pillars and holes, *Microfluid. Nanofluidics* 16 (2014) 1009–1018. doi:10.1007/s10404-014-1376-0.
- [38] D. Lohse, X. Zhang, Surface nanobubbles and nanodroplets, *Rev. Mod. Phys.* 87 (2015) 981–1035. doi:10.1103/RevModPhys.87.981.
- [39] T. Lee, E. Charrault, C. Neto, Interfacial slip on rough, patterned and soft surfaces: A review of experiments and simulations, *Adv. Colloid Interface Sci.* 210 (2014) 21–38. doi:10.1016/j.cis.2014.02.015.
- [40] Yunlu Pan, B. Bhushan, Xuezheng Zhao, The study of surface wetting, nanobubbles and boundary slip with an applied voltage: A review, *Beilstein J. Nanotechnol.* 5 (2014) 1042–1065. doi:10.3762/bjnano.5.117.
- [41] M. Mazumder, B. Bharat, Propensity and geometrical distribution of surface nanobubbles: effect of electrolyte, roughness, pH, and substrate bias, *Soft Matter* 7 (2011) 9184–9196. doi:10.1039/c1sm05560g.
- [42] P.-G. de Gennes, On fluid/wall slippage, *Neurocomputing* 151 (2015) 985–995. doi:10.1016/j.neucom.2014.03.086.
- [43] X. Sheng, J. Zhang, Air layer on superhydrophobic surface underwater, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 377 (2011) 374–378. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.01.033.
- [44] Y. Yoon, D. Kim, J.-B. Lee, Hierarchical micro/nano structures for super-hydrophobic surfaces and super-lyophobic surface against liquid metal, *Micro Nano Syst. Lett.* 2 (2014) 1-18. doi:10.1186/s40486-014-0003-x.

- [45] E.J. Falde, S.T. Yohe, Y.L. Colson, M.W. Grinstaff, Biomaterials Superhydrophobic materials for biomedical applications, *Biomaterials* 104 (2016) 87–103. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.06.050.
- [46] B.J. Privett, J. Youn, S.A. Hong, J. Lee, J. Han, J.H. Shin, M.H. Schoenfisch, Antibacterial fluorinated silica colloid superhydrophobic surfaces, *Langmuir* 27 (2011) 9597–9601. doi:10.1021/la201801e.
- [47] J.M. Shaw, J.D. Gelorme, N.C. LaBianca, W.E. Conley, S.J. Holmes, Negative photoresists for optical lithography, *IBM J. Res. Dev.* 41 (1997) 81–94. doi:10.1147/rd.411.0081.
- [48] I. Hejazi, J. Seyfi, E. Hejazi, G.M.M. Sadeghi, S.H. Jafari, H.A. Khonakdar, Investigating the role of surface micro/nano structure in cell adhesion behavior of superhydrophobic polypropylene/nanosilica surfaces, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 127 (2015) 233–240. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.01.054.
- [49] C. Su, J. Li, H. Geng, Q. Wang, Q. Chen, Fabrication of an optically transparent superhydrophobic surface via embedding nano-silica, *Appl. Surf. Sci.* 253 (2006) 2633–2636. doi:10.1016/j.apsusc.2006.05.038.
- [50] S. Yeast, Material Safety Data Sheet Material Safety Data Sheet, (2010) 1–5.
- [51] C. Lv, P. Hao, Z. Yao, F. Niu, Departure of condensation droplets on superhydrophobic surfaces, *Langmuir* 31 (2015) 2414–2420. doi:10.1021/la504638y.
- [52] I.U. Vakarelski, N. a Patankar, J.O. Marston, D.Y.C. Chan, S.T. Thoroddsen, Stabilization of Leidenfrost vapour layer by textured superhydrophobic surfaces., *Nature* 489 (2012) 274–7. doi:10.1038/nature11418.
- [53] H. Yang, P. Jiang, Self-cleaning diffractive macroporous films by doctor blade coating, *Langmuir* 26 (2010) 12598–12604. doi:10.1021/la1021643.
- [54] H.J. Ensikat, P. Ditsche-Kuru, C. Neinhuis, W. Barthlott, Superhydrophobicity in perfection: The outstanding properties of the lotus leaf, *Beilstein J. Nanotechnol.* 2 (2011) 152–161. doi:10.3762/bjnano.2.19.
- [55] A.J. Wang, J.J. Feng, J. Fan, Covalent modified hydrophilic polymer brushes onto poly(dimethylsiloxane) microchannel surface for electrophoresis separation of amino acids, *J. Chromatogr. A.* 1192 (2008) 173–179. doi:10.1016/j.chroma.2008.03.038.
- [56] D.C. Tretheway, C.D. Meinhart, A generating mechanism for apparent fluid slip in hydrophobic microchannels, *SOCAR Proc.* 2010 (2010) 60–68. doi:10.1063/1.1669400.
- [57] D.J. Lee, K.Y. Cho, S. Jang, Y.S. Song, J.R. Youn, Liquid slip on a nanostructured surface, *Langmuir* 28 (2012) 10488–10494. doi:10.1021/la302264t.
- [58] O.I. Vinogradova, K. Koynov, A. Best, F. Feuillebois, Direct measurements of hydrophobic slippage using double-focus fluorescence cross-correlation, *Phys. Rev. Lett.* 102 (2009) 1–4. doi:10.1103/PhysRevLett.102.118302.
- [59] D. Schaeffel, S. Yordanov, M. Schmelzeisen, T. Yamamoto, M. Kappl, R. Schmitz, B. Dünweg, H.J. Butt, K. Koynov, Hydrodynamic boundary condition of water on hydrophobic surfaces, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* 87 (2013) 5–8. doi:10.1103/PhysRevE.87.051001.
- [60] R. Pit, H. Hervet, L. Léger, Direct Experimental Evidence of Slip in Hexaecane: Solid Interfaces, *Phys. Rev. Lett.* 85 (2000) 980–983.
- [61] M.-C. Audry, A. Piednoir, P. Jospeh, E. Charlaix, Amplification of electro-osmotic flows by wall slippage: direct measurements on OTS-surfaces, *Faraday Discuss.* 146 (2010) 113–124. doi:10.1039/c005270c.
- [62] Y. Gao, J. Li, H.C. Shum, H. Chen, Drag Reduction by Bubble-Covered Surfaces Found in PDMS Microchannel through Depressurization, *Langmuir* 32 (2016) 4815–4819. doi:10.1021/acs.langmuir.6b01186.
- [63] D.C. Tretheway, C.D. Meinhart, Apparent fluid slip at hydrophobic microchannel walls, *Phys. Fluids.* 14 (2002) 9-12 . doi:10.1063/1.1432696.
- [64] D. Li, Y. Wang, Y. Pan, X. Zhao, Measurements of slip length for flows over graphite surface with gas domains, *Appl. Phys. Lett.* 109 (2016) 109-112 doi:10.1063/1.4964437.
- [65] S. Srinivasan, W. Choi, K.C. Park, S.S. Chhatre, R.E. Cohen, G.H. McKinley, Drag reduction for viscous laminar flow on spray-coated non-wetting surfaces, *Soft Matter* 9 (2013) 5691–5702. doi:10.1039/c3sm50445j.

- [66] D.P. Papageorgiou, K. Tsougeni, A. Tserepi, E. Gogolides, Superhydrophobic, hierarchical, plasma-nanotextured polymeric microchannels sustaining high-pressure flows, *Microfluid. Nanofluidics* 14 (2013) 247–255. doi:10.1007/s10404-012-1043-2.
- [67] J. Heverhagen, M. Tasinkevych, A. Rahman, C.T. Black, A. Checco, Slip Length Enhancement in Nanofluidic Flow using Nanotextured Superhydrophobic Surfaces, *Adv. Mater. Interfaces*. 3 (2016) 1–7. doi:10.1002/admi.201600303.
- [68] T. Saha, S. Kumar, S.K. Bhaumik, Slip-enhanced flow through thin packed column with superhydrophobic wall, *Sensors Actuators, B Chem.* 240 (2017) 468–476. doi:10.1016/j.snb.2016.09.012.
- [69] C. Lee, C.H. Choi, C.J. Kim, Structured surfaces for a giant liquid slip, *Phys. Rev. Lett.* 101 (2008) 1–4. doi:10.1103/PhysRevLett.101.064501.
- [70] D. Ajit, Fabrication of Cylindrical Superhydrophobic Microchannels by Replicating Lotus Leaf Structures on Internal Walls, *J. Micromech Microeng.* (2018) 1-27.
- [71] H. Zhao, Electro-osmotic flow over a charged superhydrophobic surface, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* 81 (2010) 1–9. doi:10.1103/PhysRevE.81.066314.
- [72] D. Erickson, Electroosmotic Flow (DC), *Encycl. Microfluid. Nanofluidics* 1 (2014) 1–11. doi:10.1007/978-0-387-48998-8.
- [73] B. Jelinek, S.D. Felicelli, P.F. Mlakar, J.F. Peters, Effects of surface charge density and distribution on the nanochannel electro-osmotic flow, *Int. J. Theor. Appl. Multiscale Mech.* 2 (2011) 165. doi:10.1504/IJTAMM.2011.043537.
- [74] A.D. Stroock, G.M. Whitesides, Controlling flows in microchannels with patterned surface charge and topography, *Acc. Chem. Res.* 36 (2003) 597–604. doi:10.1021/ar0202870.
- [75] M. Rezaei, a. R. Azimian, D.T. Semiromi, The surface charge density effect on the electro-osmotic flow in a nanochannel: a molecular dynamics study, *Heat Mass Transf.* 51 (2015) 661–670. doi:10.1007/s00231-014-1441-y.
- [76] E. Lauga, H. Stone, Effective slip in pressure-driven Stokes flow, *J. Fluid Mech.* 489 (2003) 55–77. doi:10.1017/S0022112003004695.
- [77] T.M. Squires, Electrokinetic flows over inhomogeneously slipping surfaces, *Phys. Fluids* 20 (2008) 1–11. doi:10.1063/1.2978954.
- [78] C. Schönecker, S. Hardt, Electro-osmotic flow along superhydrophobic surfaces with embedded electrodes, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* 89 (2014) 1–6. doi:10.1103/PhysRevE.89.063005.
- [79] C. Steffes, T. Baier, S. Hardt, Enabling the enhancement of electroosmotic flow over superhydrophobic surfaces by induced charges, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 376 (2011) 85–88. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.09.002.
- [80] S. De, S. Bhattacharyya, S. Hardt, Electroosmotic flow in a slit nanochannel with superhydrophobic walls, *Microfluid. Nanofluidics* 19 (2015) 1465–1476. doi:10.1007/s10404-015-1660-7.
- [81] N. Vourdas, A. Tserepi, A.G. Boudouvis, E. Gogolides, Plasma processing for polymeric microfluidics fabrication and surface modification: Effect of super-hydrophobic walls on electroosmotic flow, 85 (2008) 1124–1127. doi:10.1016/j.mee.2007.12.032.
- [82] P. Papadopoulos, X. Deng, D. Vollmer, H.-J. Butt, Electrokinetics on superhydrophobic surfaces., *J. Phys. Condens. Matter.* 24 (2012) 464110. doi:10.1088/0953-8984/24/46/464110.
- [83] J.C. McDonald, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, Review General Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), (2000). 27-40
- [84] S. Bekri, L. Leclercq, H. Cottet, Polyelectrolyte multilayer coatings for the separation of proteins by capillary electrophoresis: Influence of polyelectrolyte nature and multilayer crosslinking, *J. Chromatogr. A.* 1399 (2015) 80–87. doi:10.1016/j.chroma.2015.04.033.
- [85] R. Nehmé, C. Perrin, H. Cottet, M.D. Blanchin, H. Fabre, Influence of polyelectrolyte coating conditions on capillary coating stability and separation efficiency in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 29 (2008) 3013–3023. doi:10.1002/elps.200700886.
- [86] L. Bendahl, S.H. Hansen, B. Gammelgaard, Capillaries modified by noncovalent anionic polymer adsorption for capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic capillary chromatography and capillary electrophoresis mass spectrometry, *Electrophoresis* 22 (2001) 2565–2573. doi:10.1002/1522-2683(200107)22:12

- [87] G. Decher, Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites, *Science* 277 (1997) 1232–1237. doi:10.1126/science.277.5330.1232.
- [88] H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, Stable Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2254–2260. doi:10.1021/ac9708755.
- [89] H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, Stable cationic capillary coating with successive multiple ionic polymer layers for capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 70 (1998) 5272–5277. doi:10.1021/ac9805221.
- [90] J.R. Catai, H.A. Tervahauta, G.J. De Jong, G.W. Somsen, Noncovalently bilayer-coated capillaries for efficient and reproducible analysis of proteins by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1083 (2005) 185–192. doi:10.1016/j.chroma.2005.06.001.
- [91] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Capillary electrophoresis of intact basic proteins using noncovalently triple-layer coated capillaries, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2408–2415. doi:10.1002/jssc.200900164.
- [92] T.W. Graul, J.B. Schlenoff, Capillaries modified by polyelectrolyte multilayers for electrophoretic separations, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4007–4013. doi:10.1021/ac990277l.
- [93] C.A. Currie, C.D. Woods, F.E. Stanley, A.M. Stalcup, Chiral separations using heparin and polyelectrolyte multilayers in capillary electrophoresis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 37 (2014) 2218–2231. doi:10.1080/10826076.2013.830266.
- [94] C.A. Luces, I.M. Warner, Achiral and chiral separations using MEKC, polyelectrolyte multilayer coatings, and mixed mode separation techniques with molecular micelles, *Electrophoresis*. 31 (2010) 1036–1043. doi:10.1002/elps.200900508.
- [95] C. Zheng, Y. Liu, Q. Zhou, X. Di, Capillary electrophoresis with noncovalently bilayer-coated capillaries for stability study of allergenic proteins in simulated gastrointestinal fluids, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 2933–2936. doi:10.1016/j.jchromb.2010.08.027.
- [96] R. Nehmé, C. Perrin, H. Cottet, M.D. Blanchin, H. Fabre, Influence of polyelectrolyte capillary coating conditions on protein analysis in CE, *Electrophoresis*. 30 (2009) 1888–1898. doi:10.1002/elps.200800688.
- [97] K.E. Swords, P.B. Bartline, K.M. Roguski, S.A. Bashaw, K.A. Frederick, Assessment of polyelectrolyte coating stability under dynamic buffer conditions in CE, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2427–2432. doi:10.1002/jssc.201100044.
- [98] R. Haselberg, F.M. Flesch, A. Boerke, G.W. Somsen, Thickness and morphology of polyelectrolyte coatings on silica surfaces before and after protein exposure studied by atomic force microscopy, *Anal. Chim. Acta.* 779 (2013) 90–95. doi:10.1016/j.aca.2013.03.066.
- [99] M. Weinbauer, H. Stutz, Successive multiple ionic polymer layer coated capillaries in the separation of proteins - Recombinant allergen variants as a case study, *Electrophoresis*. 31 (2010) 1805–1812. doi:10.1002/elps.201000077.
- [100] L. Leclercq, M. Morvan, J. Koch, C. Neusüß, H. Cottet, Modulation of the electroosmotic mobility using polyelectrolyte multilayer coatings for protein analysis by capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta.* 1057 (2019) 152–161. doi:10.1016/j.aca.2019.01.008.
- [101] J.B. Schlenoff, S.T. Dubas, Mechanism of polyelectrolyte multilayer growth: Charge overcompensation and distribution, *Macromolecules* 34 (2001) 592–598. doi:10.1021/ma0003093.
- [102] S.T. Dubas, J.B. Schlenoff, Polyelectrolyte multilayers containing a weak polyacid: Construction and deconstruction, *Macromolecules* 34 (2001) 3736–3740. doi:10.1021/ma001720t.
- [103] H.W. Jomaa, J.B. Schlenoff, Salt-induced polyelectrolyte interdiffusion in multilayered films: A neutron reflectivity study, *Macromolecules* 38 (2005) 8473–8480. doi:10.1021/ma050072g.
- [104] S.T. Dubas, J.B. Schlenoff, Swelling and smoothing of polyelectrolyte multilayers by salt, *Langmuir*. 17 (2001) 7725–7727. doi:10.1021/la0112099.
- [105] G. Ladam, P. Schaad, J.C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher, F. Cuisinier, In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers, *Langmuir* 16 (2000) 1249–1255. doi:10.1021/la990650k.
- [106] S.T. Dubas, J.B. Schlenoff, Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers, *Macromolecules* 32 (1999) 8153–8160. doi:10.1021/ma981927a.
- [107] S.L. Clark, M.F. Montague, P.T. Hammond, Ionic effects of sodium chloride on the templated

- deposition of polyelectrolytes using layer-by-layer ionic assembly, *Macromolecules* 30 (1997) 7237–7244. doi:10.1021/ma970610s.
- [108] J.B. Schlenoff, H. Ly, M. Li, Charge and mass balance in polyelectrolyte multilayers, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 7626–7634. doi:10.1021/ja980350+.
- [109] M. Castelnovo, J.F. Joanny, Formation of polyelectrolyte multilayers, *Langmuir* 16 (2000) 7524–7532. doi:10.1021/la000211h.
- [110] M. Lösche, J. Schmitt, G. Decher, W.G. Bouwman, K. Kjaer, Detailed structure of molecularly thin polyelectrolyte multilayer films on solid substrates as revealed by neutron reflectometry, *Macromolecules* 31 (1998) 8893–8906. doi:10.1021/ma980910p.
- [111] J.B. Schlenoff, S.T. Dubas, T. Farhat, Sprayed polyelectrolyte multilayers, *Langmuir* 16 (2000) 9968–9969. doi:10.1021/la001312i.
- [112] L. Ödberg, S. Sandberg, S. Welin-Klintström, H. Arwin, Thickness of Adsorbed Layers of High Molecular Weight Polyelectrolytes Studied by Ellipsometry, *Langmuir* 11 (1995) 2621–2625. doi:10.1021/la00007a048.
- [113] Z. Sui, D. Salloum, J.B. Schlenoff, Effect of molecular weight on the construction of polyelectrolyte multilayers: Stripping versus sticking, *Langmuir* 19 (2003) 2491–2495. doi:10.1021/la026531d.
- [114] T.R. Farhat, J.B. Schlenoff, Ion transport and equilibria in polyelectrolyte multilayers, *Langmuir* 17 (2001) 1184–1192. doi:10.1021/la001298+.
- [115] S. Bekri, L. Leclercq, H. Cottet, Influence of the ionic strength of acidic background electrolytes on the separation of proteins by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1432 (2016) 145–151. doi:10.1016/j.chroma.2015.12.060.
- [116] J.S. Fritz, S.A. Steiner, Effect of a soluble ionic polymer on the separation of anions by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 934 (2001) 87–93. doi:10.1016/S0021-9673(01)01281-X.

Chapitre 2:
**Superhydrophobic capillary coatings elaboration,
characterization and application to electrophoretic
separations**

Introduction au Chapitre 2 :

Le chapitre bibliographique a montré que la SH permettait de conférer aux surfaces des propriétés de non-mouillage et éventuellement de glissement. Le chapitre 2 a pour but de produire une surface SH dans un capillaire de silice vierge via la nanostructuration d'un revêtement chimiquement hydrophobe (le Glaco™), ce qui n'a encore jamais été fait dans des capillaires de diamètres typiquement compris entre 50 μm et 100 μm . Dans notre étude, la propriété importante des surfaces SH est la répulsion de l'eau et la formation d'une couche d'air entre la surface SH et la phase aqueuse. Notre but est de diminuer l'adsorption des analytes en phase aqueuse sur les parois du capillaire en faisant apparaître une couche d'air entre la paroi et la phase aqueuse, et ainsi réduire le plus possible la surface d'échange entre la paroi et la phase aqueuse. Ces capillaires rendus SH sont ensuite étudiés vis-à-vis de leur comportement hydrodynamique et électrocinétique, dans le but de réaliser des séparations électrophorétiques. Les améliorations apportées par l'utilisation du greffage SH sont comparées à un capillaire en silice vierge dans les mêmes conditions expérimentales.

Chapitre 2 : Superhydrophobic capillary coatings elaboration, characterization and application to electrophoretic separations

Charly Renard¹, Laurent Leclercq¹, Antonio Stocco^{2,a}, Hervé Cottet^{1*}

¹ IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, France

² L2C, Université de Montpellier, CNRS, France

^a Current address: ICS, Université de Strasbourg, CNRS, France

(Article publié dans J. Chromatogr. A, 2019, 1603, 361–370.)

* CORRESPONDING AUTHOR

Tel: +33 4 6714 3427, Fax: +33 4 6763 1046. E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

ABSTRACT.

Separation efficiency is ideally controlled by molecular diffusion in capillary electrophoresis (CE). However, other adverse phenomena, such as solute adsorption on capillary surface, tend to increase the peak dispersion. An interesting alternative to limit the solute adsorption is to avoid as much as possible the contact of the solute with the capillary surface by elaborating superhydrophobic (SH) coatings on fused silica capillary surfaces. This work describes an optimized protocol to get non-wettable SH coating using hydrophobically modified silica nanoparticle suspensions (Glaco™), based on simple capillary flushes and thermal stabilization. In this protocol, the control of the air flushing after the introduction of the Glaco™ suspension in the capillary was found crucial to get optimized coating coverage and reproducibility. The SH coating was characterized by ellipsometry, atomic force microscopy, scanning electron microscopy, contact angle (about 159°) and the observation of the meniscus of water in the coated capillary. The hydrodynamic behavior of the SH coated capillary was investigated by plotting the Poiseuille law. Finally, electrophoretic separations of a peptide

mixture in acidic conditions demonstrated the interest of this approach with an increase by a factor 2 of the separation efficiency compared to fused silica capillary.

Keywords: Superhydrophobic coating, wettability, adsorption, capillary electrophoresis.

Highlights:

- Elaboration of superhydrophobic coatings in narrow capillaries (down to 50 μm I.D.)
- Surface characterization of superhydrophobic coatings
- Hydrodynamic and electrokinetic behaviors of superhydrophobic capillaries
- Increasing the separation efficiency in capillary electrophoresis using superhydrophobicity

I. Introduction

Superhydrophobic surfaces (SHS) are generally generated from the combination of chemical hydrophobicity with micro and nano-structuration that makes the surface entirely water repellent. An air layer is formed between the surface and water solution poured on it. The most well-known examples can be found in Nature with lotus leaves, butterfly wings, petals of rose, or legs of Gerris [1-3]

. Direct applications of SHS include self-cleaning, antifreeze, anticorrosion, and anti-friction surfaces, together with droplet handling [1-3]. Other applications exist in pharmaceutical and biomedical fields, such as the study of cellular communication or the reduction of bacterial adhesion on biomedical implants [4].

HS can be characterized by the measurement of the static contact angle (CA), which is the macroscopic angle between the solid-liquid interface and the liquid-air interface when a water droplet is deposited on a solid surface. The higher the CA value, the more spherical the droplet is, and so, the more repellent to water the surface is. A surface is hydrophilic when $CA < 90^\circ$, while it is considered as hydrophobic when $90^\circ < CA < 120^\circ$, and superhydrophobic when $CA > 120^\circ$ [5].

SHS can be divided into two categories with antagonistic effects. The lotus effect prevents water molecules from adhering to the surface, while the petal effect corresponds to a sticking (but non-wetting) water drop on the surface. The difference between these two categories is generally related to pattern periodicity and surface roughness [2]. Apart from these two effects, surface wetting on SHS can be characterized by the so-called Cassie (non-wetting) [6] and Wenzel (wetting) states (Figure 1).

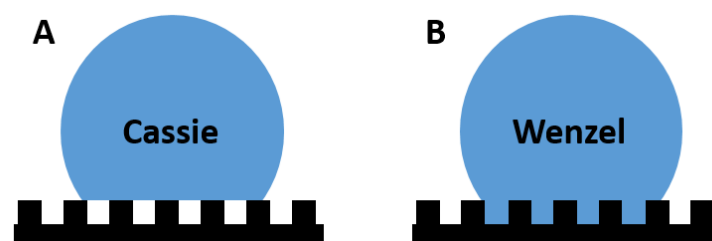


Figure 1. Scheme of a droplet in the non-wetting Cassie state (A), with the presence of air bubbles beneath the droplet, in the surface anfractuositities, and in the wetting Wenzel state (B), with the droplet filling all the anfractuositities of the surface beneath it.

In the Cassie state, air bubbles are present in the anfractuosités of the surface, while the liquid fill most of the space in the Wenzel state [7-8]. Some SHS can lead to slippage (Cassie state with a lotus effect), others not (Cassie state with a petal effect). In this context, Wenzel state corresponds to simple hydrophobic wetting. Due to the presence of air, water friction on SHS is reduced and generally characterized by the slip length that is defined as the length corresponding to the intercept along the axis orthogonal to the interface when a tangent line is drawn along the velocity profile at the interface [9-11].

SHS can be prepared in several ways that are generally based on silica nanoparticles, carbon nanotubes, SU-8 polymeric photoresist, polydimethylsiloxane (PDMS) or lithography [12]. For instance, microchannels (30 μm deep x 300 μm wide x 8 cm long) coated by octadecyltrichlorosilane (OTS), give a CA of 120° and 0.92 μm slip length [13]. Other examples can be found in the literature. Lotus-leaf layered columns (7 to 19 mm diameter, 145 mm height) were obtained by lotus leaf print on flat flexible cellophane paper (100 μm thick) and then filled with steel balls of 4.6 mm diameter, giving a CA higher than 150° and 47-117 μm slip length [14]. Cylindrical microchannels (150 μm diameter) were prepared with negative print of lotus leaf surface in polystyrene, giving a CA of 160° [15]. Microchannels were coated with carbon nanotubes, giving a CA of 165° and 20 μm slip length [16]. Superhydrophobic cells consisting of two surface-modified glass plates with nanostructured silica wall (by deposition of soot, tetraethoxysilane and alkyl trichlorosilane layers) were used with two platinum electrodes, giving a CA of 169° , less than 1 μm roughness, up to 30 nm slip length under 0 to 50 V/cm electrical field, but no increase of electroosmotic flow [17].

Capillary electrophoresis (CE) is a separation technique especially well-suited for the analysis of (bio)macromolecules such as peptides, proteins and polysaccharides. In the ideal case, when separation efficiency is controlled by molecular diffusion, the theoretical plate number in CE is inversely proportional to the molecular diffusion coefficient [18-21]. Therefore, the larger the solute is, the lower its molecular diffusion coefficient, and the higher the separation efficiency. However, other dispersive phenomena can occur, such as solute adsorption onto the capillary wall, which tend to decrease the separation efficiency [22]. In order to minimize protein adsorption, capillaries can be physically or chemically coated with a neutral [23] or charged polymer [24] or even using polyelectrolyte multilayers [25-26]. Njoya et al. proposed the use of silica colloidal crystals (with ordered arrangements of silica spheres

coated with polyacrylamide) for protein electrophoresis leading to plate height of only 0.15 μm [27]. An interesting alternative to avoid solute adsorption onto the capillary wall would be to limit the wettability of the water-based electrolyte onto the capillary surface. To our knowledge, the idea of using SHS in CE has not been yet investigated. When hydrophobic surfaces are used in CE or miniaturized chip electrophoresis [17, 28-31], researchers generally try to reduce the analyte adsorption by modifying/coating the capillary/channel wall and making them more hydrophilic. For instance in ref [30], electrophoretic separations of amino acids were compared in PDMS microchannels without and with an in situ polyethylene glycol covalent modification using air-plasma treatment and silanization [30]. Coated PDMS microchannels gave much better separation efficiency (up to 20 times) due to higher hydrophilicity leading to lower CA (64° instead of 106° for non-coated PDMS). In this work, we propose a paradigm change by making the capillary wall so hydrophobic that the capillary surface should become unwettable by the background electrolyte, and by the solute zone. By this way, the interactions between the solutes and the capillary wall should be reduced. Finally, it is worth noting that slip flow occurring in chromatography using colloidal crystals made of 470 nm silica spheres that are chemically modified with hydrocarbon considerably enhance the separation efficiency [32].

GlacoTM is a commercial isopropyl alcohol suspension containing hydrophobically modified silica nanoparticles used as a spray to make car windshields and wing mirrors superhydrophobic to improve visibility during rainy conditions. GlacoTM coating has been used and reported in literature based on a simple coating protocol consisting in the contact of the surface to be treated with the GlacoTM solution, followed by heating at 200°C for 30 min [33]. This process was generally repeated 3-4 times [33]. Atomic Force Microscopy (AFM) studies of the GlacoTM treated surface showed that particle size was about 30 to 50 nm, with 50 to 200 nm roughness, a CA of minimum 155° and a sliding angle less than 5° [33-34]. Superhydrophobicity was observed on GlacoTM treated microscope glass blade (with receding angle of 150° and advancing angle of 164°) [35].

This work aims at elaborating, characterizing and using superhydrophobic coatings in fused silica capillaries using GlacoTM deposition for electrophoretic separations.

II. Experimental section

II.1. Chemicals and samples

Glaco Mirror Coat Zero™ was purchased from Soft99 (Osaka, Japan). It is made of silica nanoparticles (hydrophobically modified with alkyl functions) suspension in isopropyl alcohol (see Material safety data sheet [36]). The nanoparticle concentration in the Glaco™ solution is about 4 g.L⁻¹, as quantified by weighting the dry residue after evaporation of the solvent. Ultrapure grade water (18 MΩ.cm) was produced on a Milli-Q equipment (Merck Millipore, USA). Sodium hydroxide (NaOH) and N,N-dimethylformamide (DMF, 99% m/m) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES) from VWR (Fontenay-sous-bois, France), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) from Thermo Fischer (Karlsruhe, Germany) and sodium phosphate, monobasic 99% m/m from Aldrich Chemical Company (Milwaukee, USA) were used as received to prepare the different background electrolytes in CE. Creatinine, alanine dimer (Ala-Ala), alanine trimer (Ala-Ala-Ala), alanine tetramer (Ala-Ala-Ala-Ala), Lys-His-Gly and Lys-His-Gly-NH₂ tripeptides were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Brilliant Blue FCF (food coloring, E133) was used as a water colorant purchased from Vahiné (Avignon, France) and used as is.

II.2. Glaco™ coating

Glass blades (76 x 26 mm, Thermo Scientific, Germany) were coated with Glaco™ by pouring Glaco™ solution on them using a 5 mL plastic pipette. Isopropyl alcohol was then evaporated and the coating was stabilized by placing the glass blades in an oven for 15 minutes at 250°C. The same process was repeated 3 times to obtain maximum covering of the glass surface by the Glaco™ nanoparticles.

Fused silica capillaries (PolyMicro Technologies, Photonlines, Saint-Germain-en-Layes, France) of 360 μm external diameter, various internal diameters (180, 100 and 50 μm), and 40 cm total length (30 cm to the detector window) were coated with Glaco™ by flushing at a given pressure and for a given duration that depended on the internal diameter (see Table 1). Excess of Glaco™ solution was removed by flushing with air at a well-defined

pressure/duration depending on the capillary internal diameter (I.D.) (see Table 1). Coating was then thermally stabilized by placing the capillaries in a GC-2010 Plus oven (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France) for 15 min at 250°C without any gas flow. The same process was repeated 4 times by alternating the flushing direction in the capillary (alternatively from the starting or the ending ends of the capillary) to obtain maximum covering of the capillary walls by the Glaco™ nanoparticles. Capillaries were finally let overnight under ambient air at room temperature before use.

II.3. Surface characterization methods

II.3.1 Contact Angle (CA)

Contact angle between droplets of 20 mM HEPES + 10 mM NaOH (pH 7.46) solution and Glaco™ treated glass blades was measured using PAT tensiometer (Sinterface, Berlin, Germany). Dropsnake plugin on ImageJ software was used for processing the picture of the droplet. Advancing contact angle was measured by growing gradually (with 1 µL steps) the droplet volume from 20 µL to 30 µL, while receding angle was measured by decreasing gradually the droplet volume from 30 µL to 20 µL.

II.3.2 Ellipsometry

Multiple angles of incidence ellipsometry (Multiskop Optrel, Sinzing, Germany) was used to measure the thickness d_{Glaco} and refraction index n_{Glaco} of the Glaco™ coating on a glass blade and the thickness of the air layer on a Glaco™ coated glass blade submerged in deionized water. The incidence angle of the laser beam (533 nm) could be finely modified and the reflected polarized light was detected by a four quadrant photodiode (2×2 cm²). Ellipsometry at the water-solid interface was measured by using light guides immersed in water in order to detect the reflection from the water-solid interface avoiding the reflection coming from the air-water interface [37].

II.3.3 Atomic Force Measurement

Tapping Mode Atomic Force Microscopy (TM-AFM) images were acquired with a Bruker Nanoman (Bruker SAS, Palaiseau, France) driven by Nanoscope 3A Quadrex electronics. The cantilever tips were Silicon Point Probe Plus™ NCSTR (Nanosensors, Neuchâtel, Switzerland) used at a constant force of 6.5 N.m⁻¹, resonance frequency of 157 kHz. All the image treatments

and the thickness measurements were performed using WSxM 4.0 Beta 8.2 and the resulting data were treated with the Fityk software to correct the background of the image.

II.3.4 Dynamic Light Scattering (DLS)

GlacoTM nanoparticles size was measured with a LitesizerTM 500 (Anton Paar, Graz, Austria) dynamic light scattering (DLS) equipment mounted with a BM10 module, driven by Kalliope 1.8.4 software. Quartz cells (10 mm x 10 mm x 45 mm) were used. Refraction index of isopropyl alcohol was 1.3749 at 25 °C. Transmittance was 98.3% at 90°. GlacoTM solution (4 g.L⁻¹ in nanoparticle) was used as received for the DLS measurement.

II.3.5 Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning Electron Microscopy (SEM) was realized using a Hitachi S4800 machine (Hitachi High Technologies America, Inc., Schaumburg, Illinois, USA). Thickness, roughness and nanoparticle size were measured on GlacoTM coated glass blades and capillaries. Inner surface of capillaries were made accessible to SEM by burning the external polyimide protection layer of the capillaries and then by shattering it with a ceramic capillary cutter on a double faced tape support to obtain some shards turned face up. Acceleration voltage varied from 0.1 to 30 kV depending on the magnification and sample conductivity.

II.3.6 Optical Microscopy

USB optical microscope n° 44302 (Celestron, California, USA) was used to observe the capillary wall-air-electrolyte interface in GlacoTM coated capillaries at ×150 magnification. Capillaries (40 cm total length) of various internal diameters (50, 100 and 180 µm) were observed after being partially filled with brilliant blue dyed water (1 g.L⁻¹) and air bubble. Dyed water and air were introduced with a syringe fixed on capillary by a LuerTightTM 360 µm outside diameter (O.D.) tubing to Luer connection (P-662 rapid connection, IDEX Health and Science, California, USA).

II.3.7. C4D profiling of the GlacoTM coated capillary

The capacitively coupled contactless conductivity detector (C4D) was a TraceDec (Innovative Sensor Technologies GmbH, Innsbruck, Austria) used with the following settings: frequency 2xHIGH, voltage -12 Db, gain 50% and offset 0. Conductivity measurements were performed

along the capillary under a $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ flow rate of 20 mM HEPES + 10 mM NaOH electrolyte, pH 7.46. The flow rate was ensured by a syringe-pump (KD Scientific, USA) connected to the capillary by a LuerTight™ connection (P-662 rapid connection, IDEX Health and Science, California, USA). The C4D cell was moved along the capillary by steps of 3 cm, and the conductivity was measured at each point. Fused silica capillaries of different I.D. were tested as reference and compared to a 100 μm I.D. Glaco™ coated capillary.

II.3.8. Hydrodynamic behavior: Poiseuille law

The flow rate under given hydrodynamic pressure was measured using the CE equipment on Glaco™ coated capillaries and fused silica capillaries (40 cm total length, 30 cm to detector) of three different I.D. (50, 100 and 180 μm), by applying different pressures with the 20 mM HEPES + 10 mM NaOH electrolyte, pH 7.46, containing 0.5% v/v DMF as UV marker. Between each run, the capillary was flushed by the same background electrolyte (BGE), without UV marker, at a given pressure depending of the capillary I.D. (3 psi 2 min for I.D. 100 μm , 10 psi 5 min for I.D. 50 μm , and 1 psi 2 min for I.D. 180 μm , with 1 psi = 69 mbar). For 50 μm (resp. 100 μm and 180 μm) I.D. capillaries, applied pressure range was 3 to 14 psi (resp. 1 to 3 psi and 0.2 to 1.2 psi). Detection of the marker was monitored by UV absorbance at 190 nm. Flow-to-pressure relationship was used to calculate the apparent capillary diameter, and to estimate the slip length.

The flow rate Q (in $\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$) at a given pressure ΔP (in Pa) was calculated from the detection time t_{DMF} (in s) of the DMF marker according to:

$$Q = \frac{l\pi R_c^2}{t_{DMF}} \quad (1)$$

where l is the length of the capillary to the UV detection window and R_c is the capillary radius. Poiseuille law (Q vs ΔP) was systematically plotted. The slope a of the Q vs ΔP relationship depends on the apparent radius R_e of the capillary, according to the following equation:

$$Q = \frac{\pi R_e^4 \Delta P}{8\eta L} \quad (2)$$

where η is the viscosity of the solution (in Pa.s) and L is the total length of the capillary (in m). It is therefore possible to determine the apparent radius R_e from the slope a using the following equation:

$$R_e = \left(\frac{8\eta L a}{\pi} \right)^{1/4} \quad (3)$$

II.3.9. Capillary electrophoresis

Capillary electrophoresis experiments were carried out on a P/ACE™ MDQ Beckman-Coulter (Sciex, Villebon sur Yvette, France) piloted by 32 Karat software. Bare fused silica and Glaco™ coated capillaries of various internal diameter (I.D.), and of total capillary length 40 cm and effective capillary length 30 cm, were tested for the electrophoretic separation of peptides mixtures. Unless otherwise specified, all electrolytes were prepared with boiled ultrapure water to obtain gas-free solutions. Electrophoretic separations were performed in a Tris/Phosphate 6.5 mM/14.1 mM electrolyte at pH 2.5 (10 mM ionic strength). Before each run the capillary was flushed at 3 psi for 2 min (I.D. 100 μm). Peptides mixture for analysis (0.1 g.L⁻¹ in water of Lys-His-Gly, Arg, creatinine, Ala, Ala-Ala and Ala-Ala-Ala) was injected into the capillary at 0.2 psi, 2 s (1.06 nL for a capillary of 50 μm I.D.). Separations were realized at 10 kV with a pressure of 3 psi at both capillary ends of the capillary to stabilize the electrical current. Between each run, the capillary was flushed by the BGE at a pressure depending of the capillary I.D. (3 psi 2 min for I.D. 100 μm, 10 psi 5 min for I.D. 50 μm, and 1 psi 2 min for I.D. 180 μm). The temperature of the capillary cartridge was set at 25°C. UV detection was performed at 214 nm. Separation efficiency was determined using the following equation:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_m}{\delta} \right)^2 \quad (4)$$

where t_m is the migration time and δ is the half-height peak width determined using CEval 0.6 software available at the following address [<https://echmet.natur.cuni.cz/software/ceval>].

III. Results and discussion

III.1. Superhydrophobic glass blade

Glaco™ coated glass surfaces were first prepared on glass blades, based on simple contact of Glaco™ solution on the surface followed by a heating treatment at 250°C, both repeated three times (see the experimental protocol described in the experimental part). Figure 2 displays a picture of a ~20 μL water droplet deposited on the Glaco™ coated glass surfaces.

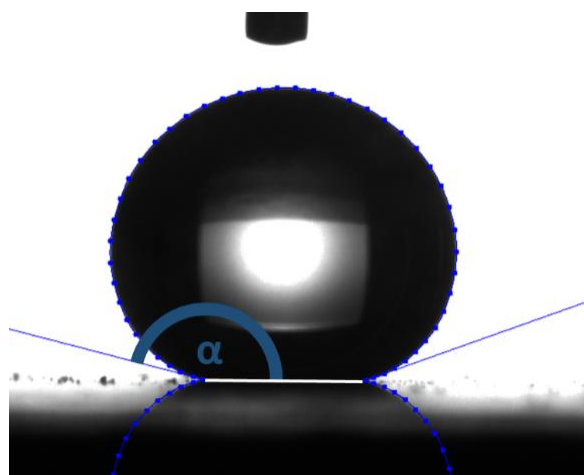


Figure 2. Picture of a $\sim 20 \mu\text{L}$ droplet (20 mM HEPES, pH 7.45) deposited on a Glaco™ coated glass blade ($76 \times 26 \text{ mm}$) surface. Contact angle, $\text{CA} = 159^\circ$.

A static contact angle (CA) of $159^\circ (\pm 6^\circ)$, which is the standard deviation based on $n = 4$ repetitions on 3 different blades) was observed for advancing droplet (i.e. growing droplet) and $145^\circ (\pm 12^\circ)$ for receding (i.e. decreasing droplet size), clearly demonstrating that Glaco™ coated glass blades present superhydrophobic behavior (defined as $\text{CA} > 120^\circ$). Figure S11 shows a photography of an immersed glass blade and the air layer covering it. The silver-mirror sheen of the immersed coated glass blade is due to a thin air layer retained on the surface, and is the signature appearance of Cassie state [34].

To better characterize the surface, the thickness of the Glaco™ layer and of the air layer between the immersed Glaco™ coated glass surface and water were measured by ellipsometry (Figure 3).

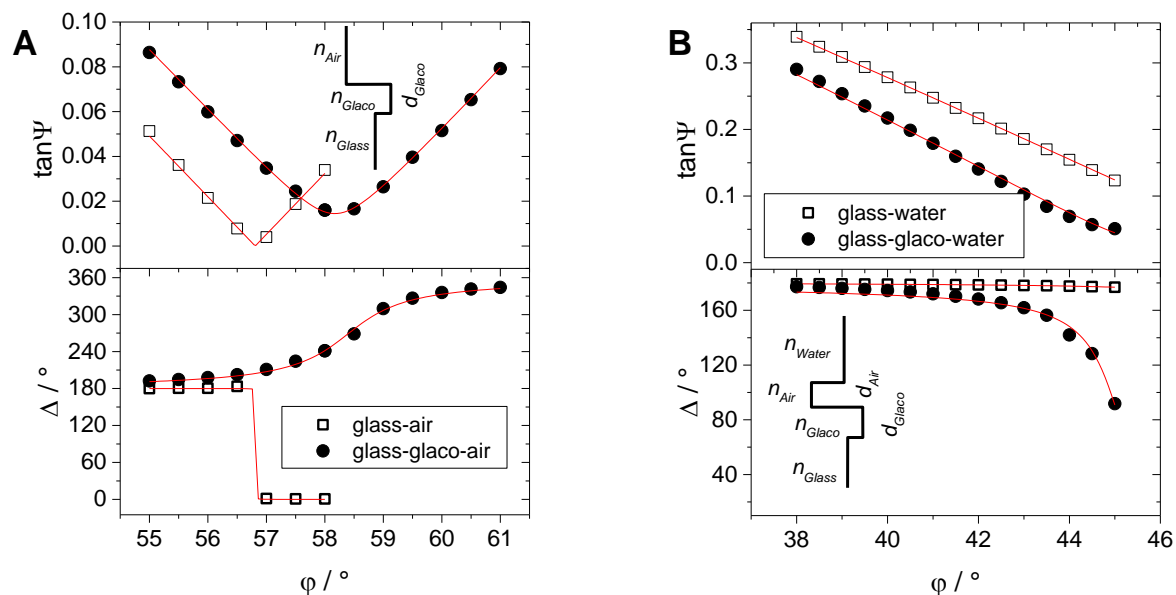


Figure 3. Ellipsometric scans of Glaco™ coated glass blade at the solid-air interface (A) and solid-liquid interface (B). Ultrapure water was used for (B).

Uncoated glass blade in contact of water shows the absence of an air layer at the solid-liquid interface (Figure 3A). Figure 3A shows scans of the ellipsometric amplitude ($\tan\Psi$) and phase (Δ) as a function of the incident angle (ϕ) for a bare and a Glaco™ coated glass surfaces exposed to air. Around the Brewster angle ($\phi_{Br} = \arctan(1/n_{Glass}) = 56.8$), $\tan\Psi$ and Δ change sharply for the uncoated surface confirming the absence of an interfacial layer and the cleanness of the glass substrate. In the presence of a Glaco™ coating, $\tan\Psi$ and Δ deviate strongly from the ones of the bare surface, which allows us to evaluate the average thickness and refractive of the coating: $n_{Glaco} = 1.58 \pm 0.1$ and $d_{Glaco} = 270 \pm 5$ nm (see inset of Figure 3), assuming a single layer interfacial profile between two macroscopic media: water and air. Ellipsometry was also performed for glass blades in water, as shown in Figure 3B. In order to fit these results, we introduce an additional interfacial layer of refractive index n_{Air} and thickness d_{Air} , fixing the refractive index of the glass substrate n_{Glass} and the thickness of the Glaco™ coating (as obtained from Figure 3A). From the fits, we obtain $n_{Air} = 1.17-1.24$ and thicknesses $d_{Air} = 124-208$ nm. Being $n_{Air} < n_{Water} = 1.333$, we can interpret this result as the observation of gas bubbles trapped in water on the hydrophobic Glaco™ surface. The interfacial layer between water and the Glaco™ coating could be modelled as a mixed layer composed by gas bubbles immersed in water. The volume fraction of air f in the interfacial layer of thickness d_{Air} could be evaluated accounting for the Wiener effective medium approximation [38]:

$$n_{Air}^2 = f + (1 - f)n_{Water}^2 \quad (5)$$

which leads to $f = 0.31-0.52$.

Figure 4 displays the surface topology of the Glaco™ onto the glass blade as observed by TM-AFM.

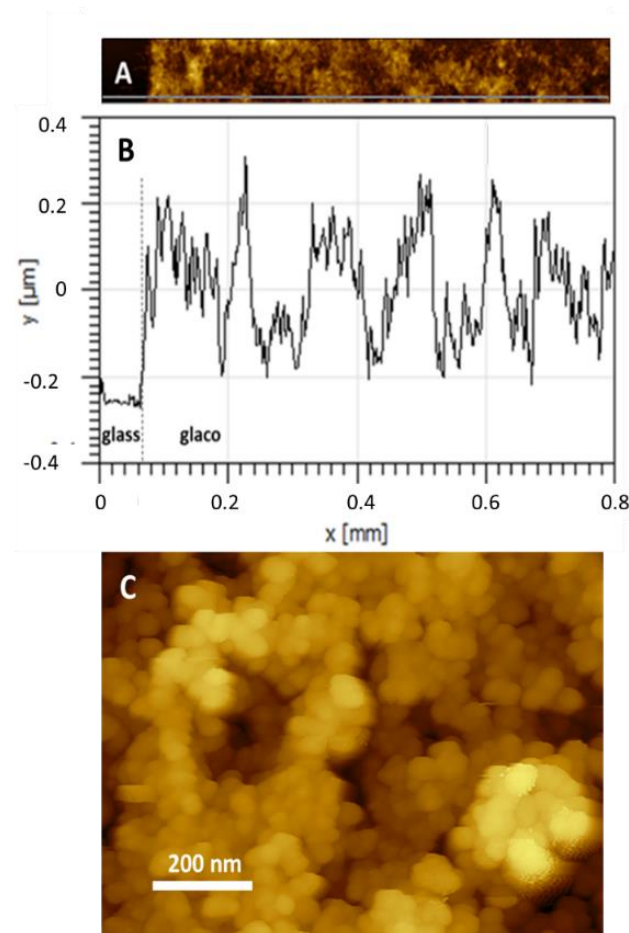


Figure 4. (A) Tapping mode AFM scan of a Glaco™ coated glass blade surface with a bare glass space (black) ; (B) corresponding texture profile of AFM scan showing the size and structure of the Glaco™ nanoparticles and clusters ; and (C) zoom in of the Glaco™ coating.

Excellent coverage of the surface was observed, with a thickness of about 200 nm (Figure 4A and 4B). Particle size was about 30 nm (Figure 4C) and roughness was about 100 nm (Figure 4B). Granulometric distribution of the Glaco™ solution (in isopropyl alcohol) measured by DLS showed an intensity average hydrodynamic diameter of 135 nm (with a polydispersity index of 23%). Glaco™ suspension is made of stable raspberry shaped clusters of smaller nanoparticles (~30 nm diameter) as shown in Figure 4C. These results are in agreement with a self-similar fractal structure [39]. Neither ultrasounds, nor dilution, were found to modify cluster size (monitored by DLS).

III.2. Superhydrophobic capillary coating

Glaco™ coated capillaries were then prepared according to an optimized protocol described in the experimental part. In brief, this protocol is based on the 4-times repetition of a three steps procedure based on: (i) flushing of the capillary with the Glaco™ suspension; (ii) controlled air flushing of the capillary leading to a Glaco™ film deposition onto the capillary surface and (iii) the thermal stabilization of the coating at 250°C in a GC oven. Step (ii) was found to be crucial to control the quantity of Glaco™ deposited onto the capillary surface. The thickness (ε) of the Glaco™ film remaining on the fused silica capillary when flushing with air strongly depends on the applied air pressure to remove the Glaco™ suspension, as shown by equation (6) from the Landau, Levich and Derjaguin (LLD) theory (also known as the Bretherton law)[40]:

$$\varepsilon = 1.34R_c Ca^{2/3} \quad (6)$$

where Ca is the dimensionless capillary number defined by equation (7):

$$Ca = \frac{\eta V}{\gamma} \quad (7)$$

γ is the surface tension of the coating solution (in N.m⁻¹) and V is the linear velocity of the coating solution flushed by air pressure (in m.s⁻¹). Combining equations (6), (7) with the Poiseuille law leads to:

$$\varepsilon = 1.34R_c^{7/3} \left(\frac{\Delta P}{8L\gamma} \right)^{2/3} \quad (8)$$

where ΔP is the applied pressure at which the air replace the Glaco™ solution, and L is the capillary length. It is worth noting that equations (6) and (8) are only valid for Ca lower than 10⁻². The pressure ΔP were adjusted so that the coating thickness was similar for all capillary I.D.. Taking $\gamma = 0.0217$ N.m⁻¹ at 20°C for isopropyl alcohol (solvent of Glaco™ suspension), and the ΔP values set in Table 1 for each capillary I.D., leads to Glaco thickness $\varepsilon = 1.1, 1.2$ and 1.0 μm for capillary I.D. of 50, 100 and 180 μm , respectively. Ca numbers are 5.9×10^{-3} , 2.3×10^{-3} , 7.6×10^{-4} respectively, demonstrating the validity of equation (8). Following this experimental protocol, very good coating coverage of the capillary inner wall surface was observed, as shown by scanning electron microscopy (SEM) in Figure 5, even if the surface

coverage was found less effective in capillaries (Figure 5C to 5F) than in glass blade (Figure 5A).

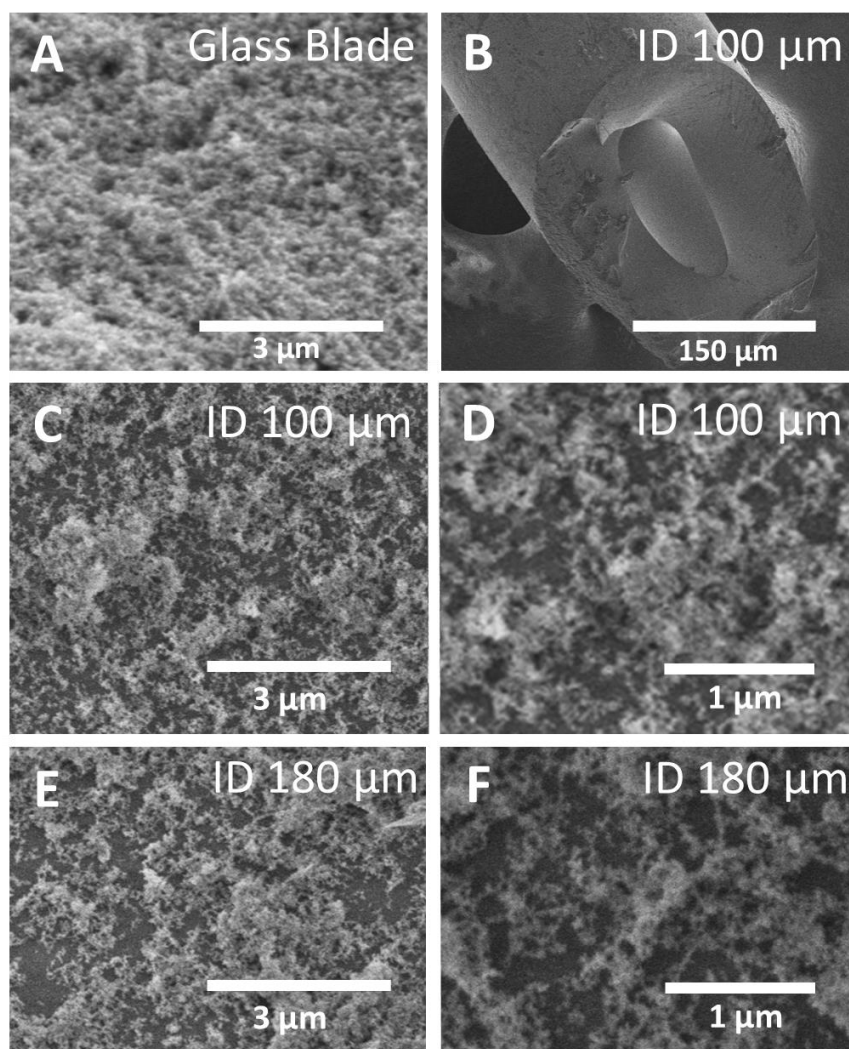


Figure 5. SEM pictures of Glaco™ coated surfaces. Glaco™ coated glass blade (A). Beveled capillary end (100 μm internal diameter capillary) (B). (C) and (D) display different zooms of a 100 μm internal diameter capillary inner wall coated by Glaco™. (E) and (F) show different zooms of a 180 μm internal diameter capillary inner wall coated by Glaco™.

Scanning contactless conductivity detector (sC4D) was next used to sense the capillary inner surface (as discussed in a review paper [41]) by measuring the conductivity at different positions along the capillary under constant flow rate with a 20 mM HEPES electrolyte (pH 7.46). The conductivity measurements confirm that the thickness of the glaco coating is negligible compared to the capillary I.D., as the conductivity was similar on Glaco™ coated and on a fused silica capillaries (see Figure SI2).

To demonstrate that the superhydrophobicity was also observed inside the capillaries (and not only on the coated glass blades), the meniscus of a blue colored water solution injected in Glaco™ coated capillaries was compared to the one observed in a fused silica capillary (Figure 6).

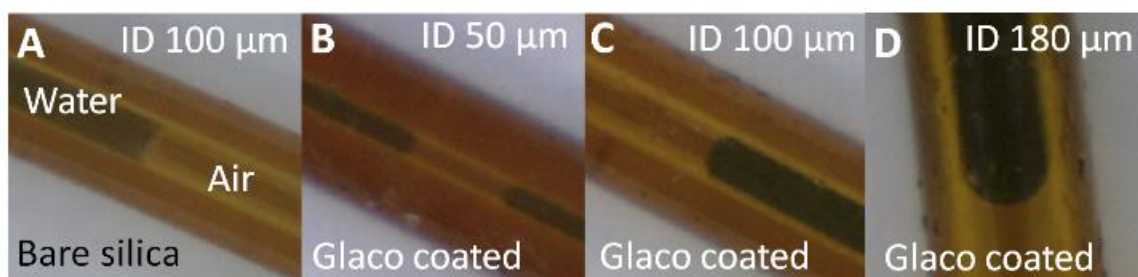


Figure 6. Visualization of the meniscus in bare fused silica (A: 100 μm ID) and in Glaco™ coated capillaries of different internal diameters (B: 50 μm; C: 100 μm and D: 180 μm ID) by optical microscopy (magnification x50). Capillaries are filled with blue colored water (dyed with E133 at 1 g.L⁻¹) and air. Glaco™ coated capillaries are prepared according to the protocol given in section 2.2 (see also Table 1).

As expected for a SHS, the meniscus was reversed in the case of Glaco™ coated capillaries for all internal diameters (50, 100 and 180 μm I.D.). It is worth noting that flushing the capillary with air by hand using a syringe and LuerTight™ connector in step (ii) of the coating protocol did not give reversed meniscus (only flat profile of the interface; not shown). Similarly, using lower pressure in step (ii) than those given in Table 1, leads to thinner film deposition (< 1 μm) and weaker SH properties.

III.3. Hydrodynamic behavior

Before studying the hydrodynamic behavior (Poiseuille law), it was first observed that a minimal pressure of 0.3 psi was required to flush a freshly prepared 180 μm I.D. Glaco™ coated capillary, initially filled with air, with a HEPES/Na BGE. Below that limiting value, the BGE did not enter in the capillary. This is in good agreement with the minimum pressure predicted by the Young-Laplace law:

$$P_{\min} = \frac{2\gamma}{R_c} \quad (9)$$

with $\gamma = 72 \text{ N.m}^{-1}$, $R_c = 90 \text{ μm}$, leading to $P_{\min} = 0.23 \text{ psi}$. This experimental observation is in agreement with the SHS of the Glaco™ coated capillary.

Figure 7A displays the BGE fronts (0.5% v/v DMF was added in the BGE as a marker) obtained at different applied pressures in Glaco™ coated capillaries, initially filled with HEPES/Na BGE at 1 psi 2 min, and in fused silica capillary for comparison (all capillaries with 180 μm I.D.). The higher the applied pressure, the shorter the elution time. Flow rates were plotted against the applied pressure (Figure 7B). The slope is directly related to the apparent capillary radius, R_e , that can be determined using equation (3). The blue trace in Figure 7B corresponds to the behavior of a fused silica capillary, leading to an effective radius of 94 μm which is very close to the expected value of 90 μm, assuming no-slip boundary conditions at the silica surface. As for the superhydrophobic 180 μm I.D. Glaco™ coated capillary, it was first observed a shift in the Poiseuille law with a pressure drop of about 0.3 psi (or 2100 Pa, yellow trace in Figure 7B), which is due to the presence of multiple air bubbles in the capillary.

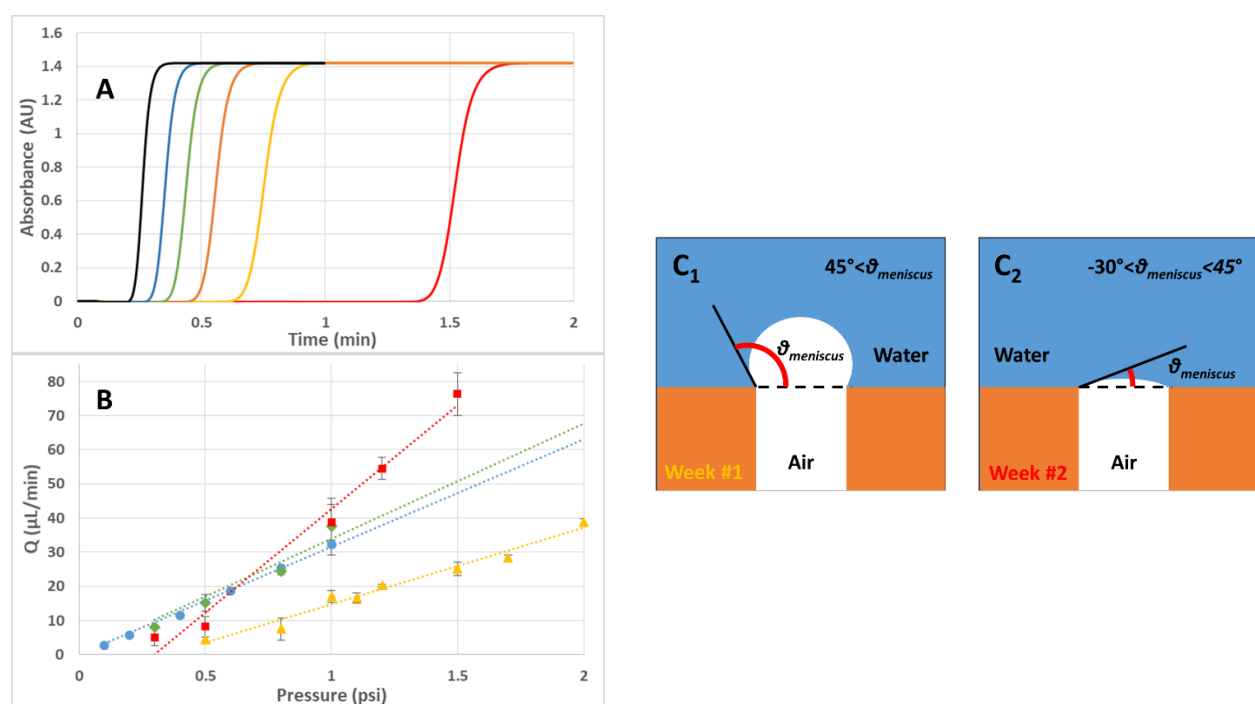


Figure 7. DMF fronts obtained at different applied pressures on Glaco™ coated capillary (A): 2 psi (black), 1.5 psi (blue), 1.2 psi (green), 1 psi (orange), 0.8 psi (yellow) and 0.5 psi (red) and the Poiseuille profiles obtained for different 180 μm ID capillaries (B): bare fused silica capillary (Blue ●), Glaco™ coated capillary week #1 (Yellow ▲), week #2 (Red ■), and week #3 (Green ◆). Glaco™ coated capillaries # 1, 2 and 3 correspond to the same capillary used in the first week, second week and third week of experiments. Each flow rate determination was realized in triplicate (error bars are \pm one SD). Experimental conditions: capillary dimensions 180 μm ID x 40 cm length (30 cm to the detector). BGE: 20 mM HEPES + 10 mM NaOH at pH 7.65. Marked BGE contains 0.5 % v/v DMF in the HEPES/Na BGE. BGE flush between runs: 1 psi (~ 70 mbar), 2 min. (C₁) and (C₂) show schemes of an air bubble in the capillary, during week #1 and week #2.

Using equation (9), we can estimate that a bubble separating two plugs of BGE in a 180 μm I.D. capillary generate a pressure drop ΔP_{bubble} of ~ 100 Pa taking $\gamma = 72 \text{ N.m}^{-1}$, $R_c = 90 \mu\text{m}$, $\theta_r = 145^\circ$ and $\theta_a = 160^\circ$:

$$\Delta P = \frac{\gamma}{R} (\cos(\theta_r) - \cos(\theta_a)) \quad (10)$$

This observation means that the pressure drop would correspond to a train of approx. 20 bubbles in the whole capillary. Experimentally, using a USB optical microscope, 14 to 24 bubbles could be observed in the GlacoTM coated capillary, in good agreement with the expectations.

The Poiseuille law measurements was duplicated one week later on the same capillary, leading to the red trace with apparent slippage (slope higher than bare silica slope) corresponding to a slip length of 23.3 μm , calculated from the Poiseuille law corrected from the slip length factor [42] leading to:

$$b = \frac{2\eta La}{\pi R^3} - \frac{R}{4} \quad (11)$$

with b the slip length and a the slope of the Poiseuille profile (i.e. $Q/\Delta P$). The poor linearity of the Poiseuille law at low flow rate can be explained by unstable flows (i.e. the flow can be temporally stopped), leading to non-linear behavior.

Finally, the same experiments performed one week later, leads to the green trace, which is similar to the fused silica capillary. These observations are in agreement with a progressive coating degradation that led to the loss of the meniscus inversion upon time. The fact that the slipping behavior (higher slope in the Poiseuille law than for fused silica capillary) was observed at intermediate state (in week 2), could be related to the pattern and the density of the GlacoTM coating, which is affected by the progressive coating degradation. Indeed, it was shown recently that the effective slip length strongly depends on the meniscus angle $\theta_{meniscus}$ of the nanobubble trapped between the surface anfractuosités and the liquid (see Figure 3 in ref. [43]). In the Cassie regime, when bubbles fill the holes, $\theta_{meniscus}$ between -30° and 45° leads to positive slip length with a maximum slip at $\sim 0^\circ$. For $\theta_{meniscus} > 45^\circ$, the slip lengths become negative, i.e. smaller than in the Wenzel case (without any gas phase trapped on the surface = no slip). Negative effective slip lengths can be explained by an immobilized layer of the liquid close to

the wall. In this limit, the liquid–solid friction is higher than on a non-slipping surface (without holes) [43]. We can imagine that the freshly prepared Glaco™ SHS leads to high $\theta_{meniscus}$ ($>45^\circ$) with no slipping surface. Then, the aging of the coating may favor the formation of less protruding gas bubbles and the slip condition at the SHS surface occurs (ideal metastable Cassie slipping state), before recovering a more classical no-slip condition (Wenzel state), leading to similar hydrodynamic behavior as observed on silica surface.

Similar results were obtained on 100 μm and 50 μm I.D. Glaco™ coated capillaries (see Figures SI3 and SI4), even if the intermediate slipping state was not observed; probably because it is metastable.

To get more insight on the reason of the coating degradation upon time, and to investigate if the degradation was caused by the mechanical erosion due to the capillary flushing between hydrodynamic experiments (1 psi \sim 70 mbar, 2 min), a freshly coated capillary was left in the HEPES/Na pH 7.5 BGE to see if the meniscus was lost with time in absence of capillary flushing. The meniscus starts to be altered after 4 to 7 days (see Figure SI5 for more details), while the SHS was conserved even after 18 days of contact with a Tris/Phosphate pH 2.5 BGE. This is why the pH 2.5 BGE was used to study the electrokinetic behavior.

III.4. Electrokinetic Behavior of SHS coated capillaries

Freshly prepared 100 μm I.D. Glaco™ coated capillaries were used to separate a peptide mixture composed of Lys-His-Gly-NH₂, Lys-His-Gly, creatinine, Ala-Ala, Ala-Ala-Ala and Ala-Ala-Ala-Ala in acidic conditions (Tris/Phosphate 6.5 mM/14.1 mM at pH 2.5). Separation efficiencies were compared with those obtained on a fused silica capillary in the same conditions. Figure 8 shows the electrophoregrams and the corresponding current intensity obtained using the fused silica capillary (Figure 8A) and the Glaco™ coated capillary at different times (Figure 8B to 8E).

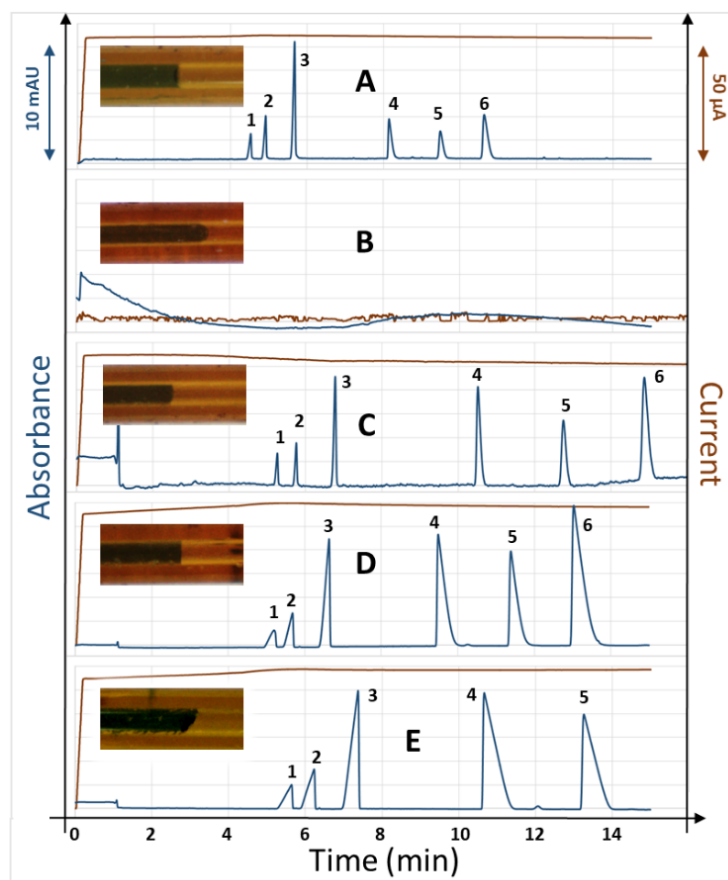


Figure 8. Electrophoregrams (blue traces) of a peptide mixture obtained on bare fused silica capillary (A), freshly prepared Glaco™ coated capillary (B), Glaco™ coated capillary after 5 runs (C), Glaco™ coated capillary after 10 runs (D), and Glaco™ coated capillary after 15 runs (E). Corresponding current intensity are displayed in brown. Inserts show the water (dyed with E133 at 1 g.L⁻¹) – air (translucent brown) interface of each capillary. Experimental conditions: capillary dimensions 100 μm x 40 cm length (30 cm to the detector). Background electrolyte: Tris/Phosphate 6.5 mM/14.1 mM at pH 2.5. Voltage: 10 kV. Pressure: + 3 psi at both ends. Injection: 2 psi, 0.2 s. Sample identification: Lys-His-Gly-NH₂ (1), Lys-His-Gly (2), Creatinine (3), Ala-Ala (4), Ala-Ala-Ala (5) and Ala-Ala-Ala-Ala (6).

Separations could not be obtained on the freshly prepared Glaco™ coated capillaries (Figure 8B) with reversed meniscus (see insert in Figure 8B), due to unstable current intensity probably because of the presence of large air bubbles in the capillary. This phenomenon was observed despite the degassing of the BGE (using boiled water) and the application of a +3 psi pressure on both ends of the capillary to help to stabilize the current intensity. After 5 runs, the meniscus was less reversed, and stable separations could be obtained with +3 psi pressure (Figure 8C). Figure 9 gives the separations efficiencies (in plate number) obtained on a fused silica capillary (blue) and on three different Glaco™ coated capillaries. Much better separation efficiencies were obtained on Glaco™ coated capillaries (up to 60 000 plates) compared to fused silica capillary (less than 25 000 plates).

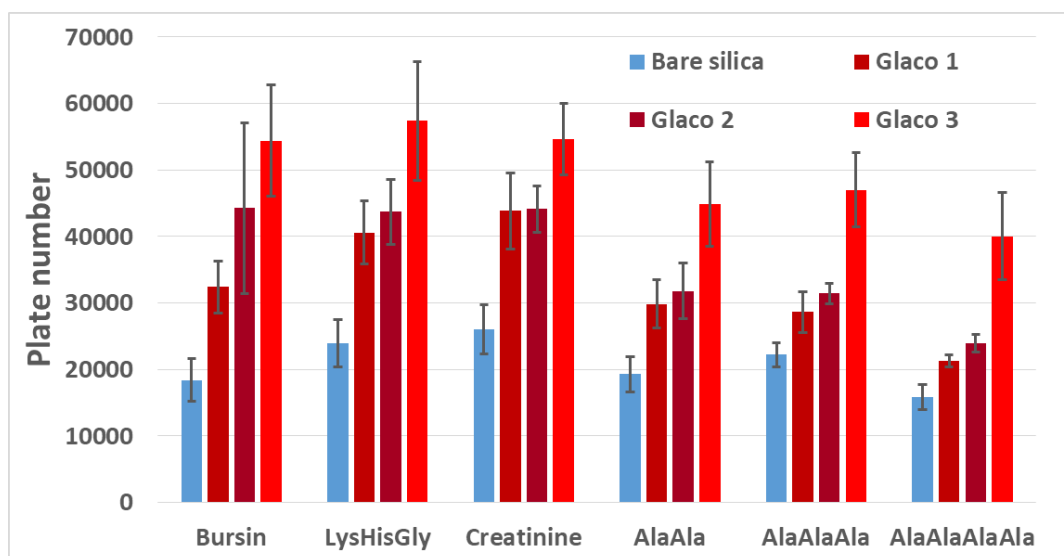


Figure 9: Separation efficiencies for each peptide obtained on bare fused silica capillary and on three different Glaco™ coated capillaries. Plate numbers are average values (\pm one SD) obtained on 4 successive runs determined from run 5 (the first run with stable current intensity) to run 9 for each Glaco™ coated capillary. Experimental conditions as in Figure 8.

These results were reproducible, as shown by the data reported on 3 different Glaco™ coated capillaries. These encouraging results demonstrate that a low wettability of the capillary surface can increase the separation efficiency (with an average gain by a factor 2 on the separation efficiency). However, the stabilization of the current intensity is difficult to obtain on freshly SHS due to air bubble formation.

Increasing the total number of runs leads to some coating degradation as demonstrated by the shape of the meniscus (see Figures 7C to 7E), which tends to become flat (Figure 7D), or not well defined (Figure 7E), probably because of the occurrence of coating heterogeneities. This degradation tends to increase the peak dispersion, and thus, to decrease the separation efficiencies. It is worth noting that a progressive wetting of the surface leading to the Wenzel state, instead of a coating degradation, was discarded since the SH state was not recovered after heating of the degraded capillary in a GC oven at 250°C for 15 min.

Coming back to freshly prepared SHS capillaries, the +3 psi stabilization pressure (both ends) used to try to stabilize the current intensity was arbitrarily chosen. Conceptually, it only had to be lower than P_{lim} , the pressure above which wetting of the coating is forced by the compression of the air bubble. This limiting pressure value P_{lim} was evaluated to be ~ 100 psi (7.1 bars) using equation (12):

$$P_{\text{lim}} = \frac{\gamma}{r} \quad (12)$$

taking γ the superficial tension of the BGE ($72 \times 10^{-3} \text{ N.m}^{-1}$), and r the roughness of the capillary wall (100 nm, see AFM measurement). Stabilization pressures higher than 3 psi were tested (up to 80 psi), but none of those tests gave better results regarding current stabilization (or separation efficiency) compared to the application of 3 psi. The current intensity was not stabilized faster (there were still approx. 5 runs similar to Figure 8B before the capillary behavior was similar to Figure 8C).

IV. Conclusion

In this work, we report for the first time a simple coating protocol to obtain superhydrophobic coatings in fused silica capillaries with I.D. comprised between 50 μm and 180 μm . The pressure of the air flush to remove the GlacoTM coating suspension was found to be crucial to control the thickness, the homogeneity and the reproducibility of the coating layer. The coating layer was $\sim 200\text{-}300$ nm thick, with 100 nm roughness and $\sim 100\text{-}200$ nm air layer when dipped in water. SHS were obtained in the 50-180 μm I.D. fused silica capillaries as demonstrated by the shape of the meniscus and the existence of a limiting pressure to introduce water in a capillary previously filled with air. The hydrodynamic behavior of the superhydrophobic capillaries revealed the presence of air bubbles in the capillary, as observed optically and by the pressure drop in the Poiseuille law. Initially, the superhydrophobic capillaries did not display any slipping behavior, but the hydrodynamic behavior changed with time with intermediate metastable slipping state (slipping length ~ 23 μm). Electrophoretic separations were difficult to obtain in freshly prepared superhydrophobic capillaries due to the presence of air bubbles leading to unstable current intensity. After a few (typically 5) instable runs, electrophoretic separations of peptides display improved separation efficiencies (by a factor ~ 2) compared to fused silica capillaries, demonstrating the possibility to improve electrophoretic separations by using superhydrophobic coatings. This first proof-of-concept should be further studied to find better coating long-term stability and to improve the current intensity stability.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*herve.cottet@umontpellier.fr

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Michel Ramonda (UM) for AFM, and Didier Cot (IEM, UM) for SEM measurements. José Bico (ESPCI), Anne-Laure Biance and Christophe Ybert (iLM, Université de Lyon) are gratefully acknowledged for fruitful discussions.

References

- [1] W. Barthlott, C. Neinhuis, Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces, *Planta* 202 (1997) 1-8
- [2] M. Nine, T. Tung, F. Alotaibi, D. Tran, D. Losic, Facile Adhesion-Tuning of Superhydrophobic Surfaces between “Lotus” and “Petal” Effect and Their Influence on Icing and Deicing Properties, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 8393-8402
- [3] Y. Zhang, H. Xia, E. Kim, H. Sun, Recent developments in superhydrophobic surfaces with unique structural and functional properties, *Soft Matter* 8 (2012) 11217-11231
- [4] E. Falde, S. Yohe, Y. Colson, M. Grinstaff, Biomaterials Superhydrophobic materials for biomedical applications, *Biomaterials* 104 (2016) 87-103
- [5] K. Law, Definitions for hydrophilicity, hydrophobicity, and superhydrophobicity: Getting the basics right *J. Phys. Chem. Lett.* 5 (2014) 686-688
- [6] A. Cassie, S. Baxter, Wettability of porous surfaces, *Trans. Faraday Soc.* 40 (1944) 546-551
- [7] L. Lafuma, D. Quéré, Superhydrophobic states, *Nature Materials* 2 (2003) 457-460
- [8] D. Quéré, J. Bico, Modulation du mouillage par des microtextures, *Houille Blanche* 4 (2003) 57-60
- [9] Y. C. Jung, B. Bhushan, Biomimetic structures for fluid drag reduction in laminar and turbulent flows, *J. Phys.: Condens. Matter* 22 (2010) 035104-035113
- [10] A. Maali, B. Bhushan, Measurement of slip length on superhydrophobic surfaces, *Phil. Trans. R. Soc. A* 370 (2012) 2304-2320
- [11] C. Navier, Mémoire sur les Lois du Mouvement des Fluides, Académie Royale des Sciences de l’Institut de France Paris Vol. VI (1822) 390-440
- [12] Y. Yoon, D. Kim, J. Lee, Hierarchical micro/nano structures for super-hydrophobic surfaces and super-lyophobic surface against liquid metal, *Micro Nano Syst. Lett.* 2 (2014) 3-21
- [13] D. C. Tretheway, C. D. Meinhart, A generating mechanism for apparent fluid slip in hydrophobic microchannels, *Phys. Fluids* 16 (5) (2004) 1509-1515
- [14] T. Saha, S. Kumar, S. K. Bhaumik, Slip-enhanced flow through thin packed column with superhydrophobic wall, *Sens. Actuat. B* 240 (2017) 468-476

- [15] A. Das, S. K. Bhaumik, Fabrication of Cylindrical Superhydrophobic Microchannels by Replicating Lotus Leaf Structures on Internal Walls, *J. Micromech. Microeng.* 28 (2018) 4-31
- [16] P. Joseph, C. Cottin-Bizonne, J. Benoit, C. Ybert, Journet, C.; Tabeling, P.; Bocquet, L., Slippage of water past superhydrophobic carbon nanotube forests in microchannels, *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006) 156104-156108
- [17] P. Papadopoulos, X. Deng, D. Vollmer, H.-J. Butt, Electrokinetics on superhydrophobic surfaces, *J. Phys. Condens. Matter* 24 (2012) 464110-464120
- [18] V. Kasicka, Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides, *Electrophoresis* 39 (2018) 209-234
- [19] S. Stepanova and V. Kasicka, Recent applications of capillary electromigration methods to separation and analysis of proteins, *Anal.Chim.Acta* 933 (2016) 23-42
- [20] M. Dawod, N. E. Arvin, and R. T. Kennedy, Recent advances in protein analysis by capillary and microchip electrophoresis, *Analyst* 142 (2017) 1847-1866
- [21] V. Mantovani, F. Galeotti, F. Maccari, and N. Volpi. Recent advances in capillary electrophoresis separation of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides, *Electrophoresis* 39 (2018) 179-189
- [22] E. Kenndler, Theory of Capillary Zone Electrophoresis, in: M. G. Khaledi (Ed.), *High Performance Capillary Electrophoresis*, Wiley-Interscience, New York, (2007) 53-73
- [23] K. Mesbah, T. D. Mai, T. G. Jensen, L. Sola, M. Chiari, J. P. Kutter, M. Taverna, A neutral polyacrylate copolymer coating for surface modification of thiol-ene microchannels for improved performance of protein separation by microchip electrophoresis., *Microchim. Acta* 183 (2016) 2111-2121
- [24] J. Towns, J. Bao, F. Regnier, Synthesis and evaluation of epoxy polymer coatings for the analysis of proteins by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 599 (1992) 227-237
- [25] S. Bekri, L. Leclercq, H. Cottet, Polyelectrolyte multilayer coatings for the separation of proteins by capillary electrophoresis: Influence of polyelectrolyte nature and multilayer crosslinking, *J. Chromatogr. A* 1399 (2015) 80-87
- [26] L. Hajba and A. Guttman, Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins, *Trends Anal.Chem.* 90 (2017) 38-44
- [27] N. Njoya, R. Birdsall, M. Wirth, Silica Colloidal Crystals as Emerging Materials for High-Throughput Protein Electrophoresis, *AAPS* 15 (2013) 962-969
- [28] D. Duffy, J. McDonald, O. Schueller, G. Whitesides, Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Anal. Chem.* 70 (1998) 4974-4984
- [29] L. Bocquet, J.-L. Barrat, Flow boundary conditions from nano- to micro-scales, *Soft Matter* 3 (2007) 685-693
- [30] A. Wang, J. Feng, J. Fan, Covalent modified hydrophilic polymer brushes onto poly(dimethylsiloxane) microchannel surface for electrophoresis separation of amino acids, *J. Chromatogr. A* 1192 (2008) 173-179
- [31] C. I. Bouzigues, P. Tabeling, L. Bocquet, Nanofluidics in the debye layer at hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Phys. Rev. Lett.* 101 (2008) 12-15

- [32] B. Wei, B. J. Rogers, M. J. Wirth, Slip flow in colloidal crystals for ultraefficient chromatography, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 10780-10782
- [33] C. Lv, P. Hao, Z. Yao, F. Niu, Departure of condensation droplets on superhydrophobic surfaces, *Langmuir* 31 (2015) 2414-2420
- [34] I. Vakarelski, N. Patankar, J. Marston, D. Chan, Thoroddsen, S., Stabilization of Leidenfrost vapour layer by textured superhydrophobic surfaces., *Nature* 489 (2012) 274-284
- [35] Y. Li, C. Lv, D. Quéré, Q. Zheng, Monostable Superantihydrophobicity, OAI: arXiv.org:1602.02880 (2016) 1-17
- [36] S. Yeast, SOFT99 corporation, Material Safety Data Sheet (2010) 1-5
- [37] J. Benjamins, B. Jönsson, K. Thuresson, T. Nylander, New experimental setup to use ellipsometry to study liquid-liquid and liquid-solid interfaces, *Langmuir* 18 (2002) 6437-6444
- [38] D. Aspnes, Optical properties of thin films, *Thin Solid Films* 89 (1982) 249-262
- [39] C. Cottin-Bizonne, C. Barentin, L Bocquet, Scaling laws for slippage on superhydrophobic fractal surfaces, *Phys. Fluids* 24 (2012) 1-13
- [40] D. Quéré, Fluid Coating on a Fiber, *Annu. Rev. Fluid Mech.* 31 (1999) 347-384
- [41] E. Gillespie, D. Connolly, B. Paull, Using scanning contactless conductivity to optimise photografting procedures and capacity in the production of polymer ion-exchange monoliths., *Analyst* 134 (2009) 1314 -1321
- [42] E. Lauga, Apparent slip due to the motion of suspended particles in flow of electrolyte solutions, *Langmuir* 20 (2004) 8924-8930
- [43] A. Steinberger, C. Cottin-Bizonne, P. Kleimann, E. Charlaix, High friction on a bubble mattress, *Nature Materials* 6 (2007) 665-668

Supporting Information of chapter 2: Superhydrophobic capillary coatings: elaboration, characterization and application to electrophoretic separations

Charly Renard¹, Laurent Leclercq¹, Antonio Stocco², Hervé Cottet¹

¹ IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, France

² L2C, Université de Montpellier, CNRS, France (current address: ICS, Université de Strasbourg, CNRS, France)

*Corresponding Authors

HC: Tel.: +33 4 67 14 34 27; Fax: +33 4 67 63 10 46.

E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

Content:

This Supporting information includes:

SI-1. Observation of the air layer on a glaco-coated glass blade immersed in water	128
SI-2. Conductivity profiles along the capillary for a 50 µm Glaco™ coated capillaries and for bare silica capillaries of different internal diameters.....	128
SI-3. Poiseuille law on Glaco™ coated capillaries of 50 µm and 100 µm internal diameter	129
SI-4. Evolution of the water/air interface inside a 100 µm I.D. Glaco™ coated capillary	130

SI-1. Observation of the air layer on a glaco-coated glass blade immersed in water

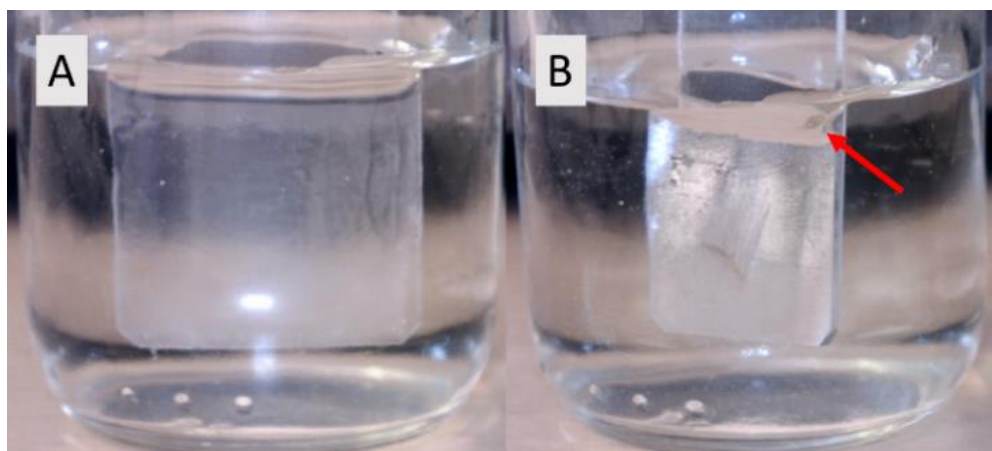


Figure SI1. Image of an immersed superhydrophobic Glaco™ coated glass blade in water (A). The air layer gives a slightly white aspect. Image of the same immersed superhydrophobic glaco coated glass blade in water, slightly tilted at a different angle to show the mirror effect (B). The red arrow points out the deformation of the water surface because of the SHS.

SI-2. Conductivity profiles along the capillary for a 50 μm Glaco™ coated capillaries and for bare silica capillaries of different internal diameters

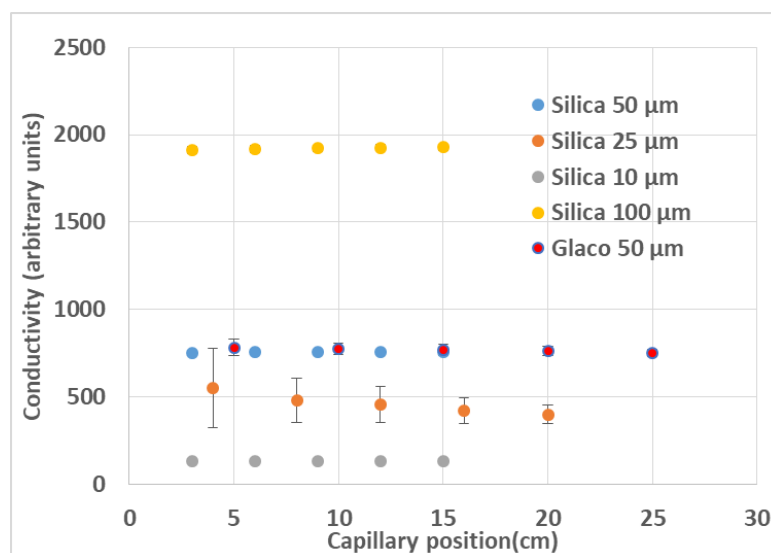


Figure SI2: Contactless conductivity (C^4D) at different positions along the capillary for a 50 μm I.D. Glaco™ coated capillary (red) and for bare fused silica capillaries of different I.D. (100 μm I.D. = yellow; 50 μm I.D. = blue; 25 μm I.D., orange; 10 μm I.D. = grey). All measurements under a 1 mL.min⁻¹ flow rate of 20 mM HEPES + 10 mM NaOH electrolyte, pH 7.46. TraceDec C⁴D detector settings: frequency 2×HIGH, voltage -12 Db, gain 50% and offset 0.

SI-3. Poiseuille law on Glaco™ coated capillaries of 50 μm and 100 μm internal diameter

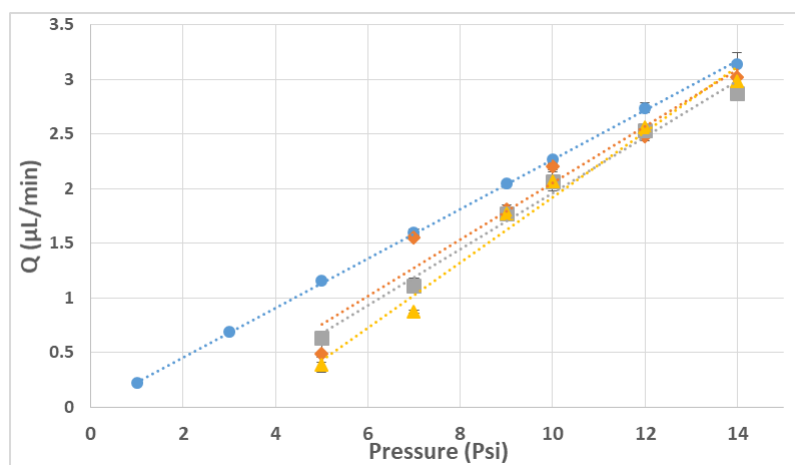


Figure SI3. Poiseuille profiles on a 50 μm I.D. Glaco™ coated capillaries. Bare silica capillary for comparison (●). Each experimental point is the mean of a triplicate (with error bars \pm one SD). Each color (■, ▲, ◆) represents a series of measurements separated by air flush of the capillary (to show the intermediate precision). Experimental conditions: capillary dimensions 50 μm \times 40 cm length (30 cm to the detector). Background electrolyte: 20 mM HEPES + 10 mM NaOH at pH 7.65. EOF marker: 0.5 % v/v DMF.

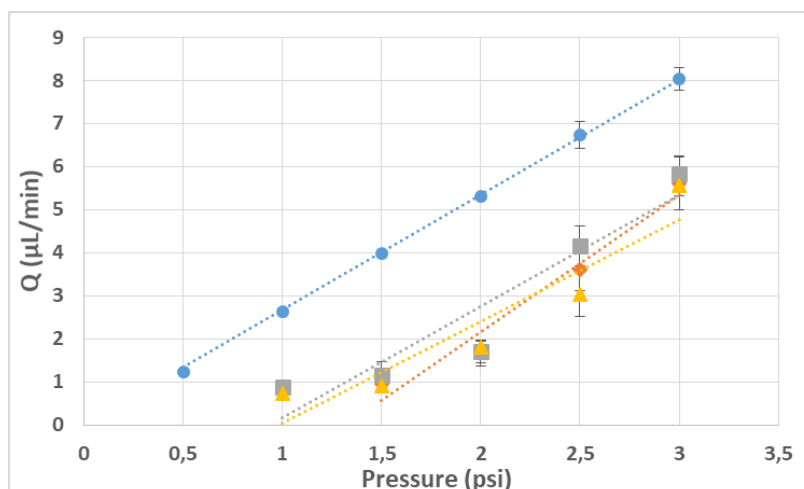


Figure SI4. Poiseuille profiles on a 100 μm I.D. Glaco™ coated capillaries. Bare silica capillary for comparison (●). Each experimental point is the mean of a triplicate (with error bars \pm one SD). Each color (■, ▲, ◆) represents a series of measurements separated by air flush of the capillary (to show the intermediate precision). Experimental conditions: capillary dimensions 50 μm \times 40 cm length (30 cm to the detector). Background electrolyte: 20 mM HEPES + 10 mM NaOH at pH 7.65. EOF marker: 0.5 % v/v DMF.

SI-4. Evolution of the water/air interface inside a 100 μm I.D. GlacoTM coated capillary

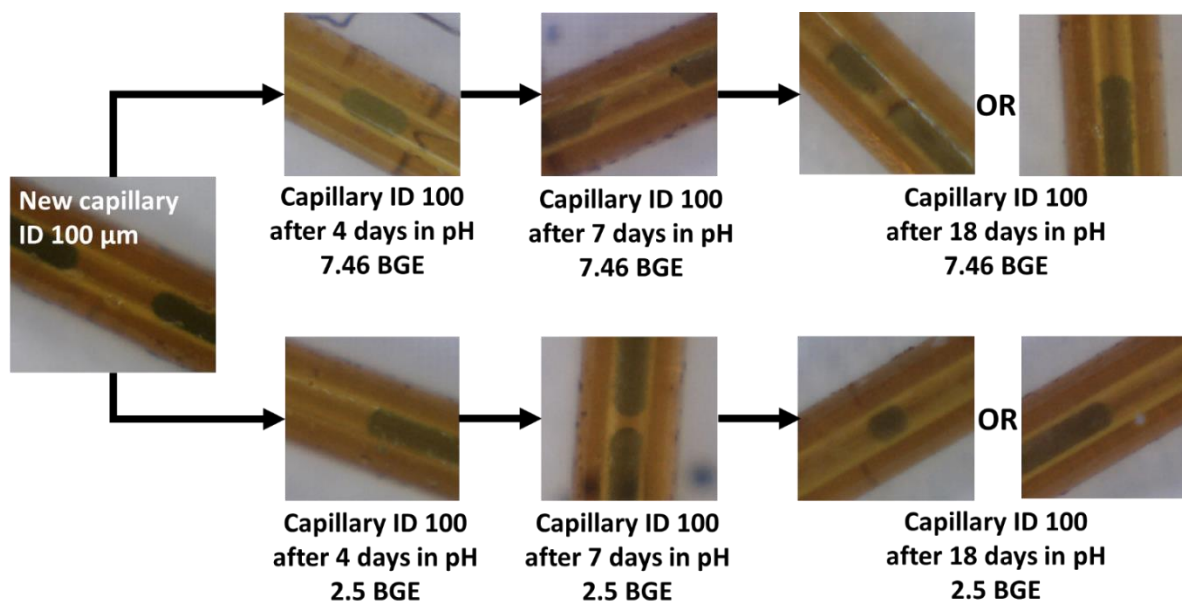


Figure SI5. Successive pictures showing the evolution of the meniscus shape inside a 100 μm I.D. GlacoTM coated capillary for two different BGE (HEPES/NaOH 20 mM/10 mM, pH 7.46 and Tris/Phosphate 6.5 mM/14.1 mM, pH 2.5) under static conditions.

At pH 7.46, the meniscus shape is altered at 7 days and later, but not everywhere in the capillary (see the two observed meniscus shape after 18 days). Thus, this BGE pH affect the surface wetting but not homogeneously on the whole capillary. At pH 2.5, the meniscus shape stays stably SH anytime anywhere in the capillary.

Complément chapitre 2: Etude d'autres types de revêtements superhydrophobes pour les séparations en électrophorèse capillaire

I. Introduction

In a previous work [1], SH capillaries of various I.D. (from 180 μm to 50 μm) were obtained using a commercial solution of hydrophobized silica nanoparticles dispersed in isopropanol (GlacoTM, Soft99, Japan). One of the key parameters to obtain superhydrophobic coated capillaries was found to be the pressure of air applied to replace the GlacoTM solution previously introduced in the capillary. This air pressure was found critical to control the layer thickness of GlacoTM solution deposited on the capillary surface. The higher the air pressure applied, the thicker the GlacoTM layer due to viscosity effect. The optimized process to get a SH GlacoTM capillary of I.D. 50 μm , 40 cm of total length, is composed of four repetitions of the following three steps, alternating the direction of the flushes at each step (from inlet to outlet the first time, from outlet to inlet the second, etc): (i) one flush of GlacoTM at 20 psi for 5 min ; (ii) one flush of air at 100 psi for 5 min ; (iii) one drying step at 250°C for 15 min in a GC oven. However, two main issues were highlighted on those capillaries. First, when freshly made, SH coated capillaries tend to trap/retain air bubbles inside the capillary, generating pressure drops and current intensity instabilities. Second, after a few runs, the coatings are progressively wetted and/or degraded, leading to a loss of SH properties. Adsorption of the analytes on the capillary wall occurred, leading to lower separation efficiencies. To try to overcome these issues, and to have the possibility to better control the formulation of the suspension used in terms of nanoparticles and solvents, well-defined hydrophobized silica nanoparticles (Aerosil R805) were used [2-3], alone or mixed with polylactic acid (PLA) known as a filminogen polymer [4-6]. These coatings have the advantage to be easily prepared in the laboratory at various possible concentrations and compositions.

II. Material and methods

II.1. Chemicals

Polylactic acid (M_w 50,000 g.mol⁻¹) was kindly supplied by MedinCell (Montpellier, France). This polymer is not soluble in isopropanol. Trimethoxyoctylsilane nanoparticles (Aerosil R805) were kindly supplied by Evonik (Hanau, Germany). Acetone (Honeywell, Seelze, Germany) or chloroform (Carlo Erba, Val de Reuil, France) were used as solvents to obtain nanoparticle suspensions. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid (HEPES) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Ultrapure grade water (18 M Ω .cm) was produced on a Milli-Q equipment (Merck Millipore, USA). The same water was dyed with Brilliant Blue FCF (food coloring, E133 Vahiné, Avignon, France) to better visualize the meniscus.

II.2. Coatings with R805 or R805 and PLA mixtures

The nanoparticle suspensions were ultrasonicated (VWR ultrasonic cleaner, Fontenay-sous-bois, France) for 30 min before starting the coating procedure. Glass blades (76 × 26 mm, Thermo Scientific, Germany) were coated with R805 suspensions in chloroform (at 20 g.L⁻¹) or with a mixture of PLA at 1 g.L⁻¹ containing 2 g.L⁻¹ of R805 in acetone, by pouring the solution/suspension on a glass blade using 5 mL plastic pipette. The coated glass blades were left in the air at room temperature for 10 min to evaporate the solvent. The same process was repeated one to eight times, depending on the number of layers.

Similarly, bare fused silica capillaries (PolyMicro Technologies, Photonlines, Saint-Germain-en-Layes, France) of 360 μ m external diameter, with different internal diameters (180, 100 and 50 μ m), and 40 cm total length (30 cm to the detector window) were coated with R805 suspensions (20 g.L⁻¹ in chloroform) or with PLA/R805 mixture (1 g.L⁻¹ and 2 g.L⁻¹ in acetone, respectively) using the experimental procedures detailed in Table 1. The excess of coating suspensions was removed by flushing with air at well-defined pressure/duration depending on the capillary diameter between each deposition (see Table 1). The same process was repeated by alternating the flushing direction in the capillary (alternatively from the starting or from the ending capillary end) to obtain maximum covering of the capillary walls. Capillaries were finally let overnight under ambient air at room temperature before use. Because they cannot be

used in the CE machine, bare fused silica capillaries (PolyMicro Technologies, Photonlines, Saint-Germain-en-Laye, France) of 670 μm external diameter with 535 μm internal diameter and 40 cm total length, were coated with six layers of PLA/R805 (solution prepared from 1 g.L⁻¹ PLA and 2 g.L⁻¹ R805 in acetone) using a 2 mL syringe. In that case, capillary activation procedure, coating procedure and drying procedure were carried out manually without controlling the pressure and the time.

Table 1: Capillary coating parameters using R805 nanoparticles or R805 and PLA mixtures.

Solvent	PLA (1 g.L ⁻¹) + R805 (2 g.L ⁻¹)			R805 (20 g.L ⁻¹)	
	acetone			chloroform	
Capillary activation procedure	KOH 1 M, 20 psi, 5 min H ₂ O, 20 psi, 2 min H ₂ SO ₄ 3 M, 20 psi, 5 min H ₂ O, 20 psi, 2 min Acetone, 20 psi, 3 min Air, 3 psi, 3 min				
Number of layers	6			4	1, 4 or 8
Internal diameter (μm)	50	100	180	100	180
Coating procedure	10 psi 3 min	5 psi 3 min	0.8 psi 2 min	3 psi 2 min or 5 psi 3 min	3 psi 2 min
Drying procedure	10 psi 2 min	5 psi 2 min	0.5 psi 1 min	80 psi 0.8 min	60 psi 0.8 min

II.3. Hydrodynamic behavior

The hydrodynamic behaviour of the R805 or PLA/R805 hydrophobically modified capillary was investigated using the CE equipment and was compared to fused silica capillaries under the same experimental conditions (all capillaries are 40 cm total length, 30 cm to detector, 180 μm I.D.). The capillary was first filled with Tris/phosphate BGE pH 2.5 at 1 psi for 2 min. Various mobilization pressures from 0.2 psi to 2 psi were then applied using 0.5 % (v/v) DMF in BGE as UV marker in the inlet vial. The capillary was rinsed by flushing BGE at 1 psi for 2 min between each run. Detection of the marker was monitored by UV absorbance at 190 nm. Flow-to-pressure relationship was used to calculate the apparent capillary diameter, and to estimate the slip length.

The flow rate Q (in $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) at a given applied pressure ΔP (in Pa) was calculated from the detection time t_{DMF} (in s) of the DMF marker according to equation (1) in Chapter 2. Poiseuille law (Q vs ΔP) was systematically plotted. The slope a of the Q vs ΔP relationship depends on

the apparent radius R_e of the capillary, according to equation (2) in Chapter 2. The apparent radius R_e from the slope a was then determined using equation (3) in Chapter 2. For more informations about the calculations, see section II.3.8. of Chapter 2.

Slip length b can be easily calculated by using the Poiseuille Law corrected with the slip factor, according to:

$$b = \frac{2\eta La}{\pi R^3} - \frac{R}{4} \quad (1)$$

See the work of E. Lauga [7,8] for more information about the slip influence on the Poiseuille Law.

III. Results and discussion

Several solvents were tested to obtain stable suspensions of hydrophobized R805 nanoparticles. Chloroform gave very stable R805 suspensions, contrarily to isopropanol or acetone. However, stability in isopropanol or acetone can be improved after 1 hour ultrasonication. PLA is soluble in acetone, but not in isopropanol or chloroform. In the following, R805 suspensions in chloroform (at 20 g.L⁻¹) and PLA/R805 mixtures in acetone (at 1 g.L⁻¹ and 2 g.L⁻¹, respectively) were tested as superhydrophobic coatings on glass blades and in capillaries (see Table 1).

III.1. R805 and R805/PLA glass blades coatings

PLA/R805 and R805 coated surfaces were first prepared on glass blades, using the experimental protocol described in section 2.2. Figure 1 displays a picture of a ~20 μL droplet of 20 mM HEPES, pH 7.45 deposited on a PLA/R805 coated glass surface. It clearly demonstrates that PLA/R805 coated glass blades present superhydrophobic behavior (defined as CA > 120°). The same finding was observed for R805 coated glass blades.

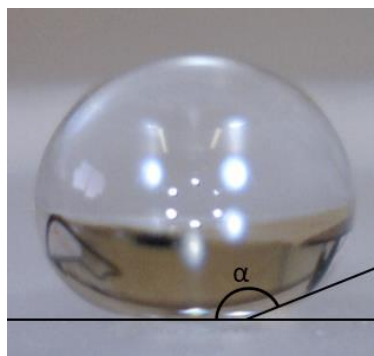


Figure 1: Picture of a $\sim 20 \mu\text{L}$ droplet (20 mM HEPES, pH 7.45) deposited on a PLA/R805 (1 g.L^{-1} and 2 g.L^{-1} in acetone, respectively, 6 layers) coated glass blade ($76 \times 26 \text{ mm}$) surface. Contact angle value was $157^\circ (\pm 2)$. See section II.2 of chapter 2 for the experimental conditions.

The PLA/R805 layer thickness (247 nm) and the air layer thickness (300 nm) between the immersed coated glass surface and water were measured by ellipsometry (Figure 2). As a matter of comparison, ellipsometry study of the Glaco™ coating presented in chapter 1 gave Glaco™ layer thickness d_{Glaco} of $270 \pm 5 \text{ nm}$ and air layer thickness d_{Air} of 124-208 nm. Thickness of PLA/R805 and Glaco™ superhydrophobic coatings are thus similar, but the air layer appears to be much thicker (approx. two times) on the PLA/R805 coating. For more information about Ellipsometry, see sections II.3.2. and III.1. of Chapter 2.

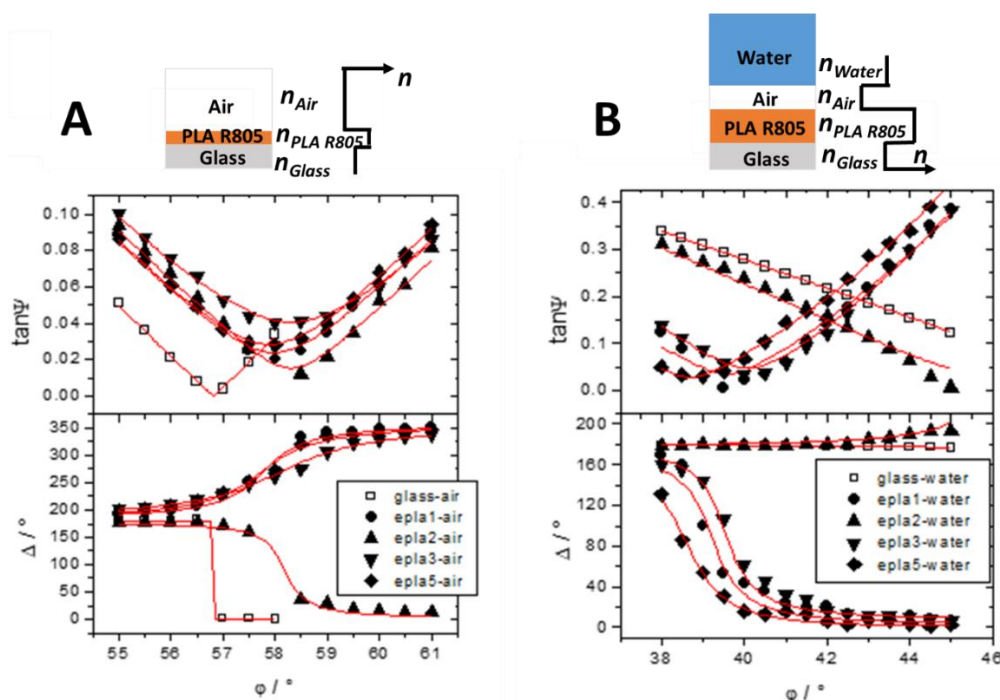


Figure 2: Ellipsometric scans of PLA/R805 coated glass blade at the solid-air interface (A) and solid-liquid interface (B). epla1, epla 2, epla3 and epla5 are four different PLA/R805 (1 g.L^{-1} and 2 g.L^{-1} in acetone, respectively, 6 layers) coated glass blades. Ultrapure water was used for (B). See section II.2 for the experimental conditions.

Figure 3 displays the surface topology of the PLA/R805 coated glass blade obtained by AFM (tapping mode). Excellent coverage of the glass blade is observed, with a thickness of about 1 μm (Figure 3A and 3B). Particle size is about 30 nm (Figure 3C) and roughness is about 300 nm (Figure 3B). The coating is thus rougher than the Glaco™ coating (~ 200 nm), and much thicker (~ 700 nm more) but both have similar topology. For more information about AFM, see sections II.3.3. and III.1. of Chapter 2.

Granulometric distribution of R805 suspension (4 g.L^{-1} in acetone) measured by DLS shows an average hydrodynamic diameter of 20 nm when the suspension is ultrasonicated for 1 hour, corresponding to the free nanoparticles size (Figure 4). Diameter is found to be 80 nm when the suspension was ultrasonicated for only 15 min, and 100 nm to 400 nm without ultrasonication. Ultrasonication treatment is thus crucial to break nanoparticles clusters, and thus to obtain more homogeneous suspensions and coatings.

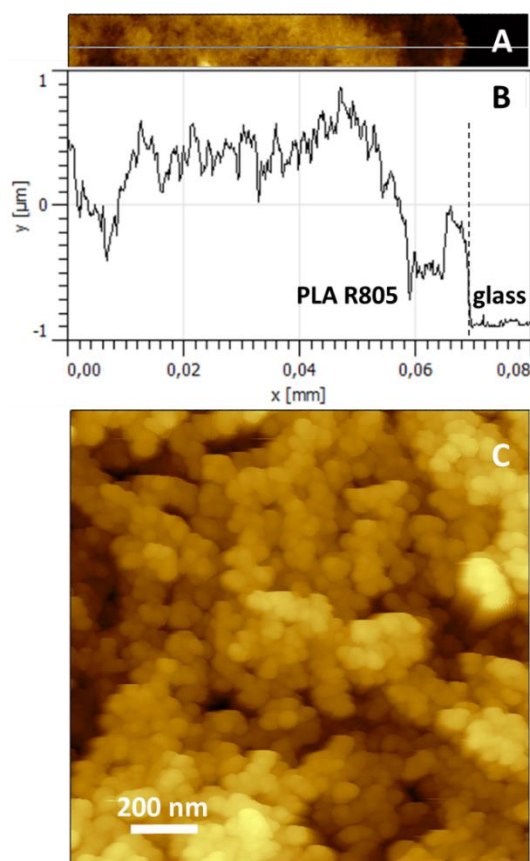


Figure 3: (A) Tapping mode AFM scan of PLA/R805 (1 g.L^{-1} and 2 g.L^{-1} in acetone, respectively, 6 layers) coated glass blade surface with a bare glass space (black) ; (B) corresponding texture profile of AFM scan showing the size and structure of the PLA/R805 nanoparticles and clusters ; and (C) zoom in of the PLA/R805 coating.

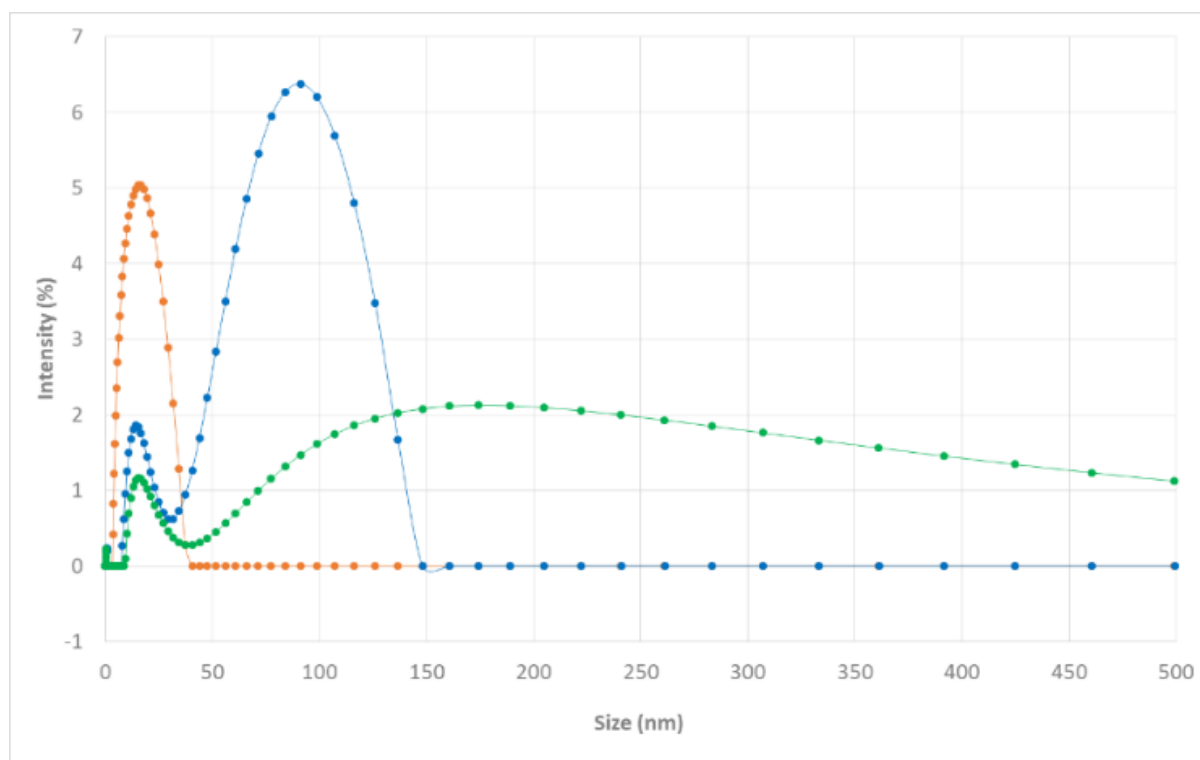


Figure 4. Size distribution of R805 suspensions (Glaco™ nanoparticles at 4 g.L⁻¹ in acetone) depending on the ultrasonic treatment duration: 1 hour (orange trace), 15 min (blue trace), and no ultrasound (green trace). The measurement was performed using a Litesizer™ 500 (Anton Paar, Graz, Austria) dynamic light scattering (DLS) equipment with a BM10 module and driven by Kalliope 1.8.4 software.

III.2. Capillary coatings using PLA/R805 mixture or R805 suspension

The experimental protocol, similar to that used to get Glaco™ coated capillaries, was firstly tested on capillaries of large inner diameter (180 μm and 500 μm), which are not suitable for electrophoretic separations but easier to coat. On the glass blades, the coverage was not complete when the coating is made with only two PLA/R805 layers, letting uncovered spots at the 0.1 μm scale (see Figure 5A), but it was much better when the coating is prepared with six PLA/R805 layers (see Figure 5B). Within the capillaries, larger domains remain uncovered (see Figure 6).

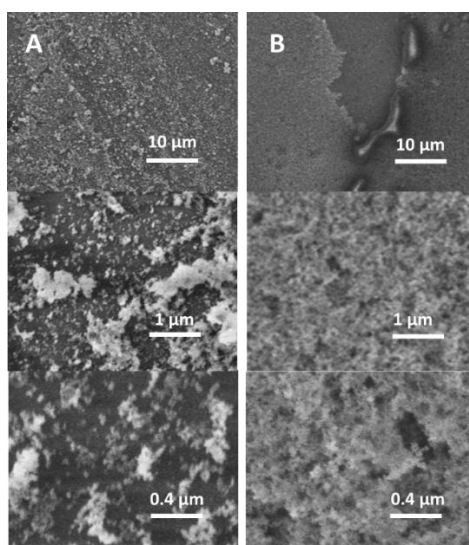


Figure 5: SEM pictures of PLA/R805 coated glass blade. Glass blade covered by 2(A) or 6 (B) successive layers of PLA/R805 in acetone at different magnifications. Concentration of PLA = 1 g.L^{-1} and concentration of R805 = 2 g.L^{-1} . See section II.2 for the experimental conditions.

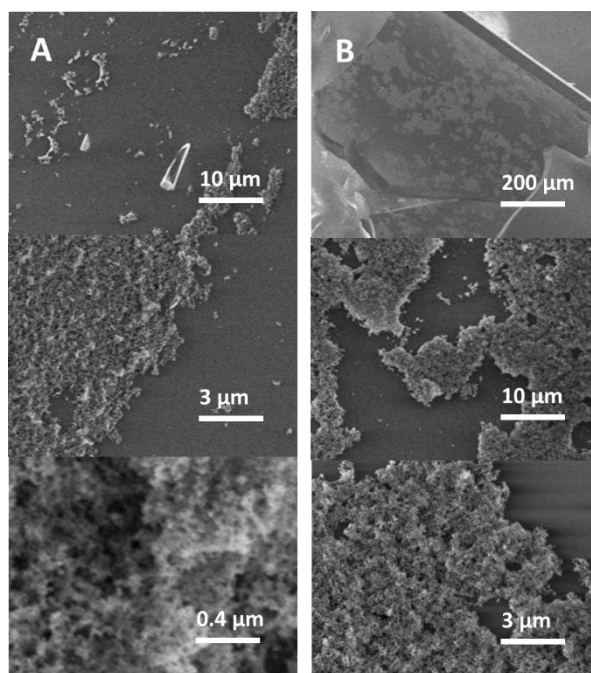


Figure 6: SEM pictures of PLA/R805 coated capillaries using 180 μm (A) and 500 μm (B) ID capillary at different magnifications. Capillary coating: 6 successive layers of PLA/R805 (1 g.L^{-1} and 2 g.L^{-1} in acetone, respectively). See Section II.2 and Table 1 for the experimental conditions.

To evaluate the superhydrophobicity of the coated capillaries, the meniscus of a water solution injected in the PLA/R805 coated capillaries (Figures 7B to 7E) was compared to that observed in a fused silica capillary (Figure 7A). The meniscus was found reversed only in the case of PLA/R805 coated capillaries with 500 μm I.D. (Figure 7E).

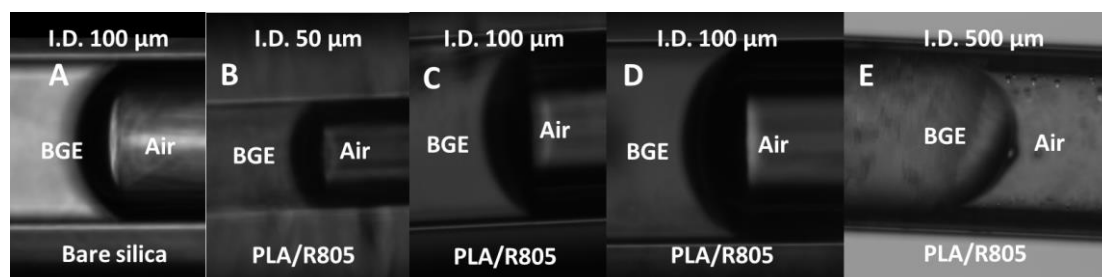


Figure 7: Visualization of the meniscus in bare silica (**A**: 100 μm ID) and in PLA/R805 coated capillaries (1 g.L⁻¹ and 2 g.L⁻¹ in acetone, respectively, 6 layers) of different internal diameters (**B**: 50 μm; **C** and **D**: 100 μm and **E**: 500 μm ID) by optical microscopy (**A**, **B**, **C** and **D**: magnification x 250, **E**: magnification x 40). Capillaries are filled with pure water and air. PLA/R805 coated capillaries are prepared according to the protocol given in Section II.2. and Table 1.

In a second attempt, capillaries coated by R805 suspension in chloroform (without PLA) were prepared. In the case of 180 μm I.D. capillary, capillary wall was found well-covered (see Figure 8A), and the corresponding water meniscus was reversed, demonstrating the superhydrophobic nature of the coating. Unfortunately, this successful finding was not obtained in thinner I.D. capillaries (see Figure 8B) demonstrating the difficulty to get a complete coverage of the capillary surface with the R805 nanoparticle in capillaries of smaller I.D.

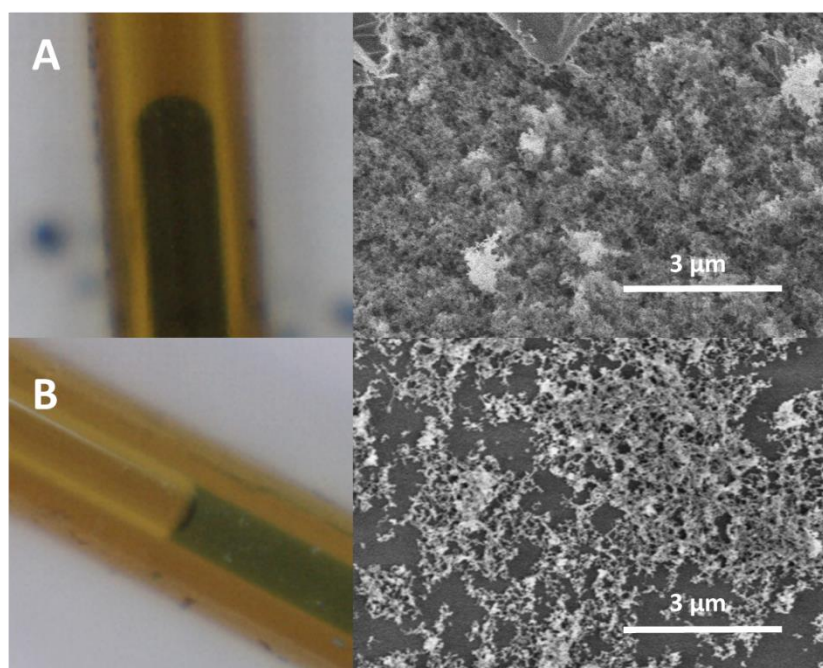


Figure 8: Visualization of the meniscus in R805 coated capillaries (4 layers) of different internal diameters (**A**: 180 μm; **B**: 100 μm ID) by optical microscopy (magnification x100). Capillaries are filled with dyed water (dark blue) and air. R805 coated capillaries are prepared according to the protocol given in Table 1. Corresponding SEM images are shown on the right.

To conclude this part, the best superhydrophobic capillary was obtained from R805 suspension in chloroform with I.D. 180 μm. Other coated capillaries with PLA/R805 mixtures were not

superhydrophobic except those with 500 μm I.D. Large I.D. capillaries ($> 150 \mu\text{m}$) are not suitable for CE applications. Nevertheless, their hydrodynamic behavior was studied in the next section.

III.3. Hydrodynamic behavior of R805 coated capillary

The hydrodynamic behavior was investigated on R805 coated capillary with 180 μm I.D. Different pressures were applied and the corresponding flow rates were measured. The apparent capillary I.D. R_e was determined using equation (3) in Chapter 2.

As shown in Figure 9, R805 180 μm I.D. coated capillaries provided slipping behaviour with a slip length of 8 μm when the capillary was dried at 35°C without gas pressure. No slipping length was observed when it was dried with a gas pressure of 60 psi. The possible explanation is that, with gas pressure during the drying, the coating film (under the effect of the gas flow) is deformed. The nanoparticles are then not well distributed onto the surface.

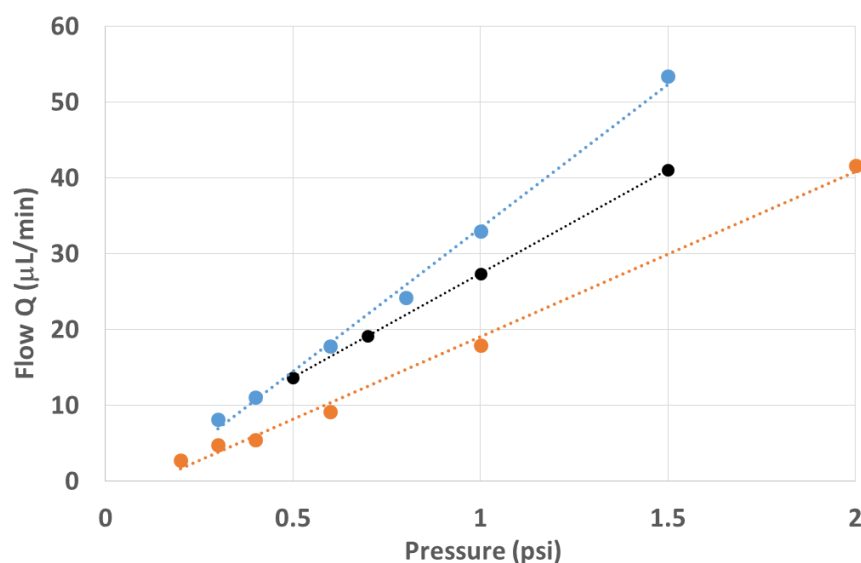


Figure 9: Flow rate according to the mobilizing pressure of a 1% DMF marked BGE on two different R805 coated capillaries (I.D. 180 μm , R805 at 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in chloroform, 4 layers). Orange: R805 coating dried with gas pressure (60 psi 0.8 min) at T_{amb} . $Q = 21.792 \times P - 2.7155$. Calculated internal diameter: 171 μm . Blue: R805 coating dried without gas pressure at 35°C for 1 hour. $Q = 37.842 \times P - 4.4179$. Calculated internal diameter: 196 μm . Black: Fused silica capillary. $Q = 27.382 \times P$. Calculated internal diameter: 181 μm .

IV. Conclusion

PLA/R805 capillary coatings provide similar characteristics to Glaco™ coatings (CA 159°, nanoparticle size 30 nm for Glaco™ vs CA 157°, nanoparticles size 30 nm for R805) but also some differences (coating thickness 270 nm, rugosity 100 nm and air layer thickness 124-208 nm for Glaco™ vs coating thickness 900 nm, rugosity 300 nm and air layer thickness 300 nm for R805). However, inhomogeneities were observed on capillary surface, with the presence of large uncoated domains on the capillary walls. Better results were found using R805 coated capillaries (without PLA polymer). In addition, only coated capillaries of wide I.D. ($\geq 180 \mu\text{m}$ I.D.) led to reversed meniscus and thus to superhydrophobic properties. Hydrodynamic behaviour revealed the presence of slipping (up to 8 μm) but no CE application can be considered at the present time due to the too large capillary I.D.

References

- [1] Renard, C.; Leclercq, L. ; Stocco, A. ; Cottet, H. Superhydrophobic capillary coatings: Elaboration, characterization and application to electrophoretic separations. *J. Chromatogr. A* (2019), 1603, 361-370.
- [2] Ou, C.F.; Hsieh, M.C. The properties of poly(lactic acid) composites reinforced by silica nanoparticles. Proceeding paper from the International Conference on Materials, Manufacturing and Mechanical Engineering (MMME), Book Series: DEStech Transactions on Materials Science and Engineering, Destech Publicat. Inc. (2016) 1-4.
- [3] AEROSIL® –Fumed Silica, Technical Overview. See Supporting Information.
- [4] Houichi Mani, H. Etude de la mise en oeuvre de l'acide poly (lactique) par le procédé d'extrusion film: Relation structure-procédé. Thèse de doctorat de l'Université de Lyon et de l'Université de Sfax (Tunisie), 2016. NNT: 2016LYSEI023.
- [5] Öz, A.T.; Süfer, Ö.; Çelebi Sezer, Y. Poly (Lactic Acid) Films in Food Packaging Systems. *Food Science and Nutrition Technology* (2017) 2(4), 000131.
- [6] Penu, C. ; Helou, M. Acide polylactique (PLA). *Techniques de l'Ingénieur*, (2017) Article N°AM3317 V1.
- [7] Lauga, E. ; Apparent slip due to the motion of suspended particles in flow of electrolyte solutions. *Langmuir* (2004) 8924-8930
- [8] Lauga, E. ; Stone, H. ; Effective slip in pressure-driven Stokes flow. *J. Fluid Mech.* (2003) 55-77

Chapitre 3:
Generation and characterization of air microbubbles
in highly hydrophobic capillaries

Introduction au Chapitre 3 :

Durant la réalisation de l'étude menée au chapitre 2, un phénomène inattendu a été observé. Sous certaines conditions bien précises, des bulles d'air sont apparues lors des séparations électrocinétiques. Bien que la présence de bulles soit en général non désirée en CE, car elles parasitent les séparations et les rendent potentiellement instables, il nous est apparu intéressant d'étudier les conditions expérimentales permettant de générer (ou au contraire d'éviter !) l'apparition de ces microbulles d'air. Le chapitre 3 s'intéresse, par conséquent, aux paramètres nécessaires à l'apparition des microbulles (tension électrique, paroi SH, rayonnement UV, marqueur d'écoulement électroosmotique), ainsi qu'aux caractéristiques physico-chimiques de ces microbulles (dimensions et charge de surface de la bulle).

Chapitre 3 : Generation and characterization of air microbubbles in highly hydrophobic capillaries

Charly Renard, Laurent Leclercq, Hervé Cottet*

IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, France

* CORRESPONDING AUTHOR

Tel: +33 4 6714 3427, Fax: +33 4 6763 1046. E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

ABSTRACT.

The generation of air microbubbles in microfluidic systems or in capillaries could be of great interest for transportation (single cell analysis, organite transportation) or for liquid compartmentation. In this work, the generation of microbubbles on hydrophobic Glaco™ coated capillaries has been studied in water-based electrolyte. Air bubbles were generated at the detection window and the required experimental parameters for microbubbles generation have been identified. Generated bubbles migrated against the electroosmotic flow, as would do strongly negatively charged solutes, under constant electric field. They have been characterized in terms of dimensions, electrophoretic mobility, and apparent charge.

I. Introduction

Gas bubbles are used for numerous applications: contrast agents for medical imagery by ultrasounds [1–3], therapeutic drug delivery by encapsulating the drug into the bubble [4–6], wastewater treatment [7], surface cleaning [7–9], froth flotation [10–12], drag reduction [9], sterilization of bacteria [13], enhanced germination rate of plant seeds [14], promotion of physiological activity of living organisms [15], and improved blood oxygenation [16]. Usually, air microbubbles are produced by mechanical agitation [17,18], or by increasing the temperature of cold (4°C) gas saturated water [19–21]. The presence of the nano or micro air bubbles in the liquid bulk can be observed using a laser beam via light scattering (Tyndall effect). The control of the air bubble size can be challenging but is still very important for the applications. The production of gas bubbles onto surfaces can be obtained by changing the

solvent, for instance, by covering a surface with ethanol, and then slowly replacing the ethanol by water. The two liquids must be saturated with air or any other gas. Since ethanol has a higher gas solubility compared to water, a transient gas oversaturation occurs and the excess of gas results in the apparition of air bubbles onto the surface [22]. Another possibility to produce bubbles is to replace water with salted water, but the mechanism behind this phenomenon is not clear, since air bubbles form when water is replaced by salted solution, but also when salted solution is replaced by water [23]. Another simple way to produce bubble onto a surface is by simply immersing the surface into water. When a dry surface is put in contact with a water droplet, there is an air pressure enhancement between the surface and the water droplet, leading to the formation of a dimple in the droplet, resulting in an air bubble [24]. This phenomenon is favored by the surface roughness/irregularities, as observed on superhydrophobic surfaces used in our study.

In capillary electrophoresis or in microfluidics in general, the presence of bubbles is usually not desired because it tends to destabilize the electrical current and to limit the repeatability of the separations [25]. It is therefore important to know in which conditions air bubbles can be formed and how to avoid them experimentally [25]. On the other hand, the generation of air microbubbles in microfluidic systems or in capillaries could be of great interest for transportation (single cell analysis, organites) [26,27] or for liquid compartmentation [28]. In this case, it is important, for practical reasons, to control the generation of the air bubbles [26]. The characterization of air bubbles, in terms of size, surface (or interface) charges, velocities or electrophoretic mobilities, is also crucial since these characteristics are leading their behavior and their fate in the environment in which they are formed/placed. The electrokinetic characteristics of air bubbles have been studied both theoretically [29,30], and experimentally [19,31,32]. Generally, negative zeta potentials were measured for air bubbles in water based electrolytes [19,31,32], except when cationic surfactant are present in the electrolyte leading to a reverse of the sign of the charge [19,32]. The origin of the negative charge is still under debates, but different explanations were proposed: an excess of hydroxide anions near the vapor/water surface [33,34]; Vacha et al. [35] and later Leroy et al. [30] suggested that the surface of the water molecules become partially charged due to a lack of balance between the number of donating and accepting hydrogen bonds. Zeta potential were derived from electrophoretic mobility measurements, generally performed by laser Doppler electrophoresis [19,32].

In a previous study [36], it was shown that Glaco™ coated capillaries led to superhydrophobic capillaries (with meniscus inversion compared to fused silica capillary and slipping conditions at the capillary surface). The existence of a nanometric air layer at the interface between the coating and the aqueous phase in the Glaco™ capillaries was proved by ellipsometry [36] and was also put in evidence by the ‘mirror’ effect observed on a Glaco™ coated blade immersed in water. These superhydrophobic capillaries were obtained by the deposition of a 1 μm thickness film of Glaco™ solution (containing nanostructured hydrophobically modified silica nanoparticles) by flushing the 50 μm I.D. \times 40 cm capillary previously filled with the Glaco™ solution with air at a constant pressure of 100 psi [36]. The film of Glaco™ solution was next dried in a GC-oven. However, the resulting superhydrophobic capillaries were hardly filled with water-based electrolyte, leading to a ‘train’ of air bubbles in the capillary and to unstable current intensity in CE [36]. Stable current intensities were only obtained after a few electrophoretic runs, when the superhydrophobicity was reduced.

In this work, using 80 psi instead of 100 psi to flush the capillary previously filled with the Glaco™ solution during the coating protocol leads to slightly thinner Glaco™ liquid film deposition (0.9 μm) onto the capillary surface, and thus to slightly lower superhydrophobicity. The 80 psi-Glaco™ coated capillaries can be easily filled with water-based electrolyte and lead to stable current intensity in CE. The generation of air bubbles inside such capillary has been studied in water based electrolyte. Air bubbles were generated at the detection window and the required parameters for microbubbles generation have been identified. Generated bubbles were displaced by electrophoretic migration under constant electric field and have been characterized in terms of dimensions, electrophoretic mobility, and apparent charge.

II. Materials and methods

II.1. Chemicals

Glaco Mirror Coat Zero™ was purchased from Soft99 (Osaka, Japan). It is composed of silica nanoparticles suspension (hydrophobically modified with alkyl groups) dispersed in isopropanol. The nanoparticle concentration in the Glaco™ solution is about 4 g.L^{-1} , as quantified by weighing the dry residue after evaporation of the solvent. Ultrapure grade water

(18 M Ω .cm⁻¹) was produced on a Milli-Q equipment (Merck Millipore, USA). Sodium hydroxide (NaOH) and *N,N*-dimethylformamide (DMF, 99%) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES) was purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Brilliant Blue FCF (food coloring, E133) from Vahiné (Avignon, France) was used as an aqueous colorant. Mesityl Oxide (4-metyl-4-penten-2-one) was purchased from Alfa Aesar (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Germany).

II.2. Glaco™ coated capillaries

Fused silica capillaries (PolyMicro Technologies, Photonlines, Saint-Germain-en-Laye, France) of 360 μ m external diameter, 50, 100 or 180 μ m internal diameter (I.D.) \times 40 cm total length (30 cm to the detector window) were coated with Glaco™ by flushing the capillary with the Glaco™ suspension. Excess of Glaco™ solution was then removed by flushing the capillary with air to obtain a 0.9 μ m liquid film on the capillary wall, as given by equation (1) [37]:

$$\varepsilon = 1.34 R_c^{7/3} \left(\frac{\Delta P}{8L\gamma} \right)^{2/3} \quad (1)$$

where ε is the thickness of the deposited film, R_c is the inner radius of the capillary, ΔP is the applied air pressure, L is the total capillary length and γ is the surface tension of the Glaco™ solution (20 N.m⁻¹). Equation (1) was obtained by combining the Poiseuille with the Landau, Levich and Derjaguin (LLD) theory [37] giving:

$$\varepsilon = 1.34 R_c Ca^{2/3} \quad (2)$$

where Ca is the dimensionless capillary number defined by equation (3):

$$Ca = \frac{\eta V}{\gamma} \quad (3)$$

where V is the linear velocity of the coating solution flushed by air pressure (in m.s⁻¹). The experimental conditions for the flushing pressures and times are displayed in Table 1 according to the capillary I.D. Glaco™ coatings were then thermally stabilized by placing the capillaries in a GC-2010 Plus oven (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France) for 15 min at 250°C without any gas flow. The same process (Glaco™ deposition and thermal stabilization) was repeated 3 times. Capillaries were finally left overnight under ambient air at room temperature before use.

Table 1: Coating protocol for the preparation of Glaco™ coated capillaries (Fused silica capillaries of 40 cm × 360 μm O.D. × I.D. as indicated in the Table). The entire protocol is repeated 4 times by alternating the flushing direction in the capillary (alternatively from the starting or the ending ends of the capillary).

Capillary I.D.	50 μm	100 μm	180 μm
Glaco™ flushing	20 psi, 5 min	5 psi, 5 min	1.5 psi 5 min
Air flushing	80 psi, 5 min	20 psi, 5 min	6.2 psi 5 min

II.3. Capillary electrophoresis

Capillary electrophoresis experiments were carried out on a P/ACE™ MDQ Beckman-Coulter (Sciex, Villebon sur Yvette, France) piloted by 32 Karat software. Glaco™ coated capillaries of 50 μm internal diameter (I.D.), 40 cm total length (30 cm to the detector window), were coated as described in section 2.2 and used for air bubble generation. Unless otherwise specified, all electrolytes were prepared with boiled ultrapure water to obtain gas-free solutions. The degassing step appeared to be primordial in previous studies [36] as it allowed for stable current during the whole runs. Without degassing, the gasses dissolved into the aqueous phase interacted with the capillary air layer to form bubbles obstructing the flow and thus breaking the conductivity of the background electrolyte. Electrophoretic migrations were performed in a 20 mM HEPES + 10 mM NaOH background electrolyte at pH 7.4 (10 mM ionic strength). Capillaries were flushed at 20 psi for 3 min with the background electrolyte before each run. DMF (at the concentration of 1 % in the electrolyte) was used as an electroosmotic flow marker. Electrophoretic migrations were realized using +20 kV voltage (unless otherwise specified) and +3 psi pressure at both capillary ends to stabilize the electrical current.

III. Results and discussion

Inadvertently and surprisingly, we have noticed that microbubbles could be easily generated in a controlled manner in 80 psi-Glaco™ coated capillaries. We have also noticed that these bubbles can move into the capillary and migrate under electric field. The aim of this study is to identify the conditions of appearance of these bubbles and to characterize these bubbles in terms of charge, electrophoretic mobility and size.

III.1. Highlighting the generation of air bubbles during electrophoresis on a Glaco™ coated capillary

Figure 1 shows the meniscus of a blue colored-water plug in a Glaco™ coated capillaries of different diameters (50, 100 and 180 μm , respectively), according to the coating protocol detailed in section II.2 (with a deposition thickness of Glaco™ solution of about 0.9 μm). The meniscus shape is reversed compared to fused silica capillary with a contact angle of about $\alpha=120^\circ$, which proves that the coating is highly hydrophobic but significantly lower than for a 1 μm film deposition ($\alpha=159^\circ$) [36].

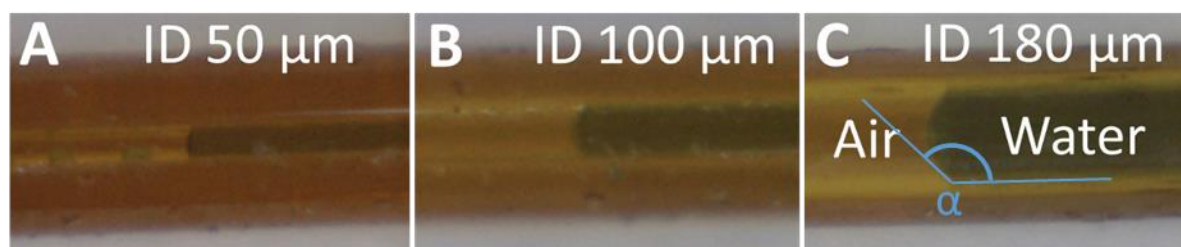


Figure 1. Visualization of the meniscus in Glaco™ coated capillaries of different internal diameters (A: 50 μm ID ; B: 100 μm ; C: 180 μm) by optical microscopy (magnification $\times 50$). Capillaries are filled with blue colored water (dye with E133 at 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and with air to see the interface. Glaco™ coated capillaries were prepared according to the protocol given in section II.2. α is the contact angle ($\sim 120^\circ$).

Figure 2 displays the current intensity (in green) and the UV trace (in blue) obtained in the Glaco™ coated capillary under +20 kV voltage in a 20 mM HEPES/Na buffer pH 7.4, when the inlet vial contains 1% DMF solution (used as EOF marker in frontal continuous electrophoresis mode) in the BGE. The increase of the UV trace corresponds to the detection of the DMF reaching the detection window. Surprisingly, a few seconds later, UV spikes appeared regularly with simultaneous fall of the current intensity. Spikes combined with current intensity drop can be explained by the formation of air bubbles generated at the detection point. The air bubble passing in front of the detection point modified the absorbance signal, generating a spike, and the presence of low-conductivity zone in the BGE decreased the current intensity. It is worth noting that these experiments were reproducible, as demonstrated by Figure S11 showing similar results in the same electrophoretic conditions but on a different Glaco™ coated capillary according the same coating protocol.

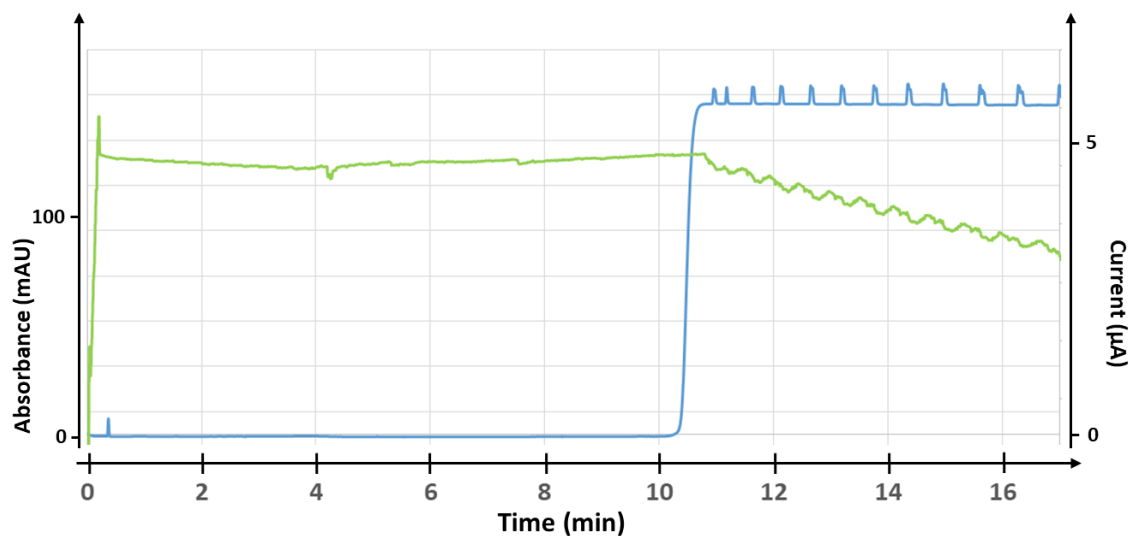


Figure 2. Electropherogram (blue trace) of 1% DMF marker in frontal mode obtained on Glaco™ coated capillary showing the generation of air bubbles. The corresponding current intensity is displayed in green. Experimental conditions: Glaco™ coated capillary 50 μm I.D. \times 40 cm length (30 cm to the detector) prepared according to section 2.2. Background electrolyte: 20 mM HEPES + 10 mM NaOH at pH 7.4. Applied voltage: +20 kV. Pressure (to stabilize the current intensity): + 3 psi at both capillary ends. Inlet vial: DMF at 1% in BGE. Outlet vial: BGE. Capillary flush with BGE before the run: 20 psi, 3 min. Detection: 214 nm. Temperature: 25°C.

There are several experimental parameters that are required to generate the air bubbles. They are listed hereafter: (i) the 80 psi Glaco™ coated capillary is required; (ii) the UV lamp should be turned on since the electrical current intensity was not affected when the same experiment as in Figure 2 was conducted in absence of UV radiation; (iii) the separation voltage is also required and no bubble was observed under hydrodynamic flow without separation voltage; (iv) a DMF concentration of at least 0.5% is required (lower DMF concentrations or the use of other marker such as mesityl oxide did not generate bubbles, see Figure SI2).

III.2. Electrophoretic mobility and zeta potential of air bubbles

Air bubble electrophoretic apparent velocity and dimensions can be both determined (or estimated) from the experiment described in Figure 3. Frontal continuous electrophoresis of 1% DMF in BGE was performed as in Figure 2 (see Figure 3, step 1). Once the DMF reach the detection window, a bubble is created (see Figure 3, step 2). Then, the voltage was rapidly stopped and a mobilization pressure was applied in order to detect a second time the bubble in front of the detector (see Figure 3, step 3). The direction of the hydrodynamic flow to apply to detect the bubble a second time was identified on a trial and error principle, since it depends on

the direction of the apparent velocity of the bubble during the electrophoretic process. It was found that the apparent electrophoretic velocity of the air bubble was against the electroosmotic flow (toward the inlet side of the capillary, as for a highly charged anion). Just before the mobilization pressure, the inlet vial was replaced by a 1.5% DMF in BGE (step 3) in order to be able to determine the mobilization pressure velocity.

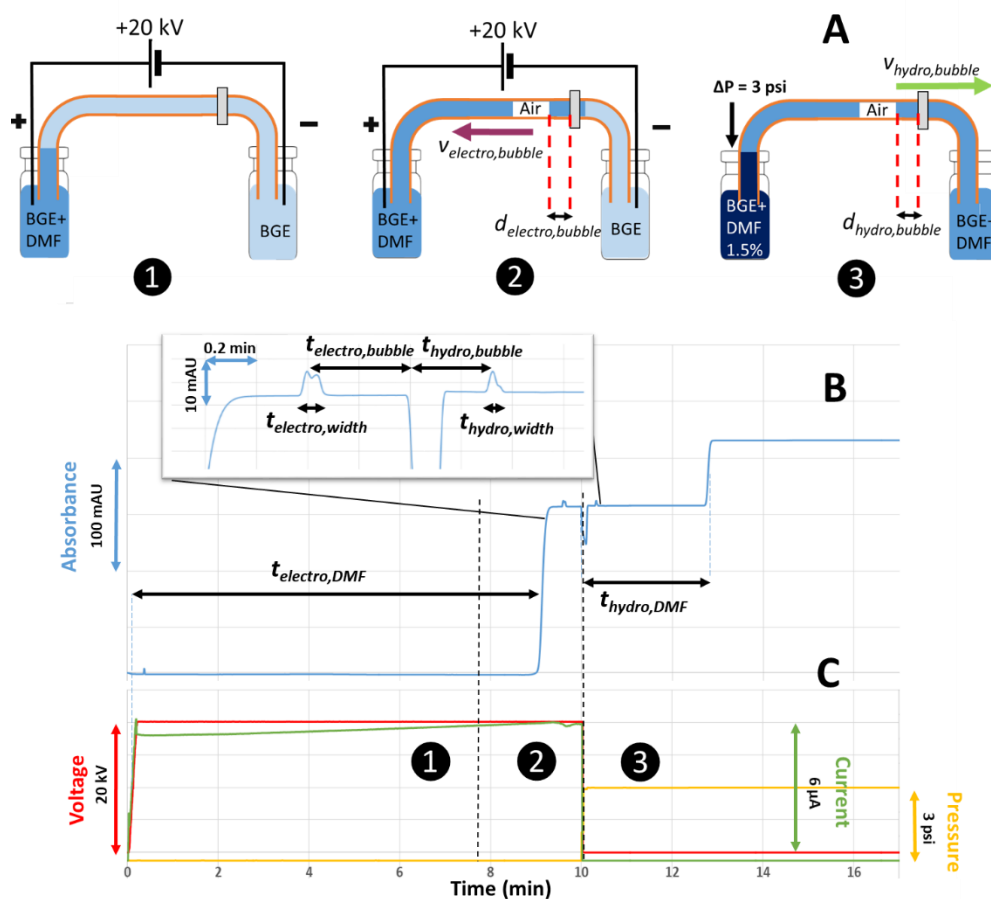


Figure 3. Details of the experimental sequence implemented to determine the dimensions and electrophoretic mobility of an air bubble generated during the electrophoresis of a DMF front in a 80 psi-Glaco™ coated capillary. Schematic representation of the DMF front and the air bubble positions in the capillary at different times (A), of the UV trace at 200 nm (B) and the corresponding voltage (in red) / pressure (in yellow) / current intensity (in green) sequence (C). Experimental conditions: Glaco™ coated capillary, 50 $\mu\text{m} \times 40$ cm length (30 cm to the detector). Background electrolyte: 20 mM HEPES + 10 mM NaOH at pH 7.4. At $t=0$, BGE was in the capillary and in the outlet vial, while the inlet vial contained BGE + DMF. Separation voltage: +20 kV from 0 to 10 min. The 1% DMF front reached the detection window at 9.1 min under electrophoretic process and generated one air bubble detected at 9.7 min. The air bubble then migrated towards the inlet end of the capillary until voltage was suppressed. From $t= 10$ min, the voltage was stopped, the inlet vial was replaced by a vial containing 1.5% DMF in BGE and a + 3 psi mobilization pressure was applied. At 10.4 min, the air bubble reached the detection window, followed by the 1.5 % DMF front which reaches the detector at 12.8 min. Flush before experiment: 20 psi, 3 min. Steps 1 to 3 are commented in the text.

In order to determine the apparent and effective electrophoretic mobility of the air bubble in the capillary during the electrophoretic process, it was assumed that the air bubble moved at the same velocity ($v_{hydro,bubble}$) that the velocity of the DMF front ($v_{hydro,DMF}$) during the mobilization pressure step (step 3 in Figure 3), leading to equation (4):

$$v_{hydro,DMF} = \frac{l}{t_{hydro,DMF}} = v_{hydro,bubble} = \frac{d_{hydro,bubble}}{t_{hydro,bubble}} \quad (4)$$

where l is the effective capillary length, $t_{hydro,DMF}$ is the migration time of the 1.5% DMF front to reach the detection window under 3 psi pressure (2.78 min) during the mobilization pressure step, $d_{hydro,bubble}$ is the distance between the air bubble and the detection point just before applying the mobilizing pressure, and $t_{hydro,bubble}$ is the time taken by the air bubble to reach the detection window once the pressure was applied (0.36 min). From equation (2), it is possible to determine $v_{hydro,bubble} = 1.8 \times 10^{-3} \text{ m.s}^{-1}$ and $d_{hydro,bubble} = 38.8 \text{ mm}$. Assuming that $d_{hydro,bubble}$ is equal to the distance $d_{electro,bubble}$ travelled by the bubble from the detection point during the electrophoretic process after the bubble formation, one can determine the apparent electrophoretic velocity $v_{electro,bubble}$ of the air bubble during the electrophoretic migration by:

$$v_{electro,bubble} = \frac{d_{hydro,bubble}}{t_{electro,bubble}} \quad (5)$$

where $t_{electro,bubble}$ is the time between the air bubble first apparition at the detection window and the electrical field stop (0.34 min). From eq. (5), we get $v_{electro,bubble} = 1.9 \times 10^{-3} \text{ m.s}^{-1}$ corresponding to an apparent electrophoretic mobility of $\mu_{app} = -38.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. Knowing that the electroosmotic mobility $\mu_{eo} = +10.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ from the DMF migration time, the effective electrophoretic mobility of the air bubble was determined as: $\mu_{ep} = \mu_{app} - \mu_{eo} = -48.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. The air bubbles bear therefore strongly negative charges on their surfaces, which correspond to a zeta potential of about $\sim -62.6 \text{ mV}$, assuming that the air bubble behave according to the Smoluchowski law:

$$\zeta = \frac{\mu_{ep} \eta}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (6)$$

where ϵ_0 is the vacuum permittivity ($8.85 \times 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$), ϵ_r is the water relative permittivity ($\epsilon_r = 78$), and η is the electrolyte viscosity (0.89 cP). The validity of the Smoluchowski law is

verified since $\xi < 100$ mV and $\kappa R_h > 100$, where κ is the reciprocal of the Debye length ($\kappa^{-1} \sim 3$ nm) and R_h is the characteristic size of the solute (air bubble in Figure 3, $\sim 40 \mu\text{m} \times 10$ mm, see section 3.3).

The origin of the negative charges at the liquid/gas interface can be attributed to the adsorption phenomena of OH^- anions on the bubble surface [33,34], which was also observed on solid nanoparticles [18]. This theory is supported by the fact that the bubbles were much more stable (i.e. the electrostatic force was higher) in alkaline water solution than in a neutral or acidic one. Some authors also considered the increased autolysis of water molecules to explain higher hydroxyde content at the surface [34]. But this general interpretation is still under debate, and other authors developed, more recently, a surface complexation model based on the presence of negative surface sites due to the fact that the balance of accepting and donating hydrogen bonds is broken at the interface [30,35]. Regarding the origin of the air/gas inside the bubble that we observed, since the BGE was degassed, a possibility could be that some of the air trapped at the highly hydrophobic capillary surface is destabilized and expelled in the bubbles.

III.3. Air bubble dimensions

The dimension of the air bubble can change under the influence of an electric field [38]. Knowing the apparent air bubble velocities both under electrical field $v_{electro,bubble}$ (equation 5) and under pressure $v_{hydro,bubble}$ (equation 4), it was thus possible to calculate the air bubble length (or width) by measuring the time the air bubble took to cross the detection window (i.e. the temporal air bubble width measured as $t_{electro,width} = 0.092$ min under electrical field and $t_{hydro,width} = 0.067$ min under pressure mobilization), using equations (7) and (8):

$$l_{electro,bubble} = v_{electro,bubble} t_{electro,width} \quad (7)$$

$$l_{hydro,bubble} = v_{hydro,bubble} t_{hydro,width} \quad (8)$$

Those equations lead to $l_{electro,bubble} = 10.5$ mm and $l_{hydro,bubble} = 7.24$ mm (using datas of Figure 3), illustrating the difference in size of a given air bubble with and without applied voltage, respectively. This is also in good agreement with the fact that the air bubble tends to spread under the influence of an electric field [38].

The presence of air bubbles in the capillary lowers the global conductivity of the capillary, since the air bubbles are non-conductive. This explains why the current intensity is progressively decreasing with the generation of the air bubbles in the capillary. Since the current intensity is not completely shut down but just decreased, it can be considered that the air bubbles are not clogging all the capillary section (see Figure 4). The overall resistivity R of the capillary is the sum of the individual resistivity pertaining to each bubble and the resistivity of the portions of capillary with no air bubble. As a first approximation, we consider in this model that all the air bubbles have the same given length $l_{electro,bubble}$. Therefore, in an electrical point of view, the overall resistivity of the capillary of length L can be obtained by considering the resistivity R_{bubble} due to the n bubbles which occupy a length L_1 , and the resistivity of the BGE on a capillary length $(L-L_1)$, as illustrated in Figure 4.

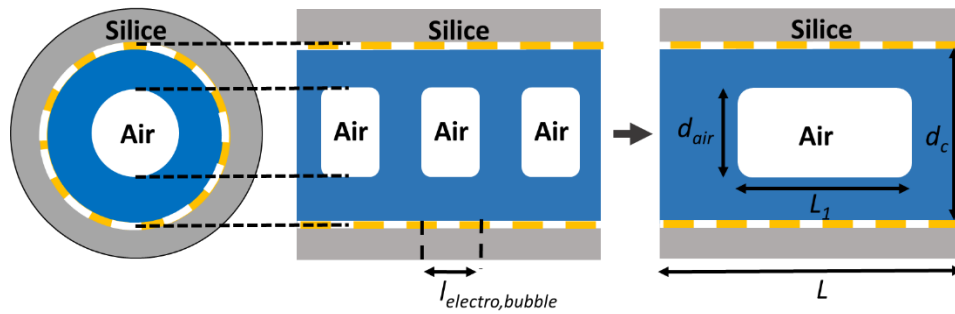


Figure 4. Schematic representation of the air bubble repartition in a Glaco™ coated capillary for the modelling of the overall capillary resistivity R . The air bubbles are considered as a succession of identical zones having a length $l_{electro,bubble}$. In an electrical point of view, the capillary resistivity can be viewed as the sum of two contributions: an air bubble portion of capillary length L_1 with a diameter d_{air} and a portion of capillary $L-L_1$ only filled with BGE of diameter d_c . S_l is the section of capillary occupied by the BGE in presence of an air bubble and S is the section of capillary occupied by the BGE in absence of air bubble.

R_{bubble} can be expressed as a function of L_1 , the conductive section S_l in the air bubble zone, and the BGE conductivity κ according to:

$$R_{bubble} = \frac{L_1}{\kappa S_l} \quad (9)$$

Similarly, the resistivity of the portion of capillary without air bubble is given by:

$$R_{nobubble} = \frac{L-L_1}{\kappa S} \quad (10)$$

where S is the conductive section of the capillary without bubble and L the total capillary length. The conductivity of the 20 mM HEPES/Na BGE is $\kappa = 6.3 \cdot 10^{-2} \Omega^{-1}m^{-1}$ as calculated from the

current intensity obtained in similar electrophoretic conditions in a 50 μm I.D. \times 40 cm bare fused silica capillary (i.e. without any air inside the capillary). In order to determine the air bubble diameter d_{air} , the Ohm law is expressed using equations (9) and (10) by:

$$V = RI = \left(\frac{L - L_1}{\kappa S} + \frac{L_1}{\kappa S_1} \right) I \quad (11)$$

Replacing L_1 by $n_{bubble} \times l_{electro,bubble}$ in equation (11) leads to equation (12) where $1/I$ is expressed by:

$$\frac{1}{I} = \left(\frac{L - n_{bubble} l_{electro,bubble}}{S} + \frac{n_{bubble} l_{electro,bubble}}{S_1} \right) \frac{1}{\kappa V} \quad (12)$$

with $n_{bubbles}$ being the number of bubbles present in the capillary at a given migration time. Deriving equation (12) according to the migration time, leads to equations (13):

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{1}{I} \right) = \frac{dn_{bubble}}{dt} \frac{l_{electro,bubble}}{\kappa V} \left(\frac{1}{S_1} - \frac{1}{S} \right) \quad (13)$$

where $d(1/I)/dt = 232.7 \text{ A}^{-1}\text{s}^{-1}$ is the slope of the dotted trace in Figure 5 and $dn_{bubble}/dt = 0.0305 \text{ s}^{-1}$ is the slope of the orange trace in Figure 5. Equation (13) can be used to determine S_1 according to:

$$S_1 = \frac{1}{\frac{\kappa V}{l_{electro,bubble}} \frac{d}{dt} \left(\frac{1}{I} \right) + \frac{1}{S}} \quad (14)$$

Taking $l_{electro,bubble} = 13 \text{ mm}$ in equation (14) leads to $S_1 = 7.99 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2$. d_{air} was then determined using equation (15), with S_1 obtained from equation (14), giving d_{air} of 37 μm : Here, $l_{electro,bubble}$ is 13 mm and not 10.5 mm because it comes from the experiment presented in Figure 5, which is the one where the number of bubbles and current intensity decrease over time are measured.

$$d_{air} = \sqrt{\frac{4(S - S_1)}{\pi}} \quad (15)$$

Therefore, we can estimate the bubble diameter to $\sim 37 \mu\text{m}$. The experimental method leading to equations (14) and (15) has the advantage to average the experimental data on 11 bubbles created in a period of time corresponding to about 5-6 min (see Figure 5).

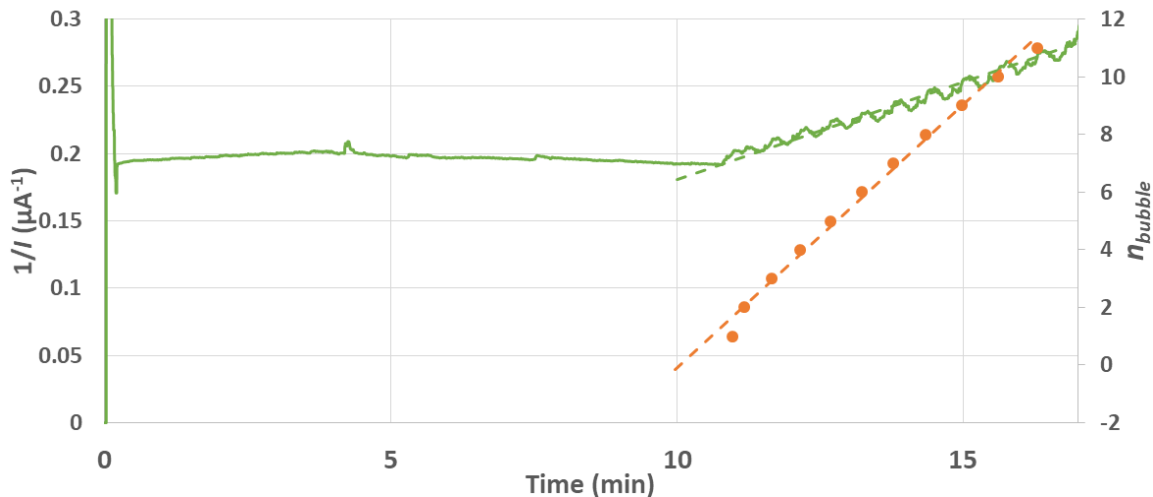


Figure 5. Representation of the inverse of the current intensity evolution (green trace) during DMF marker migration in a 80 psi-Glaco™ coated capillary and the corresponding number of generated bubbles (in orange). Starting at around 11 min, each current intensity perturbation increment is related to the formation of one air bubble (also identified by an orange dot). The global decreasing current intensity slope is $d(1/I)/dt = 232.7 \text{ A}^{-1}\text{s}^{-1}$. The slope $dn_{\text{bubble}}/dt = 1.83 \text{ bubble min}^{-1} = 0.0305 \text{ bubble s}^{-1}$ (slope of the dotted orange line). Experimental conditions and experimental data as in Figure 2.

III.4. Influence of the applied separation voltage on the bubble formation and characteristics

DMF migration similar to the experiment of Figure 2 was performed at 4 different voltages (30 kV, 20 kV, 15 kV and 10 kV) as displayed in Figure 6 showing the corresponding UV traces and current intensities. The bubble characteristics ($l_{\text{electro,bubble}}$, d_{air} , bubble frequency, distance between bubbles) and the electrophoretic figures of merit (EOF mobility, electrophoretic velocity of the bubble) have been studied. The measurements were made on at least 6 successive bubbles on each run, and the results are summarized in Table 1. Calculations were done following the same approach as used in section III.3. As expected, modifying the separation voltage allowed decreasing the apparent electrophoretic velocity value from $2.95 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ at 30 kV down to $0.94 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ at 10 kV. It is thus possible to modulate the migration velocity of the bubbles, by simply changing the applied voltage. Regarding the dimensions of the bubbles, the diameter of the bubble was relatively constant (about $d_{\text{air}} \sim 36\text{-}41 \mu\text{m}$), whatever the applied voltage. This time, the bubble length under electric field was about $l_{\text{electro,bubble}} \sim 8\text{-}9 \text{ mm}$, except

at 10 kV for which the length was about 2 times lower (~4.4 mm). The frequency of the bubbles was comprised between 0.053 Hz and 0.035 Hz.

μ_{eo} was roughly the same at each applied voltage, as expected. Hence, $v_{electro,bubble}$ was directly proportional to the applied voltage. $l_{electro,bubble}$ was about 8-9 mm at 15, 20 and 30 kV; and about two times lower (4.6 mm) at 10 kV. The distance between two bubbles is the same at 30 kV and 20 kV (about 5 cm), and decreased to about 2 to 3 cm at 10 kV and 15 kV, respectively. On the whole, better stability and regularity in the bubble formation was observed at 30 kV and 20 kV compared to 15 and 10 kV.

Table 1: Bubble characteristics at three different applied voltages. Experimental conditions as in Figure 6. Electrophoretic mobility of the bubble: $\mu_{ep} = -48.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Voltage (kV)	30	20	15	10
$\mu_{eo} (10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$	9.5	12.4	12.7	11.4
$\mu_{app} (10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$	-39.4	-36.4	-36.2	-37.5
$v_{electro,bubble} (\text{mm} \cdot \text{s}^{-1})$	2.95	1.82	1.36	0.94
$l_{electro,bubble} (\text{mm})^a$	8.7	9.3	8.5	4.6
Bubble frequency (s^{-1})	0.0527	0.0345	0.0401	0.0516
$d_{air} (\mu\text{m})$	35.8	35.9	41.2	39.0
Distance between bubbles (mm)	55.9	52.7	33.8	18.2

^a mean value of the first 11 bubble lengths of each run for the runs at 30 and 20 kV, and mean value of the 6 more stable bubbles for the run at 15 kV (the six consecutive bubbles between 24 and 26 min) and 10 kV (the six consecutive bubbles between 19 and 21 min).

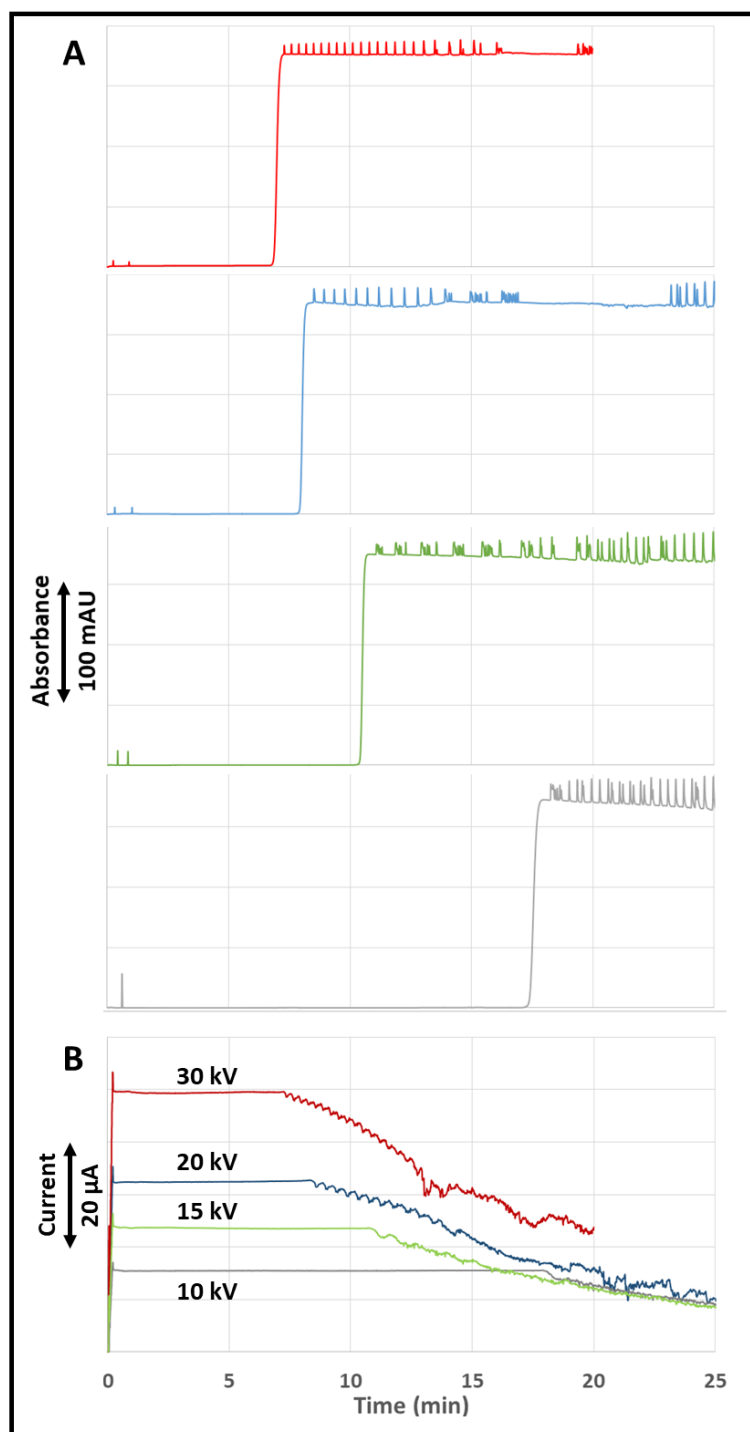


Figure 6: Electropherograms of 1% DMF marker in frontal mode obtained on 80 psi-GlacoTM coated capillary showing the generation of air bubbles at 30 kV (light red), 20 kV (light blue), light green (15 kV) and 10 kV (light grey) (A) and the corresponding current intensities (same color but darker) (B). Experimental conditions: GlacoTM coated capillary 50 μ m I.D. \times 40 cm length (30 cm to the detector) prepared according to section II.2. Background electrolyte: 20 mM HEPES + 10 mM NaOH at pH 7.4. Pressure (to stabilize the current intensity): + 3 psi at both capillary ends. Inlet vial: DMF at 1% in BGE. Outlet vial: BGE. Capillary flush with BGE before the run: 20 psi, 3 min. Detection: 214 nm. Temperature: 25°C.

IV. Conclusion

This work demonstrates that it is possible to repeatedly generate air microbubbles at the detection window of an hydrophobic GlacoTM coated capillary. In addition to the specific capillary coating, several experimental requirements have been identified: (i) the UV lamp should be turned on; (ii) the separation voltage is also mandatory; (iii) a DMF concentration of at least 0.5% is required in front of the detection window to generate the bubbles. Air microbubbles have a diameter of about $d_{air} \sim 35\text{--}39 \mu\text{m}$, a typical length between 8 and 13 mm and an effective electrophoretic mobility of about $-48.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. The air bubbles bear therefore strongly negative charges on their surfaces corresponding to a zeta potential of about $\sim -62.6 \text{ mV}$. As expected, modifying the separation voltage allows changing the apparent electrophoretic velocity from $2.95 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ at 30 kV down to $0.94 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ at 10 kV. This approach could be useful to generate on demand air microbubbles, for instance by controlling the zones of DMF in the capillary, or by controlling the switching on/off of the UV beam during the run.

References

- [1] K. Hettiarachchi, On-chip generation of microbubbles as a practical technology for manufacturing contrast agents for ultrasonic imaging, *Lab Chip* 7 (2001) 1–37. doi:10.1039/B701481n.
- [2] J. Tian, F. Yang, H. Cui, Y. Zhou, X. Ruan, N. Gu, A novel approach to making the gas-filled liposome real: Based on the interaction of lipid with free nanobubble within the solution, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 26579–26584. doi:10.1021/acsami.5b07778.
- [3] T. Yin, P. Wang, R. Zheng, B. Zheng, D. Cheng, X. Zhang, X. Shuai, Nanobubbles for enhanced ultrasound imaging of tumors, *Int. J. Nanomedicine* 7 (2012) 895–904. doi:10.2147/IJN.S28830.
- [4] Y. Wang, X. Li, Y. Zhou, P. Huang, Y. Xu, Preparation of nanobubbles for ultrasound imaging and intracellular drug delivery, *Int. J. Pharm.* 384 (2010) 148–153. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.09.027.
- [5] S.K. Misra, G. Ghoshal, M.R. Gartia, Z. Wu, A.K. De, M. Ye, C.R. Bromfield, E.M. Williams, K. Singh, K. V. Tangella, L. Rund, K. Schulten, L.B. Schook, P.S. Ray, E.C. Burdette, D. Pan, Trimodal Therapy: Combining Hyperthermia with Repurposed Bexarotene and Ultrasound for Treating Liver Cancer, *ACS Nano* 9 (2015) 10695–10718. doi:10.1021/acs.nano.5b05974.
- [6] M. Meng, J. Gao, C. Wu, X. Zhou, X. Zang, X. Lin, H. Liu, C. Wang, H. Su, K. Liu, Y. Wang, X. Xue, J. Wu, Doxorubicin nanobubble for combining ultrasonography and targeted chemotherapy of rabbit with VX2 liver tumor, *Tumor Biol.* 37 (2016) 8673–8680. doi:10.1007/s13277-015-4525-5.
- [7] A. Agarwal, W.J. Ng, Y. Liu, Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment, *Chemosphere* 84 (2011) 1175–1180. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.05.054.

- [8] J. Zhu, H. An, M. Alheshibri, L. Liu, P.M.J. Terpstra, G. Liu, V.S.J. Craig, Cleaning with Bulk Nanobubbles, *Langmuir* 32 (2016) 11203–11211. doi:10.1021/acs.langmuir.6b01004.
- [9] A. Ushida, T. Hasegawa, N. Takahashi, T. Nakajima, S. Murao, T. Narumi, H. Uchiyama, Effect of mixed nanobubble and microbubble liquids on the washing rate of cloth in an alternating flow, *J. Surfactants Deterg.* 15 (2012) 695–702. doi:10.1007/s11743-012-1348-x.
- [10] S. Calgaroto, K.Q. Wilberg, J. Rubio, On the nanobubbles interfacial properties and future applications in flotation, *Miner. Eng.* 60 (2014) 33–40. doi:10.1016/j.mineng.2014.02.002.
- [11] M. Fan, D. Tao, R. Honaker, Z. Luo, Nanobubble generation and its applications in froth flotation (part II): fundamental study and theoretical analysis, *Min. Sci. Technol.* 20 (2010) 159–177. doi:10.1016/S1674-5264(09)60179-4.
- [12] A. Sobhy, D. Tao, Nanobubble column flotation of fine coal particles and associated fundamentals, *Int. J. Miner. Process.* 124 (2013) 109–116. doi:10.1016/j.minpro.2013.04.016.
- [13] F. Kawara, J. Inoue, M. Takenaka, N. Hoshi, A. Masuda, S. Nishiumi, H. Kutsumi, T. Azuma, T. Ohdaira, The influences of pepsin concentrations and pH levels on the disinfective activity of ozone nanobubble water against helicobacter pylori, *Digestion* 90 (2014) 10–17. doi:10.1159/000358286.
- [14] S. Liu, S. Oshita, Y. Makino, Q. Wang, Y. Kawagoe, T. Uchida, Oxidative Capacity of Nanobubbles and Its Effect on Seed Germination, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4 (2016) 1347–1353. doi:10.1021/acssuschemeng.5b01368.
- [15] S. Liu, Y. Kawagoe, Y. Makino, S. Oshita, Effects of nanobubbles on the physicochemical properties of water: The basis for peculiar properties of water containing nanobubbles, *Chem. Eng. Sci.* 93 (2013) 250–256. doi:10.1016/j.ces.2013.02.004.
- [16] N. Matsuki, T. Ishikawa, S. Ichiba, N. Shiba, Y. Ujike, T. Yamaguchi, Oxygen supersaturated fluid using fine micro / nanobubbles, *Int. J. Nanomed.* 9 (2014) 4495–4505.
- [17] K.W. Ferrara, M.A. Borden, H. Zhang, Lipid-shelled vehicles: Engineering for ultrasound molecular imaging and drug delivery, *Acc. Chem. Res.* 42 (2009) 881–892. doi:10.1021/ar8002442.
- [18] N. Nirmalkar, A.W. Pacek, M. Barigou, On the existence and stability of bulk nanobubbles, *Langmuir* (2018). doi:10.1021/acs.langmuir.8b01163.
- [19] A.S. Najafi, J. Drelich, A. Yeung, Z. Xu, J. Masliyah, A novel method of measuring electrophoretic mobility of gas bubbles, *J. Colloid Interface Sci.* 308 (2007) 344–350. doi:10.1016/j.jcis.2007.01.014.
- [20] K. Okada, Y. Akagi, Method and apparatus to measure the zeta potential of bubbles, *J. Chem. Eng. Japan* (1987). 11-15
- [21] K. Kubota, S. Hayashi, M. Inaoka, A Convenient Experimental Method for Measurement of Zeta-Potentials Generating on the Bubble Suspended in Aqueous Surfactant Solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 95 (1983) 362-369.
- [22] S.T. Lou, Z.Q. Ouyang, Y. Zhang, X.J. Li, J. Hu, M.Q. Li, F.J. Yang, Nanobubbles on solid surface imaged by atomic force microscopy, *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* 18 (2000) 2573–2575. doi:10.1116/1.1289925.
- [23] W. Guo, H. Shan, M. Guan, L. Gao, M. Liu, Y. Dong, Investigation on nanobubbles on graphite substrate produced by the water-NaCl solution replacement, *Surf. Sci.* 606 (2012) 1462–1466. doi:10.1016/j.susc.2012.05.018.
- [24] W. Bouwhuis, R.C.A. Van Der Veen, T. Tran, D.L. Keij, K.G. Winkels, I.R. Peters, D. Van Der

- Meer, C. Sun, J.H. Snoeijer, D. Lohse, Maximal air bubble entrainment at liquid-drop impact, *Phys. Rev. Lett.* 109 (2012) 2–5. doi:10.1103/PhysRevLett.109.264501.
- [25] M. Choi, Y. Na, S. Kim, Hydrophilic strips for preventing air bubble formation in a microfluidic chamber, *Electrophoresis*. (2015) 2896–2901. doi:10.1002/elps.201500258.
- [26] L. Meng, F. Cai, Z. Zhang, L. Niu, Q. Jin, F. Yan, J. Wu, Z. Wang, L. Meng, F. Cai, Z. Zhang, L. Niu, Q. Jin, Transportation of single cell and microbubbles by phase-shift introduced to standing leaky surface acoustic waves, *Biomicrofluidics* 5 (2011) 44104. doi:10.1063/1.3652872.
- [27] A. Berthod, M.A. Rodriguez, M. Girod, D.W. Armstrong, Use of microbubbles in capillary electrophoresis for sample segregation when focusing microbial samples Original Paper, *J. Sep. Sci.* (2002) 988–995.
- [28] C.N. Baroud, F. Gallaire, R. Dangla, Dynamics of microfluidic droplets, *Lab Chip* 10 (2010) 2032. doi:10.1039/c001191f.
- [29] J.C. Baygentst, D.A. Saville, Electrophoresis of Drops and Bubbles, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 87 (1991) 1883–1898.
- [30] P. Leroy, D. Jougnot, A. Revil, A. Lassin, M. Azaroual, A double layer model of the gas bubble / water interface, *J. Colloid Interface Sci.* 388 (2012) 243–256. doi:10.1016/j.jcis.2012.07.029.
- [31] A. Graciaa, G. Morel, P. Saulner, J. Lachaise, R.S. Schechter, The Zeta-potential of Gas Bubbles, *J. Colloid Interface Sci.* 172 (1995) 131–136.
- [32] W. Jia, S. Ren, B. Hu, Effect of Water Chemistry on Zeta Potential of Air Bubbles, *Int. J. Electrochem. Sci.* 8 (2013) 5828–5837.
- [33] H.A. McTaggart, On the electrification at the boundary between a liquid and a gas, *Philos. Mag.* 44 (1922) 386–395.
- [34] J.K. Beattie, A.M. Djerdjev, G.G. Warr, The surface of neat water is basic, *Faraday Discuss.* 141 (2009) 31–39 . doi:10.1039/b816684f.
- [35] R. Vacha, S.W. Rick, P. Jungwirth, A.G.F. De Beer, H.B. De Aguiar, J. Samson, S. Roke, The Orientation and Charge of Water at the Hydrophobic Oil Droplet À Water Interface, *J. Am. Chem. Soc.* (2011) 10204–10210. doi:10.1021/ja202081x.
- [36] C. Renard, L. Leclercq, A. Stocco, H. Cottet, Superhydrophobic capillary coatings: Elaboration, characterization and application to electrophoretic separations, *J. Chromatogr. A.* 1603 (2019) 361–370. doi:10.1016/j.chroma.2019.06.035.
- [37] D. Quéré, Fluid Coating on a Fiber, *Annu. Rev. Fluid Mech.* 31 (1999) 347–384. doi:10.1146/annurev.fluid.31.1.347.
- [38] B. Bhushan, Y. Pan, S. Daniels, AFM characterization of nanobubble formation and slip condition in oxygenated and electrokinetically altered fluids, *J. Colloid Interface Sci.* 392 (2013) 105–116. doi:10.1016/j.jcis.2012.09.077.

Supporting Information of Chapter 3: Generation and characterization of air microbubbles in highly hydrophobic capillaries

Charly Renard¹, Laurent Leclercq¹, Hervé Cottet¹

¹ IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, France

*Corresponding Authors

HC: Tel.: +33 4 67 14 34 27; Fax: +33 4 67 63 10 46.

E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

Content:

This Supporting information includes:

SI-1. Bubble generation reproducibility	165
SI-2. Required parameters for bubble generation: influence of the DMF concentration and nature of the neutral marker	166

SI-1. Bubble generation reproducibility

Bubble generation was realized according to the procedure described in section on another Glaco™ coated capillary. Experimental results are similar to those presented in Figure 2 and the bubble characteristics (see Table SI1) are similar to those obtained from Figure 2. This reproducibility is thus in good agreement with the results presented in section III.2. and III.3.

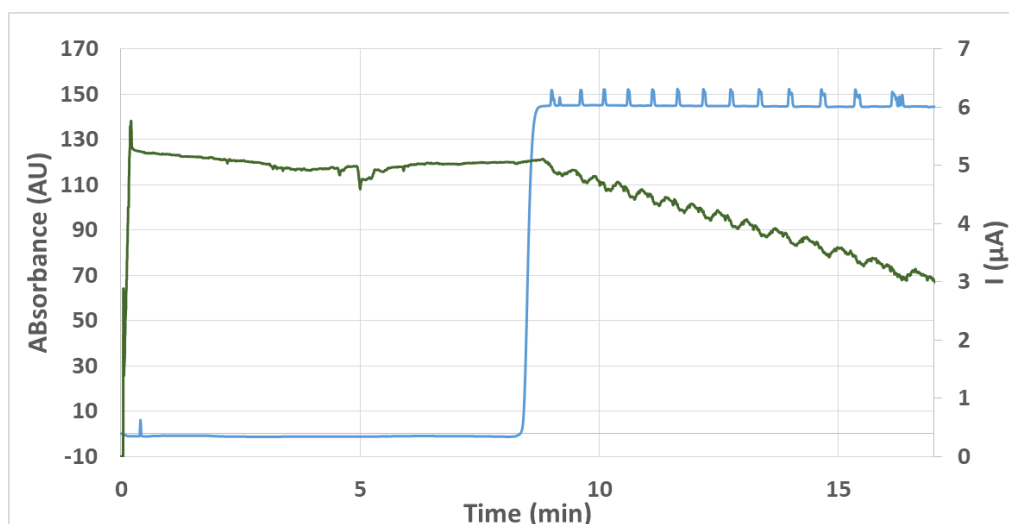


Figure SII. Electropherogram (blue trace) of 1% DMF marker in frontal mode obtained on Glaco™ coated capillary showing the generation of air bubbles. Corresponding current intensity is displayed in green. Experimental conditions: capillary dimensions 50 μm \times 40 cm length (30 cm to the detector). Background electrolyte: 20 mM HEPES + 10 mM NaOH at pH 7.4. Applied voltage: +20 kV. Pressure: + 3 psi at both capillary ends. Inlet vial: DMF at 1% in BGE. Outlet vial: BGE. Capillary flush with BGE before the run: 20 psi, 3 min. Capillary coating prepared according to the protocol presented in section 2.2. The current intensity is displayed in green. Detection: 214 nm. Temperature: 25°C.

Table SII: Bubble characteristics corresponding to Figure SII. Experimental conditions as in Figure SII.

μ_{eo} ($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	11.76
μ_{app} ($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	-37.1
$v_{electro,bubble}$ ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	$1.86 \cdot 10^{-3}$
$l_{electro,bubble}$ (m) ^a	0.01266
Bubble frequency (s^{-1})	0.03018
d_{air} (μm)	39.3

^a mean value of the first 11 bubble lengths of each run.

SI-2. Required parameters for bubble generation: influence of the DMF concentration and nature of the neutral marker

Figure SI2 displays electropherograms obtained in the same conditions as those of Figure 2, except that the UV marker was DMF at 0.1% or mesityl oxide at 1%. No spikes, no bubbles,

no current intensity could be observed showing that a minimal DMF concentration is required and that mesityl oxide do not generate bubbles.

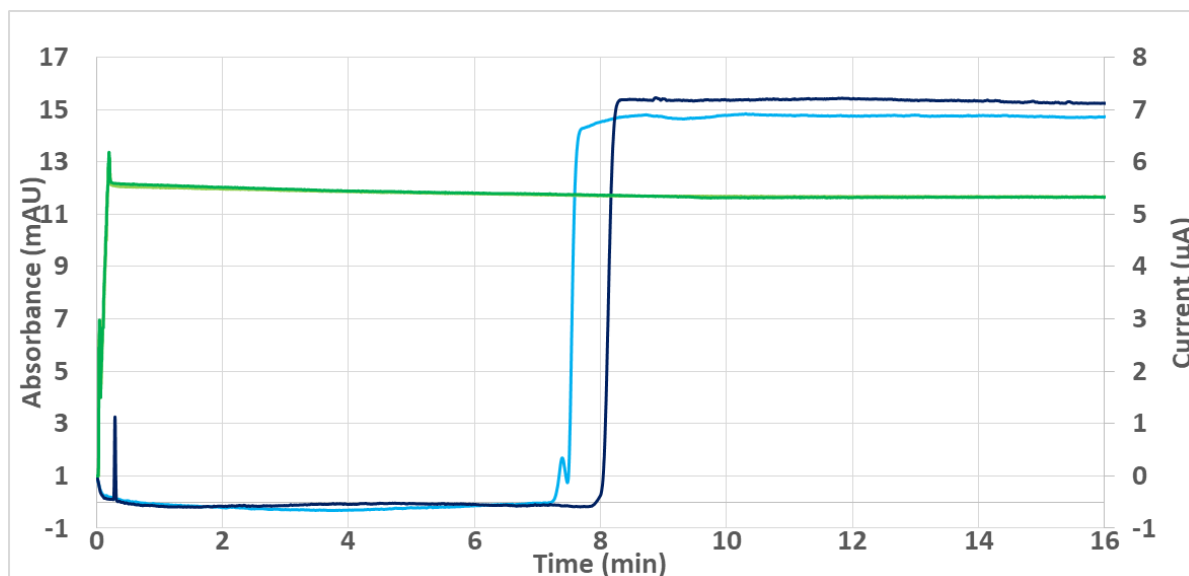


Figure SI2. Electrophoregrams in frontal mode of 0.1 % DMF (dark blue), and 1 % mesityl oxide (light blue) on Glaco™ coated capillary showing no bubble generation. Corresponding current intensities are displayed in green (dark and light green, perfectly superposed). Experimental conditions: capillary dimensions 50 µm I.D. × 40 cm length (30 cm to the detector) prepared according to section 2.2. Background electrolyte: 20 mM HEPES + 10 mM NaOH at pH 7.4. Applied voltage: +20 kV. Pressure: + 3 psi at both capillary ends. Inlet vial: DMF at 0.1% in BGE or mesityl oxide at 1% in BGE. Outlet vial: BGE. Capillary flush with BGE before the runs: 20 psi, 3 min. Detection: 214 nm. Temperature: 25°C.

Chapitre 4:
Quantification of protein adsorption in Capillary
Electrophoresis

Introduction au Chapitre 4 :

Après l'étude de la SH pour améliorer les séparations électrophorétiques, un autre type de greffage, bien connu dans la littérature et dans notre laboratoire, fait l'objet du chapitre 4. Il a été vu dans le chapitre 1 que les greffages SMIL sont très souvent utilisés en CE, compte tenu de la simplicité de mise en œuvre (simples rinçages) et de l'amélioration significative de la répétabilité/reproductibilité par rapport au capillaire en silice. Cependant, les phénomènes d'adsorption résiduelle limitent les performances (et notamment l'efficacité des séparations) de ces greffages. A notre connaissance, il n'existe pas de méthodologie simple et clairement définie permettant de comparer des greffages en termes d'adsorption résiduelle. La comparaison est souvent délicate, notamment quand les temps de migrations sont très différents d'un greffage à l'autre. Dans le chapitre 4, nous proposons d'utiliser le facteur de rétention k (qui est relié à l'adsorption via les modèles d'électrochromatographie) comme une mesure de l'adsorption résiduelle. Cette approche doit permettre, non seulement de comparer des greffages entre eux, mais aussi de rationaliser l'étude des paramètres expérimentaux de construction des greffages SMIL sur l'efficacité de séparation.

Quantification of protein adsorption in Capillary Electrophoresis

Charly Renard¹, Laurent Leclercq¹, Michel Martin², Hervé Cottet^{1*}

¹ IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, France

² PMMH, ESPCI, CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris-Diderot, Paris, France

*Corresponding Author

HC: Tel.: +33 4 67 14 34 27; Fax: +33 4 67 63 10 46.

E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

ABSTRACT. The improvement of separation efficiency for protein analysis in CE is a challenging topic in which protein adsorption onto the capillary wall plays a crucial role. In this work, a simple method allowing to quantify the adsorption of proteins onto the capillary surface was developed based on the determination of the retention factor by measuring separation efficiency of individual proteins at different separation voltages (i.e. different linear velocities). This approach was applied to the quantification of the residual adsorption of four test proteins on 5-layers polyelectrolyte coatings and on fused silica capillary. It allows to get a fair ranking of the coating performances toward protein adsorption, whatever the electroosmotic mobility and the migration times. Due to the existence of (even low) residual adsorption, the electrophoretic operating conditions (electric field, capillary length and internal diameter) can be optimized to improve the separation performances resulting in separation efficiency up to $\sim 600\,000$ plates.m⁻¹ in conditions compatible with MS coupling. This approach represents a crucial step in the course to get antifouling coatings for protein separation in CE. It can be used for the evaluation and ranking of virtually any coating (neutral or charged) in CE.

I. Introduction

In a theoretical point of view, the separation efficiency in capillary electrophoresis (CE) is ideally controlled by axial diffusion, as expressed in equation (1):

$$N = \frac{\mu V l}{2DL} \quad (1)$$

with μ the apparent electrophoretic mobility, V the applied voltage, D the molecular diffusion coefficient, l the effective capillary length to the detector, and L the total capillary length. For a small molecule, with D in the order of $10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, equation (1) leads to $N \sim 2 \times 10^5$ plates, taking for instance $V = 30 \text{ kV}$, $l = 0.3 \text{ m}$, $L = 0.4 \text{ m}$ and $\mu = 20 \text{ TU}$ (where TU stands for Tiselius Unit $= 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$). For a protein, with D in the order of $2 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, equation (1) leads to $N \sim 1 \times 10^6$ plates taking the same numerical values for the other parameters. In principle, the plate number is even supposed to increase proportionally to the solute size, since the diffusion coefficient is inversely proportional to the hydrodynamic radius according to the Stokes-Einstein law [1]. It means that, contrary to chromatographic techniques, N should increase for larger solutes (such as proteins or macromolecules), i.e. for solutes with lower diffusion coefficients. In practice, however, plate numbers are much lower than the maximum values predicted by equation (1), with typical plate numbers of about few thousands [2], up to typically hundred thousand [3] in the case of proteins.

The difference between the theoretical expectations and the experimental values is generally due to intra-capillary peak broadening, the origin of which can be found in: radial gradient temperature [4] due to the combination of Joules effect and capillary cooling, capillary coiling [5], electromigration dispersion also known as overloading effect [6,7], and solute adsorption onto the capillary wall [8–12]. More recently [9,10,13,14], the contribution of the electroosmotic flow (EOF) to the peak broadening in CE was also discussed as a possible source of peak broadening, especially for large solutes. The origin of the limiting factor which is controlling the separation efficiency of protein is still under debate and/or may also vary according to the experimental conditions [13,15]. The non-purity of the proteins themselves is also sometimes cited as a potential source of peak broadening since poorly separated multiple variants or conformers of a given protein can lead to the occurrence of peak broadening or peak shoulders [12]. When occurring, the solute adsorption onto the capillary surface is known to strongly decrease the separation efficiency [16]. This is especially true in the case of protein separation. That is why many different coatings approaches have been studied and developed in the past, to optimize the separation efficiency and repeatability for protein analysis [17–24]. Polyelectrolyte multilayers (known as SMIL, for Successive Multi-Ionic Layers) have been introduced in CE by Katayama et al. in 1998 [25], and consisted in the superposition of

alternating oppositely charged polyelectrolyte layers on the capillary surface. The coating protocol is generally simply based on a succession of capillary rinsing, and the number of layers can be easily varied to control the direction of the EOF. Two or four layers SMIL coatings [26] are generally used in neutral or basic conditions for the separation of acidic (negatively charged) proteins, while three or five layers coatings [24] are suited for the separation of basic proteins in acidic conditions. Several parameters were investigated to optimize the separation efficiency for peptide or protein analysis using SMIL coatings, such as: the number of polyelectrolyte layers [24,27,28], the polyelectrolyte layer thickness [29–31] controlled by the ionic strength of the electrolyte used for building the SMIL [28,32], the ionic strength of the BGE [33], the polyelectrolyte concentration and molar mass [34,35], the rinsing protocol [34], and the coating stabilization/conservation [27,32,36]. More recently, it was shown that the nature of the couple of polyelectrolytes used to build the SMIL coating had a great impact on the separation efficiency and repeatability [3,24]. Surprisingly, even the nature of the polyelectrolyte which is not on the last layer of the SMIL coating was found crucial [24]. Morphology, roughness and thickness of SMIL layers have also been observed by atomic force microscopy (AFM) [37], including imaging of charge distribution by using a modified cantilever with tip-tethered avidin, resulting in adhesion maps with nanometer resolution [26,38].

Despite, all these experimental efforts, a general and simple method able to quantify the protein adsorption onto the capillary surface, and allowing to rank the coating performances is still lacking [16,39]. This work aims at developing such a simple experimental method based on the theory of electrochromatography, for the evaluation and the ranking of coating performances in terms of protein/solute adsorption. We propose in this work to take the retention factor (as defined in chromatography) as a good estimator of the residual protein adsorption onto the capillary surface. Since the retention factors in CE are expected to be small, it is difficult to measure them based on the migration times (and as it would be done for chromatographic techniques). That is why we propose to determine the residual retention factor based on the separation efficiency. This concept was applied on a protein test mixture using 5-layers SMIL coated capillaries in a volatile BGE electrolyte compatible with MS coupling. Using this approach, polybrene (PB) – poly(methacrylic acid) (PMA) SMIL performances were estimated and compared with PB – poly(L-lysine citramide) (PLC) SMIL coating and with bare fused silica capillary. In a second part of this work, the influences of experimental parameters such as the electric field, the capillary length, the capillary diameter toward the separation

performances, and more specifically toward the separation efficiency, are discussed with some rules of thumb to find the optimal conditions for each of these parameters.

II. Materials and methods

II.1. Chemicals

Polybrene (hexadimethrine bromide, PB, M_w 15 000 g.mol⁻¹, pK_a = 10.5) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Poly(methacrylic acid) (PMA, M_w 50 000 g mol⁻¹, PDI = 2.5, pK_a = 4.2-4.8) was synthesized as previously described [40]. Poly(L-Lysine citramide) (PLC, M_w 20 000 g.mol⁻¹) is a carboxylic polyacid composed of building blocks based on alternating L-lysine and citric acid moieties, kindly supplied by M. Boustta (IBMM, Université de Montpellier, France). 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES) and acetic acid glacial were purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France) and sodium hydroxide (NaOH) was from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Trypsin Inhibitor (TI, from soybean, purity not indicated by the supplier), Myoglobin (Myo, from equine skeletal muscle, purity \geq 95%), Ribonuclease A (Rnase A, from bovine pancreas, purity \geq 60%) and Lysozyme (Lys, from chicken egg white, purity \geq 90%) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ultrapure water (18.2 M Ω .cm) was obtained using a MilliQ system from Millipore (Merck, Molsheim, France).

II.2. SMIL coatings

5-layers SMIL coatings were prepared by successive flushes of the capillary with the polyelectrolyte solutions. Polyelectrolyte solutions (cation: PB; anion: PMA or PLC) were prepared at 3 g.L⁻¹ in the 20 mM HEPES / 10 mM NaOH, pH 7.4 buffer. Before SMIL coating, the capillary conditioning was performed by flushing with NaOH 1 M for 10 min, ultrapure water for 5 min, and HEPES/NaOH buffer for 3 min. The pressure applied for all the flushes (P_{flushes}) depends on the capillary internal diameter (see Table 1).

For the SMIL building protocol, the polycation and polyanion layers were alternatively deposited on the capillary surface by flushing the capillary with the polyelectrolyte solution for 7 min at a given pressure, as indicated in Table 1 according to the capillary dimensions, and by flushing with the HEPES/NaOH buffer for 3 min at the same pressure, between each polyelectrolyte layer. Five-layers were deposited with a total of 3 cationic layers and two

anionic layers deposited alternatively. A final flush with the BGE (0.5 M acetic acid) was performed for 10 min at the pressure mentioned in Table 1, before the CE separations. The pressure changes, as mentioned in Table 1, ensure that the SMIL coating was similar for all capillary dimensions since the pressure was adapted to keep constant the linear velocity during the flush, whatever the capillary dimensions. Five-layer coatings were chosen because it was found to be the optimal number of layers regarding separation efficiency and coating stability [27].

Table 1: Applied pressures for the flushes used during the SMIL coating protocol and between electrophoretic separations, and injection parameters, according to the capillary dimensions. *L*: total capillary length. P_{flushes} : hydrodynamic pressure for flushes. Flushing times: 7 min for polyelectrolyte flushes during coating construction, 3 min for HEPES/NaOH buffer between polyelectrolyte deposition, 10 min with BGE (0.5 M acetic acid) at the end of the coating protocol and 3 min BGE between CE runs.

<i>L</i> (cm)	40	40	40	50	60	80
I.D. (μm)	25	50	75	50	50	50
P_{flushes} (psi)	58	14.5	6.4	18	22	29
Injection	0.8 psi, 8 s	0.4 psi, 4 s	0.1 psi, 7 s	0.4 psi, 5 s	0.4 psi, 6 s	0.4 psi, 8 s

II.3. Capillary electrophoresis

Capillary electrophoresis experiments were carried out on a P/ACE™ MDQ Beckman-Coulter (Sciex, Villebon sur Yvette, France) piloted by 32 Karat software. Bare fused silica capillaries are purchased from Composite Metal Services (Photonlines, France). Different dimensions of capillary were used, as mentioned in Table 1, with the effective length being 10 cm less than the total capillary length.

Electrophoretic separations were performed in a 0.5 M acid acetic BGE at pH 2.5 (3.13 mM ionic strength). Before each run, the capillary was flushed for 3 min at the flushing pressure indicated in Table 1. Protein mixture was injected into the capillary at different pressures according to the capillary dimensions (see Table 1). The protein mix was made of TI, Myo, RNase, Lys at 0.2 g.L⁻¹ each in pure water. 0.1% DMF was used in coinjection as electroosmotic flow marker. Separations were realized at different applied voltages as indicated on the Figures

showing the electropherograms. The temperature of the capillary cartridge was set at 25°C. UV detection was performed at 214 nm.

The separation efficiency was estimated by the plate number using the following equation:

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{\delta} \right)^2 \quad (2)$$

where t is the migration time at the peak apex and δ is the half-height peak width (based on the entire peak), determined using CEval 0.6h3 software available at the following address [<https://echmet.natur.cuni.cz/software/ceval>]. In further calculations, the plate height H was obtained from equation 3:

$$H = \frac{l}{N} \quad (3)$$

with l the effective capillary length to the detector. The linear migration velocity u of a given protein was experimentally obtained via equation 4:

$$u = \frac{l}{t} \quad (4)$$

III. Theoretical part

III.1. Influence of adsorption on separation efficiency in CE

Adsorption onto the capillary wall in CE is similar to considering open tubular electrochromatography (OT-CEC), where the solute may adsorb onto the coating of the capillary. In this situation, if we assume that the axial molecular diffusion and the adsorption are the main causes of peak broadening, equation (5) - which is similar to the Golay equation- can be used to express the plate height (H) as a function of the solute retention factor k on the stationary phase [12]:

$$H = \frac{2D}{u_m} + \frac{d_c^2 u_m}{D} \frac{k^2}{16(1+k)^2} + \frac{2}{3} \frac{d_f^2 u_m}{D_s} \frac{k}{(1+k)^2} \quad (5)$$

where D is the molecular diffusion coefficient (m^2s^{-1}) of the solute in the background electrolyte, d_c is the internal diameter of the capillary, d_f is the coating film thickness, D_s is the molecular diffusion coefficient in the solid stationary phase located on the capillary surface. In

this equation, u_m is the mobile phase velocity, i.e. the velocity of the analyte when it is moving in the liquid phase, owing to its electrophoretic mobility and to the electroosmotic mobility. This velocity u_m is different for each protein and is related to the experimentally accessible (apparent) migration velocity, u , like in chromatography, as:

$$u_m = u(1+k) \quad (6)$$

It is convenient to rewrite equation (5) in order to determine the peak broadening contribution which is not related to the axial molecular diffusion, according to:

$$\frac{Hl(1+k)}{2Dt} - 1 = \frac{u^2k}{D} \left[\frac{d_c^2k}{32D} + \frac{d_f^2}{3D_s} \right] \quad (7)$$

where t is the solute migration time. In equation (7), $2Dt/(1+k)$ is the spatial variance due to molecular diffusion once the peak center-of-mass reaches the detector position. The dimensionless $\frac{Hl(1+k)}{2Dt} - 1$ quantity in the left-hand side of equation (7) represents the contribution to the peak broadening due to the solute adsorption, normalized to the molecular diffusion dispersion. For instance, a value of $\frac{Hl(1+k)}{2Dt} - 1 = 3$ means that the contribution of the solute adsorption to the global peak broadening is three times that of the axial diffusion. The expression given in equation (7) allows comparing capillaries coatings having different electroosmotic mobilities and solute migration times. If we assume that the $\frac{d_f^2}{3D_s}$ term is negligible compared to the $\frac{d_c^2k}{32D}$ term in the right side of equation (7), since the film thickness (d_f , approx. 10-20 nm [37]) is much smaller compared to the internal diameter of the capillary (d_c , typically 50 μm), equation (7) reduces to:

$$\frac{Hl(1+k)}{2Dt} - 1 = \frac{u^2k^2d_c^2}{32D^2} \quad (8a)$$

$$\frac{Hl}{2Dt} - 1 = -\frac{k}{1+k} + \frac{u^2k^2d_c^2}{32D^2(1+k)} \quad (8b)$$

This latter expression (8b) set the dependence of the peak broadening contribution due to the adsorption according to the experimental parameters (retention factor k , linear migration velocity u , internal capillary diameter d_c , and molecular diffusion D).

III.2. Determining the retention factor by varying the separation voltage

From equation (8b), it is possible to calculate the retention factor k by plotting $\frac{Hl}{2Dt}$ as a function of u^2 for a given solute, where u is experimentally varied by changing the separation voltage. H and u are calculated from the electropherograms obtained at different applied voltages (see Section II.3). Such a plot is a straight line with a y-intercept equal to $-k/(1+k)$ and a slope p given by:

$$p = \frac{k^2 d_c^2}{32D^2(1+k)} \quad (9)$$

Resolving equation (9) in k leads to the following equation and to the related solution (only the solution with a physical meaning is retained):

$$\frac{d_c^2}{32pD^2} k^2 - k - 1 = 0 \quad (10)$$

$$k = \frac{1 + \sqrt{1 + 2A}}{A} \text{ with } A = \frac{d_c^2}{32pD^2} \quad (11)$$

III.3. Influence of the capillary length on the theoretical plate number:

At constant electrical field, u is constant, and the plate number per capillary length N/l is given from equation (7) by:

$$\frac{N}{l} = \frac{u}{2D \left(\frac{1}{1+k} + pu^2 \right)} \quad (12)$$

For a given protein (i.e. at constant p), $\frac{N}{l}$ is independent of l , but N is proportional to l .

III.4. Influence of the capillary I.D. on the theoretical plate number

As in GC, the retention factor in OT-CEC is linked to the partitioning equilibrium constant K between the background electrolyte and the coating via:

$$k = K \frac{V_s}{V_m} = K \frac{4d_f}{d_c} \quad (13)$$

where V_s and V_m are the volumes of stationary and mobile phases and d_f is the thickness of the film of stationary phase. At constant d_f , k decreases when d_c increases. This means that the larger the capillary I.D. is, the lower the retention is. Since u_m is assumed to be independent of d_c (while u increases with increasing d_c , due to lower retention), it is convenient to express N/l as a function of u_m , K , d_c , d_f and D by replacing u by $u_m/(1+k)$ in equation (12), and subsequently k by $\frac{4Kd_f}{d_c}$, leading to equation (14a) and (14b), respectively:

$$\frac{N}{l} = \left(\frac{1}{1 + \frac{k^2 d_c^2}{32D^2 (1+k)^2} u_m^2} \right) \frac{u_m}{2D} \quad (14a)$$

$$\frac{N}{l} = \left(\frac{1}{1 + \frac{K^2 d_f^2 u_m^2}{2D^2 \left(1 + \frac{4Kd_f}{d_c}\right)^2}} \right) \frac{u_m}{2D} \quad (14b)$$

From equation (14b), it appears that, for a given thickness d_f of the coating, $\frac{N}{l}$ is supposed to increase when d_c decreases. This can be counter-intuitive, since the retention factor k is increasing with lower d_c . However, the mass transfer is faster for smaller capillary I.D., explaining the higher separation efficiency.

IV. Results and discussion

IV.1. Determination of protein retention factor on SMIL coatings by varying the separation voltage

In this work, we propose to take the experimental retention factor as a quantitative estimation of the protein adsorption onto the coating of the capillary wall. To obtain the experimental retention factors of test proteins (Trypsin Inhibitor, Myoglobin, RNase and Lysozyme) onto a SMIL coated capillary, electrophoretic separations were performed at different voltages from 10 to 30 kV in 0.5 M acetic acid. Table 2 displays the main characteristics of the studied proteins.

Table 2: Diffusion coefficient D , molar mass M , isoelectric point pI , hydrodynamic radius R_h and electrophoretic mobility μ_{ep} for the studied proteins.

Protein	TI	Myo	RNase	Lys
D^a	3.5	2.0	3.3	4.0
pI	4.6	6.8-7.2	9.6	11.35
R_h (nm) ^b	2.0	3.7	2.1	1.7
μ_{ep}^c	4.69	3.92	3.47	2.42
M_w (kDa)	20.1	17	13.7	14.3

^a in $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ as determined by Taylor dispersion analysis in AcOH 0.5 M [24]

^b from D using Stokes-Einstein relationship

^c in $10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ in 0.5 M acetic acid

A five layers PB-PMA SMIL coating was selected for this study, since it was previously reported as a performant SMIL coating in acidic conditions [3]. Figure 1A displays the electrophoregrams of the protein separation at different applied voltages, and the corresponding current intensities are reported in Figure 1B. Excellent repeatability was obtained, as observed by the superposition of the five repetitions for each separation voltage.

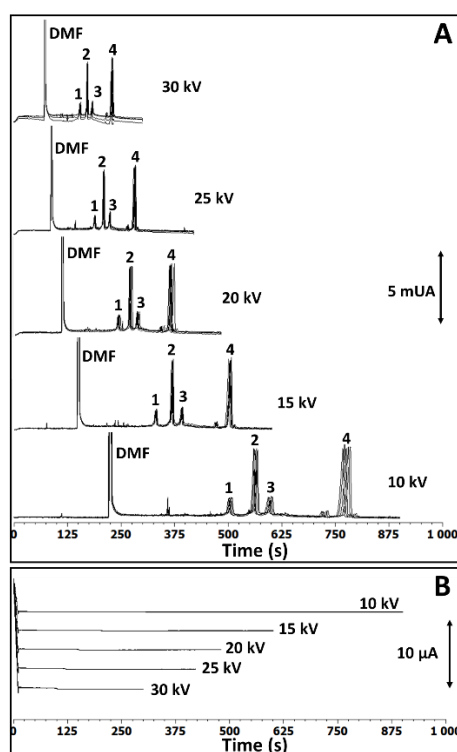


Figure 1: Electropherograms of the protein test mixture obtained at different applied voltages as indicated on the graph on a 5-layers PB-PMA SMIL coated capillary (A) and the corresponding current intensities (B). Experimental conditions: 5-layers PB-PMA SMIL coated capillary, 40 cm total length (30 cm to the detector) \times 50 μm I.D. Background electrolyte: 0.5 M acetic acid, pH 2.5. Flush before each run: BGE 14.5 psi, 3 min. Hydrodynamic injection: 0.4 psi, 4 s for protein mixture. Co-injection of 0.1% DMF in ultrapure water: 0.4 psi, 4 s. Sample mixture and peak identification: TI (1), Myoglobin (2), RNase A (3), Lys (5) at 0.2 g L^{-1} each in water. Temperature: 25°C. For the coating procedure: see the experimental section II.2.

From these electropherograms, the dimensionless $\frac{Hl}{2Dt} - 1$ term, which is directly related to the peak broadening, was determined experimentally for each protein and each separation voltage.

As expected, $\frac{Hl}{2Dt} - 1$ was found to vary linearly according to u^2 (see Figure 2 and equation (8b)). This means that the peak broadening (or peak variance) on a SMIL coated capillary increases quadratically with the linear velocity u (and therefore with the applied voltage), due to the solute adsorption on the capillary surface. This is very different from what is expected for CE when the peak broadening is only controlled by axial diffusion. In that latter case, the peak broadening should decrease with increasing u , as far as the Joule heating is not too important [8]. The determination of the retention factors of the test proteins on the SMIL coating is obtained from the slope $p = \frac{k^2 d_c^2}{32D^2(1+k)}$ of each line observed in Figure 2 (see equation (8b)).

The slope p is an increasing function of k . Knowing D (determined by Taylor dispersion

analysis elsewhere [24], see numerical values in Table 2) and d_c^2 , k can be determined using equation (11) by solving a second order equation in k for each protein (see equation (10)). The numerical values of k are gathered in Table 3 (PB-PMA, 50 μm I.D.). The retention factor on the PB-PMA SMIL coating varies between 0.11 (Myo) and 0.20 (TI). Chromatographically speaking, these retention factors are very low; but it is interesting to notice that such a weak retention leads to significant peak broadening with $\frac{Hl}{2Dt} - 1$ values which can reach up to 45 at high voltage/velocity (see e.g. TI at 30 kV). The determination of the retention factor is a practical way to quantify the interaction between a given protein and the SMIL coating (or any other type of coating). In the present case, TI and Myo are the most adsorbed proteins on the PB-PMA coating, followed by RNase and Lys. It is also worth noting that, contrary to what is usually performed in chromatography, the retention factors are here determined from separation efficiency instead of retention/migration times.

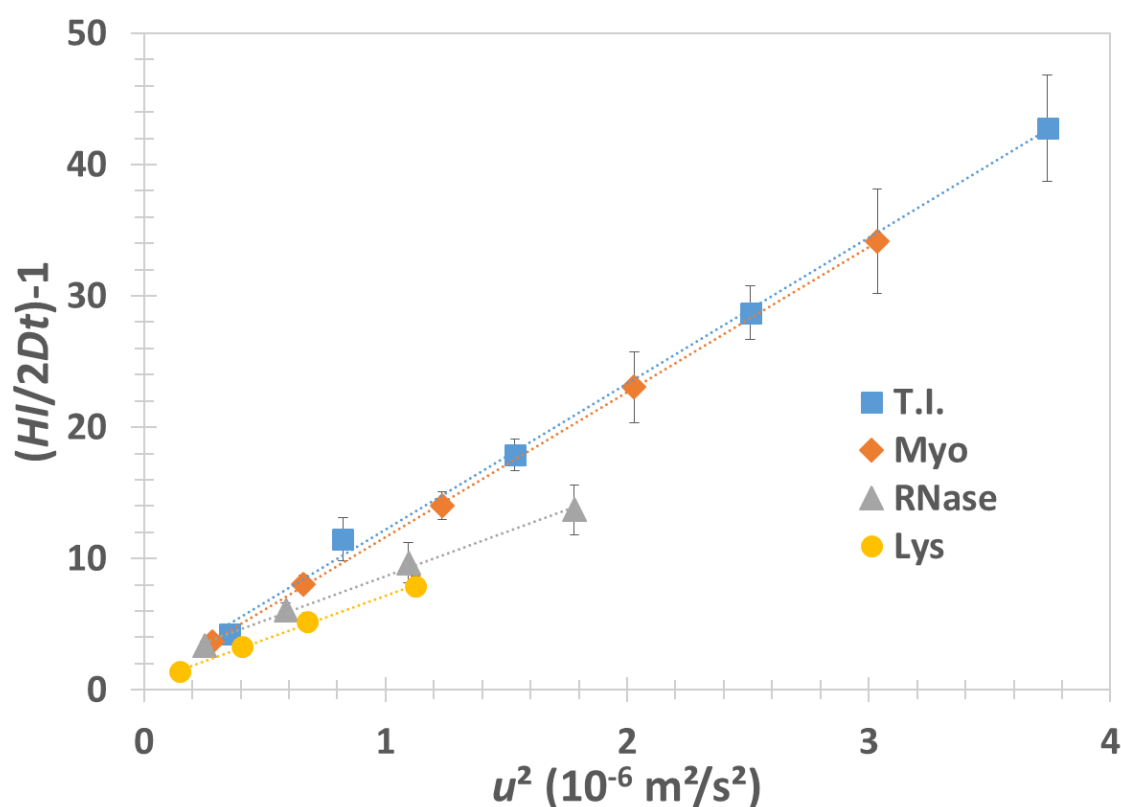


Figure 2: Representation of $\frac{Hl}{2Dt} - 1$ as a function of u^2 for 4 proteins on a 5 layers PB-PMA SMIL coating and 50 μm I.D. capillary. u^2 is varied by changing the separation voltage (see Figure 1). Experimental conditions as in Figure 1. Error bars are \pm one SD on $n=5$ repetitions. TI (\blacksquare $y = 11.1 u^2 + 1.12$; $R^2 = 0.998$), Myo (\blacklozenge $y = 11.1 u^2 + 0.60$; $R^2 = 0.999$), RNase A (\blacktriangle $y = 6.7 u^2 + 1.95$; $R^2 = 0.995$), Lys (\bullet $y = 6.7 u^2 + 0.52$; $R^2 = 0.997$) where u^2 is in $10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}^2$.

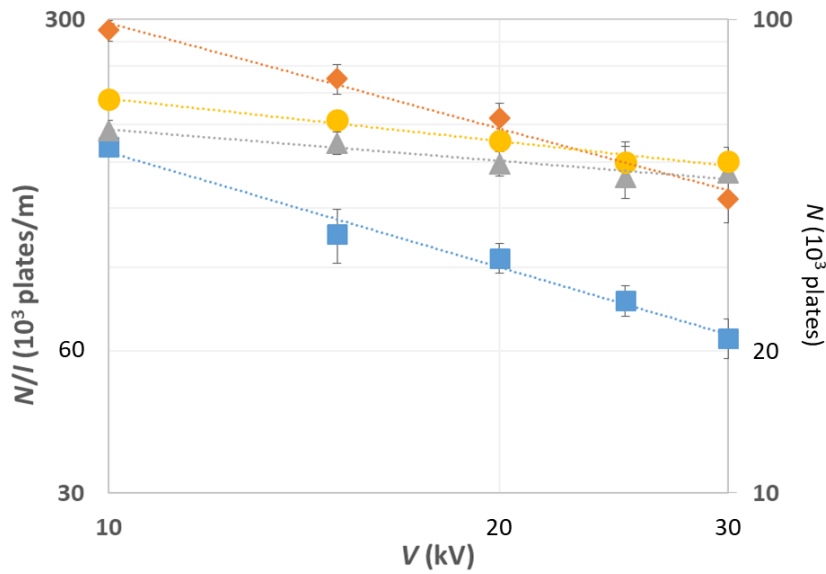


Figure 3: Representation of $\frac{N}{l}$ (left axis) or N (right axis) as a function of the separation voltage V on a 5-layers PB-PMA SMIL coating. Experimental conditions as in Figure 1. Error bars are \pm one SD on $n=5$ repetitions. TI (\blacksquare $N/l = 268 \times 10^6 V^{-0.81}$; $R^2 = 0.98$), Myo (\blacklozenge $N/l = 272 \times 10^6 V^{-0.74}$; $R^2 = 0.98$), RNase (\blacktriangle $N/l = 1.33 \times 10^6 V^{-0.22}$; $R^2 = 0.93$), and Lys (\bullet $N/l = 3.18 \times 10^6 V^{-0.30}$; $R^2 = 0.97$) where V is in V and N/l in m^{-1} . Experimental conditions as in Figure 1.

Practically, the impact of the weak adsorption of the proteins on the peak broadening can be minimized by lowering the voltage. This can be verified by plotting in double logarithmic scales N/l (or simply N) as a function of the separation voltage V (see Figure 3, left and right y-axis). Figure 3 clearly displays a decrease of the plate number with increasing voltage. As N/l scales as $\sim \frac{u}{(1+pu^2)}$ for low k (see equation (12)) and u is proportional to V , the higher the retention factor, the higher the p value, and the higher the dependence of the plate number with the voltage. This explains why TI and Myo have the highest slopes α in the N/l vs V plots presented in Figure 3, where α is defined as $N/l \sim V^\alpha$. α values are reported in Table 3.

IV.2. Influence of the capillary internal diameter

A similar series of experiments were performed on capillaries of different diameters using 5-layers PB-PMA SMIL coatings as presented in SI (see Figure SI1 and SI2 for 25 μ m I.D. and see Figures SI3 and SI4 for 75 μ m I.D.). For the capillaries of different diameters, the range of applied voltage is adapted to avoid Joule effect (see Figure SI5 for the determination of the

voltage range on each capillary), as well as the injection pressure to ensure similar injected plug lengths for all capillary I.D.. The protocol of SMIL preparation was also adapted to have the same flushing velocity and rinsing (or contact) time for each polyelectrolyte layer during their construction for all the capillaries of different I.D. (see section II.2 for the experimental details) to ensure similar coating properties (thickness, density). From Table 3, it appears that k decreases when the capillary I.D. increase, which is in good agreement with the theory (see equation (14)). Figure 4 shows the variation of k according to the capillary I.D. in double logarithmic scale. The mean slope (obtained by averaging the slope of each protein) is ~ -0.9 in good agreement with the expected d_c^{-1} dependency (see equation (14)).

Regarding the peak broadening, the $\frac{Hl}{2Dt} - 1$ term decreases with decreasing d_c as expected from equation (8b), and as verified experimentally by comparing for instance Figure 2 with Figure SI2. In terms of separation efficiency, $\frac{N}{l}$ is increasing when d_c decreases. This can be counter-intuitive, since the retention factor k is increasing with lower d_c . However, the mass transfer in liquid phase is faster for smaller capillary I.D., explaining the higher separation efficiency.

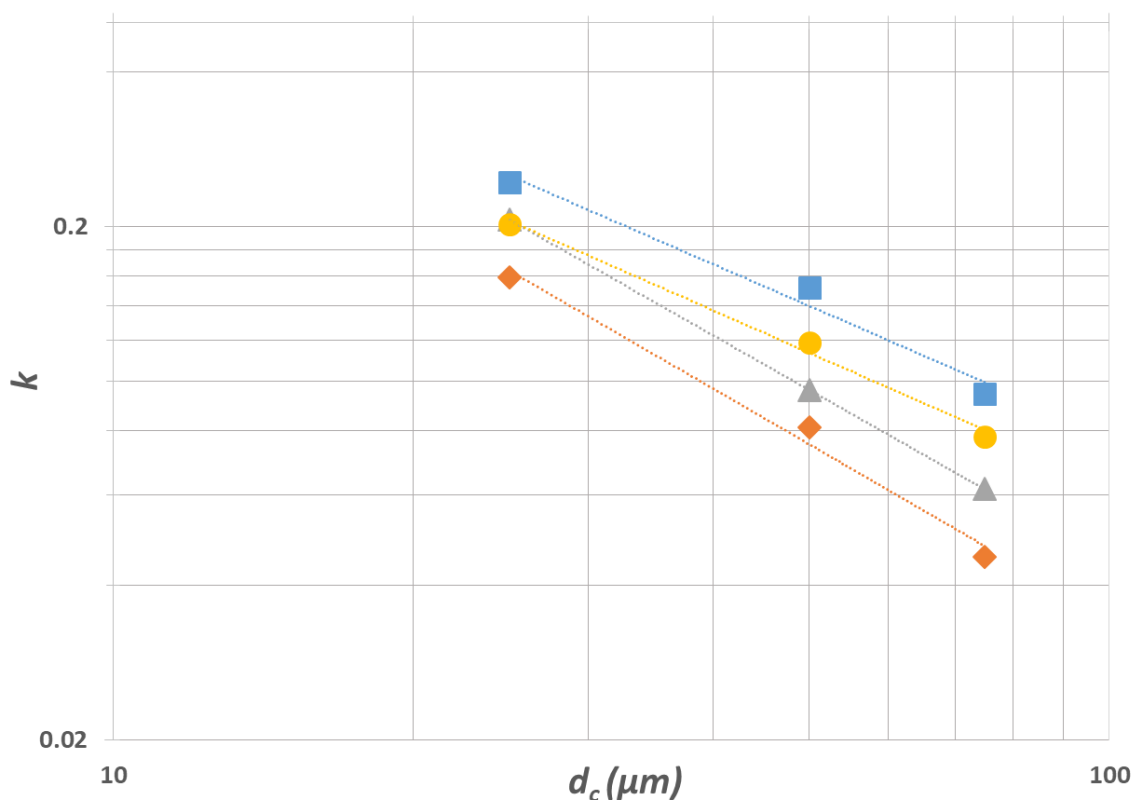


Figure 4: Representation of k dependence on the capillary I.D. for 5-layers PB-PMA SMIL coated capillaries. Experimental conditions as in Figures 1, SI1 and SI3. Error bars are \pm one SD on $n=5$ repetitions. TI (\blacksquare $k = 2.53 d_c^{-0.67}$, $R^2 = 0.933$), Myo (\blacklozenge $k = 7.34 d_c^{-1.09}$, $R^2 = 0.987$), RNase (\blacktriangle $k = 4.84 d_c^{-0.89}$, $R^2 = 1$), and Lys (\bullet $k = 4.27 d_c^{-0.84}$, $R^2 = 0.962$), where d_c is in μm .

Table 3: k , p and α parameters determined on 5-layers SMIL coatings and bare fused silica with capillaries of different I.D. Experimental conditions: as in Figure 1 for PB-PMA SMIL coating on a 50 μm I.D. capillary; as in Figure SI1 for PB-PMA SMIL coating on a 25 μm I.D. capillary; as in Figure SI3 for PB-PMA SMIL coating on a 75 μm I.D. capillary; as in Figure SI7 for PB-PLC SMIL coating on a 50 μm I.D. capillary, and as in Figure SI9 for Fused Silica on a 50 μm I.D. capillary. See the experimental section II.2 for the coating protocol.

	PB-PMA					PB-PLC		Fused Silica			
	25 μm		50 μm			75 μm		50 μm			
	p^a	k	p^a	k	α^b	p^a	k	p^a	k		
TI	4.9 ± 0.5	0.28 ± 0.01	11.1 ± 0.3	0.20 ± 0.01	-0.81 ± 0.07	10.7 ± 0.1	0.13 ± 0.01	7.6 ± 0.2	0.17 ± 0.01	203 \pm 13	1.18 ± 0.01
Myo	9.2 ± 0.5	0.21 ± 0.01	11.1 ± 0.1	0.11 ± 0.01	-0.75 ± 0.05	8.3 ± 1	0.06 ± 0.01	10.8 ± 0.7	0.11 ± 0.01	192 \pm 9	0.55 ± 0.02
RNAse	5.2 ± 0.2	0.27 ± 0.01	6.7 ± 0.5	0.15 ± 0.01	-0.22 ± 0.04	n.d.	n.d.	5.9 ± 0.5	0.14 ± 0.01	128 \pm 4	0.80 ± 0.02
Lys	3.7 ± 0.1	0.28 ± 0.01	6.7 ± 0.5	0.18 ± 0.01	-0.30 ± 0.03	5.8 ± 0.8	0.11 ± 0.01	6.8 ± 0.4	0.18 ± 0.01	51 \pm 2	0.57 ± 0.12

^a: in $10^6 \text{ s}^2\text{m}^{-2} \pm$ one standard deviation on the slope

^b: $\alpha \pm$ one standard deviation on the slope of the double log $N/l \sim V^\alpha$ representation; α has no dimension

IV.3. Influence of the capillary length

The retention factor k is supposed to be independent of the capillary length. Therefore, the $\frac{Hl}{2Dt} - 1$ term estimating the peak broadening, which only depends on u , k , d_c and D (see equation (8b)) should not vary with the capillary length for a given protein and a given SMIL coating. Similarly, the N/l term is supposed to be independent of l (see equation (12)) for a given protein and a given linear velocity (i.e. a given voltage). More interestingly for the optimization of the separation, it means that the theoretical plate number N should be proportional to l , and should thus increase with l . This was verified by performing a series of separations on PB-PMA coated capillaries of I.D. 50 μm with different effective lengths (50, 40 and 30 cm total lengths). The electrical field was kept constant to ensure that the linear velocity is similar inside each capillary (see electropherograms in Figure SI6). Injection parameters were also adapted to keep constant the injected plug length. As shown in Figure 5, linear correlations of the theoretical plate number N with l was obtained.

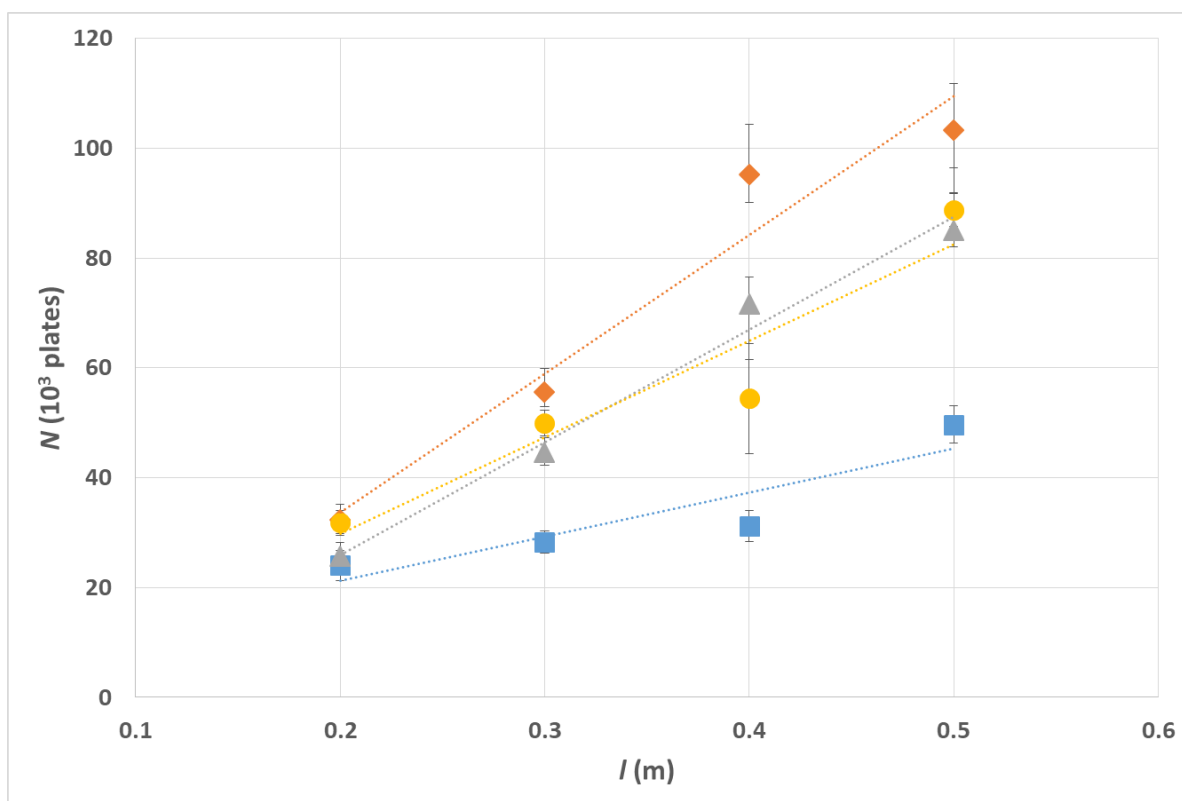


Figure 5: Influence of the capillary length l on the separation efficiency N on a 5-layers PB-PMA SMIL coating. Experimental conditions: Capillary dimensions 60/50/40 cm (50/40/30 cm to detector) \times 50 μm I.D. Background electrolyte: acetic acid 0.5 M (pH 2.5). Electrical field: 500 V cm^{-1} . Flushing and injection parameters as in Table 1. Sample mixture: each protein at

0.2 g.L⁻¹ in ultrapure water. Identification: TI (■), Myo (◆), RNase A (▲), Lys (●). Different tones in the colors for different capillary lengths: dark, $l = 50$ cm; medium, $l = 40$ cm; and light, $l = 30$ cm. Temperature 25°C. See section II.2 for the coating procedure. Electropherograms are displayed in Figure SI6.

IV.4. Comparison and ranking of different SMIL coatings and fused silica capillary

The determination of the retention factor via the influence of the separation voltage on the peak broadening, as discussed for Figure 2, is a very convenient way to quantitatively estimate the residual adsorption of the proteins onto the capillary surface, and therefore, to rank the different capillary coatings in their effectiveness to reduce protein adsorption. Numerical k values obtained for 5-layers PB-PMA and 5-layers PB-PLC coatings on 50 μm I.D. capillaries were compared and are gathered in Table 3. The different separations obtained for PB-PLC coating at different voltages are displayed in Figure SI7 with the $\frac{Hl}{2Dt} - 1$ vs u^2 plot allowing to determine the k values (see Figure SI8). It appears that the k values are, on the whole, slightly lower on the PB-PLC coating (0.17±0.01 for TI; 0.11±0.01 for Myo; 0.14±0.01 for RNase and 0.18±0.01 for Lys) compared to the PB-PMA coating (0.20±0.01 for TI ; 0.11±0.01 for Myo ; 0.15±0.01 for RNase and 0.18±0.02 for Lys).

To demonstrate the interest of SMIL coating to reduce the adsorption onto the capillary surface, k values were also determined on a 50 μm I.D. fused silica capillary (see Table 3 and Figure SI9 and SI10). In addition to a much lower migration time repeatability on fused silica capillary compared to SMIL coatings, retention factors k were also much higher on fused silica capillary compared to SMIL coatings (1.81±0.17 for TI; 1.07±0.05 for Myo, 0.34±0.01 for RNase and 0.40±0.01 for Lys).

IV.5. Optimization of the separation efficiency

In this section, we consider the improvement of the separation efficiency by simultaneously adjusting the experimental parameters (voltage, capillary length, capillary I.D.) on SMIL coatings. From the previous sections, it is clear that the separation efficiency (N) increases with higher effective capillary length l , lower separation voltage V and lower capillary I.D. As an example of optimization, N and N/l values obtained for a 5-layers PB-PMA coating on a 50 μm I.D. for different capillary lengths and voltages are presented in Table 4. The corresponding electropherograms are presented in Figure SI11. At a constant electric field of $50 \times 10^3 \text{ V m}^{-1}$, N

increases with increasing effective length by a factor of about 2 corresponding to the effective length ratio (50/30~1.7, see Table 4); while the N/l values remain almost unchanged (as expected). Reducing the electric field from $50 \times 10^3 \text{ V m}^{-1}$ to $12.5 \times 10^3 \text{ V m}^{-1}$ and increasing the effective capillary length to 70 cm leads to average plate numbers $N \sim 230 \times 10^3$ plates ($N/l \sim 330 \times 10^3 \text{ plates m}^{-1}$). Even better results could be obtained on the most efficient PB-PLC SMIL coating in similar operating conditions with average plate numbers $N \sim 300 \times 10^3$ plates ($N/l \sim 429 \times 10^3 \text{ plates.m}^{-1}$).

Table 4: Separation efficiencies obtained on 5-layers PB-PMA and PB-PLC SMIL coatings with different optimized conditions. Experimental conditions: Capillary dimensions, 40/60/80 cm (30/50/70 cm to detector) \times 50 μ m I.D.. Electrolyte: 0.5 M acetic acid, pH 2.5. Applied voltages and electric fields as indicated in the Table. Sample mixture: TI (1), Myo (2), RNase A (3) and Lys (4) at 0.2 gL⁻¹ each in water. Injection parameters: 0.4 psi, 4 s for $l = 30$ cm; 0.4 psi, 6 s for $l = 50$ cm; 0.4 psi, 8 s for $l = 70$ cm. Temperature: 25°C. See section II.2. for the coating procedure.

SMIL	l (cm)	V (kV)	E (10^3 V.m ⁻¹)	Protein	N (10^3 plates)	N/l (10^3 plates.m ⁻¹)
PB-PMA	30	20	50	TI (1)	28 \pm 2	94 \pm 7
				Myo (2)	56 \pm 4	185 \pm 14
				RNase (3)	45 \pm 3	149 \pm 9
				Lys (4)	50 \pm 2	167 \pm 8
	50	30	50	TI (1)	50 \pm 3	99 \pm 7
				Myo (2)	103 \pm 8	207 \pm 17
				RNase (3)	85 \pm 11	170 \pm 23
				Lys (4)	89 \pm 3	178 \pm 6
	70	10	12.5	TI (1)	267 \pm 33	382 \pm 48
				Myo (2)	409 \pm 33	584 \pm 47
				RNase (3)	n.d.	n.d.
				Lys (4)	188 \pm 27	269 \pm 38
PB-PLC	70 ^c	10	12.5	TI (1)	305 \pm 10	436 \pm 14
				Myo (2)	438 \pm 35	626 \pm 49
				RNase (3)	196 \pm 43	280 \pm 61
				Lys (4)	262 \pm 11	374 \pm 16

.

V. Conclusion

In this work, a simple method allowing to quantify the adsorption of proteins onto the capillary surface was developed based on the determination of the retention factor using the theory of band broadening in open-tubular electrochromatography. The retention factor can be easily determined by measuring the separation efficiency of the individual proteins at different separation voltages (i.e. different linear velocity). Interestingly, we have proposed in this work to determine the residual retention factor based on the separation efficiency instead of using retention (migration) times as it would be done in chromatography. This approach allows to quantitatively rank the separation performances of the different capillary coatings. PB-PLC coatings lead to slightly better performances than PB-PMA coating, and significant decrease of the retention factor compared to fused silica. Even if the values of k were very small on SMIL coatings (typically between 0.1 and 0.3), these are the signature of a residual protein adsorption limiting the plate numbers that are experimentally accessible.

Actually, the existence of very weak residual adsorption onto the capillary surface makes the electrophoretic separation world shifting into the chromatographic world. As a consequence, operating CE conditions should be optimized to improve the separation efficiency, with rules of thumb which are counter-intuitive for CE users. The electric field should be kept as low as possible with acceptable compromise with the analysis time, which is a very different conclusion compared to what is expected for CE in absence of adsorption. Longer capillary also brings higher plate numbers N , with N being proportional to the effective capillary length. Finally, and counter-intuitively but supported by the theory on OT-CEC, lower internal diameter also increases the separation efficiency due to lower mass transfer resistance. Performing a separation on a long capillary, and low electric field results in level of separation efficiency up to $\sim 600\,000$ plates. m^{-1} in conditions compatible with MS coupling.

Finally, we believe that the presented approach should greatly help to find the best suited capillary coating for a given application by quantifying the residual adsorption. We can also anticipate that the million theoretical plates should be accessible by combining the best low adsorption coating with the best experimental operating conditions.

References

- [1] R. Lindken, M. Rossi, S. Grosse, J. Westerweel, Micro-Particle Image Velocimetry (microPIV): recent developments, applications, and guidelines., *Lab Chip*. 9 (2009) 2551–2567. doi:10.1039/b906558j.
- [2] M. Pattky, C. Huhn, Advantages and limitations of a new cationic coating inducing a slow electroosmotic flow for CE-MS peptide analysis: A comparative study with commercial coatings, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 225–237. doi:10.1007/s00216-012-6459-8.
- [3] L. Leclercq, M. Morvan, J. Koch, C. Neusüß, H. Cottet, Modulation of the electroosmotic mobility using polyelectrolyte multilayer coatings for protein analysis by capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta.* 1057 (2019) 152–161. doi:10.1016/j.aca.2019.01.008.
- [4] X. Xuan, D. Li, Band-broadening in capillary zone electrophoresis with axial temperature gradients, *Electrophoresis*. 26 (2005) 166–175. doi:10.1002/elps.200406141.
- [5] B. Ga, E. Kenndler, Dispersive phenomena in electromigration separation methods, *Electrophoresis*. 21 (2000) 3888–3897. doi:10.1002/1522-2683(200012)21:18<3888::AID-ELPS3888>3.0.CO;2-D.
- [6] J.L. Beckers, System peaks and disturbances to the baseline UV signal in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 662 (1994) 153–166. doi:10.1016/0021-9673(94)85305-3.
- [7] Z. Malá, P. Gebauer, P. Boček, New methodology for capillary electrophoresis with ESI-MS detection: Electrophoretic focusing on inverse electromigration dispersion gradient. High-sensitivity analysis of sulfonamides in waters, *Anal. Chim. Acta.* 935 (2016) 249–257. doi:10.1016/j.aca.2016.06.016.
- [8] M.G. Khaledi, *High Performance Capillary Electrophoresis – Theory, Technique, and Applications Chemical Analysis: A series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications*, Wiley Intersci. (2007).
- [9] S. Ghosal, Fluid mechanics of electroosmotic flow and its effect on band broadening in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 25 (2004) 214–228. doi:10.1002/elps.200305745.
- [10] S. Ghosal, Electrokinetic Flow and Dispersion in Capillary Electrophoresis, *Annu. Rev. Fluid Mech.* 38 (2005) 309–338. doi:10.1146/annurev.fluid.38.050304.092053.
- [11] B. Gaš, M. Štědrý, E. Kenndler, Peak broadening in capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*. 18 (1997) 2123–2133. doi:10.1002/elps.1150181203.
- [12] M.R. Schure, A.M. Lenhoff, Consequences of Wall Adsorption in Capillary Electrophoresis: Theory and Simulation, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3024–3037. doi:10.1021/ac00069a015.
- [13] A. Khodabandehloo, D.D.Y. Chen, Electroosmotic Flow Dispersion of Large Molecules in Electrokinetic Migration, *Anal. Chem.* 89 (2017) 7823–7827. doi:10.1021/acs.analchem.7b01592.
- [14] S.K. Griffiths, R.H. Nilson, Electroosmotic fluid motion and late-time solute transport for large zeta potentials, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4767–4777. doi:10.1021/ac000539f.
- [15] B.H. Engelhardt, W. Beck, J. Kohr, T. Schmitt, *International Edition in English Capillary Electrophoresis : Methods and Scope*, 32 (1993).
- [16] L. Castelletti, B. Verzola, C. Gelfi, A. Stoyanov, P.G. Righetti, Quantitative studies on the adsorption of proteins to the bare silica wall in capillary electrophoresis. III: Effects of adsorbed surfactants on quenching the interaction, *J. Chromatogr. A.* 894 (2000) 281–289. doi:10.1016/S0021-9673(00)00664-6.
- [17] V. Dolník, V. Dolnik, *Capillary electrophoresis of proteins SDS Capillary Gel Electrophoresis*

- SDS-CGE, *Electrophoresis*. 27 (2006) 126–41. doi:10.1002/elps.200500567.
- [18] V. Dolník, Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007, *Electrophoresis*. 29 (2008) 143–156. doi:10.1002/elps.200700584.
- [19] P.G. Righetti, C. Gelfi, B. Verzola, L. Castelletti, The state of the art of dynamic coatings, *Electrophoresis*. 22 (2001) 603–611. doi:10.1002/1522-2683(200102)22:4<603::AID-ELPS603>3.0.CO;2-N.
- [20] C.A. Lucy, A.M. MacDonald, M.D. Gulcev, Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*. 1184 (2008) 81–105. doi:10.1016/j.chroma.2007.10.114.
- [21] C.L. Ng, H.K. Lee, S.F.Y. Li, Prevention of protein adsorption on surfaces by polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide triblock copolymers in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*. 659 (1994) 427–434. doi:10.1016/0021-9673(94)85085-2.
- [22] J. Horvath, V. Dolník, Polymer wall coatings for capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 22 (2001) 644–655. doi:10.1002/1522-2683(200102)22:4<644::AID-ELPS644>3.0.CO;2-3.
- [23] C. Renard, L. Leclercq, A. Stocco, H. Cottet, Superhydrophobic capillary coatings: Elaboration, characterization and application to electrophoretic separations, *J. Chromatogr. A*. 1603 (2019) 361–370. doi:10.1016/j.chroma.2019.06.035.
- [24] S. Bekri, L. Leclercq, H. Cottet, Polyelectrolyte multilayer coatings for the separation of proteins by capillary electrophoresis: Influence of polyelectrolyte nature and multilayer crosslinking, *J. Chromatogr. A*. 1399 (2015) 80–87. doi:10.1016/j.chroma.2015.04.033.
- [25] H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, Stable Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2254–2260. doi:10.1021/ac9708755.
- [26] L.G. Stock, M. Leitner, L. Traxler, K. Bonazza, L. Leclercq, H. Cottet, G. Friedbacher, A. Ebner, H. Stutz, Advanced portrayal of SMIL coating by allying CZE performance with in-capillary topographic and charge-related surface characterization, *Anal. Chim. Acta*. 951 (2017) 1–15. doi:10.1016/j.aca.2016.10.030.
- [27] R. Nehmé, C. Perrin, H. Cottet, M.D. Blanchin, H. Fabre, Influence of polyelectrolyte capillary coating conditions on protein analysis in CE, *Electrophoresis*. 30 (2009) 1888–1898. doi:10.1002/elps.200800688.
- [28] T.W. Graul, J.B. Schlenoff, Capillaries modified by polyelectrolyte multilayers for electrophoretic separations, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4007–4013. doi:10.1021/ac990277l.
- [29] S.T. Dubas, J.B. Schlenoff, Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers, *Macromolecules*. 32 (1999) 8153–8160. doi:10.1021/ma981927a.
- [30] S.L. Clark, M.F. Montague, P.T. Hammond, Ionic effects of sodium chloride on the templated deposition of polyelectrolytes using layer-by-layer ionic assembly, *Macromolecules*. 30 (1997) 7237–7244. doi:10.1021/ma970610s.
- [31] S.T. Dubas, J.B. Schlenoff, Polyelectrolyte multilayers containing a weak polyacid: Construction and deconstruction, *Macromolecules*. 34 (2001) 3736–3740. doi:10.1021/ma001720t.
- [32] R. Nehmé, C. Perrin, H. Cottet, M.D. Blanchin, H. Fabre, Influence of polyelectrolyte coating conditions on capillary coating stability and separation efficiency in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 29 (2008) 3013–3023. doi:10.1002/elps.200700886.
- [33] J.R. Catai, H.A. Tervahauta, G.J. De Jong, G.W. Somsen, Noncovalently bilayer-coated capillaries for efficient and reproducible analysis of proteins by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*. 1083 (2005) 185–192. doi:10.1016/j.chroma.2005.06.001.
- [34] J.B. Schlenoff, S.T. Dubas, T. Farhat, Sprayed polyelectrolyte multilayers, *Langmuir*. 16 (2000)

- 9968–9969. doi:10.1021/la001312i.
- [35] L. Ödberg, S. Sandberg, S. Welin-Klintström, H. Arwin, Thickness of Adsorbed Layers of High Molecular Weight Polyelectrolytes Studied by Ellipsometry, *Langmuir*. 11 (1995) 2621–2625. doi:10.1021/la00007a048.
- [36] J.S. Fritz, S.A. Steiner, Effect of a soluble ionic polymer on the separation of anions by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*. 934 (2001) 87–93. doi:10.1016/S0021-9673(01)01281-X.
- [37] R. Haselberg, F.M. Flesch, A. Boerke, G.W. Somsen, Thickness and morphology of polyelectrolyte coatings on silica surfaces before and after protein exposure studied by atomic force microscopy, *Anal. Chim. Acta*. 779 (2013) 90–95. doi:10.1016/j.aca.2013.03.066.
- [38] M. Leitner, L.G. Stock, L. Traxler, L. Leclercq, K. Bonazza, G. Friedbacher, H. Cottet, H. Stutz, A. Ebner, Mapping molecular adhesion sites inside SMIL coated capillaries using atomic force microscopy recognition imaging, *Anal. Chim. Acta*. 930 (2016) 39–48. doi:10.1016/j.aca.2016.05.002.
- [39] B. Verzola, C. Gelfi, P.G. Righetti, Protein adsorption to the bare silica wall in capillary electrophoresis - Quantitative study on the chemical composition of the background electrolyte for minimising the phenomenon, *J. Chromatogr. A*. 868 (2000) 85–99. doi:10.1016/S0021-9673(99)01207-8.
- [40] L. Leclercq, A. Pollet, M. Morcellet, B. Martel, Conformation of water soluble copolymers of methacrylic acid and benzyl methacrylate, *Eur. Polym. J.* 35 (1999) 185–193. doi:10.1016/S0014-3057(98)00124-4.
- [41] J.C. Giddings, *Dynamics of Chromatography Principles and Theory*, 1965.

Supporting information of Chapter 4 : Quantification of protein adsorption in Capillary Electrophoresis

Charly Renard¹, Laurent Leclercq¹, Michel Martin², Hervé Cottet^{1*}

¹ IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, France

² PMMH, ESPCI, CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris-Diderot, Paris, France

*Corresponding Author

HC: Tel.: +33 4 67 14 34 27; Fax: +33 4 67 63 10 46.

E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

Content:

This Supporting information includes:

Table of content

Supporting information of Chapter 4 : Quantification of protein adsorption in Capillary Electrophoresis	199
SI-1. Study of different capillary Internal Diameters.....	200
1.1. 25 μm I.D. PB-PMA SMIL coated capillary	200
1.2. 75 μm I.D. PB-PMA SMIL coated capillary	201
SI-2. Ohm law study.....	202
SI-3. Study of different capillary lengths on a 50 μm I.D. PB-PMA SMIL coated capillary	203
SI-4. Study of different capillary coatings	204
4.1. 50 μm I.D. PB-PLC SMIL capillary coating	204
4.2. 50 μm I.D. fused silica capillary	206
SI-5. Optimized separations	208

SI-1. Study of different capillary Internal Diameters

1.1. 25 μm I.D. PB-PMA SMIL coated capillary

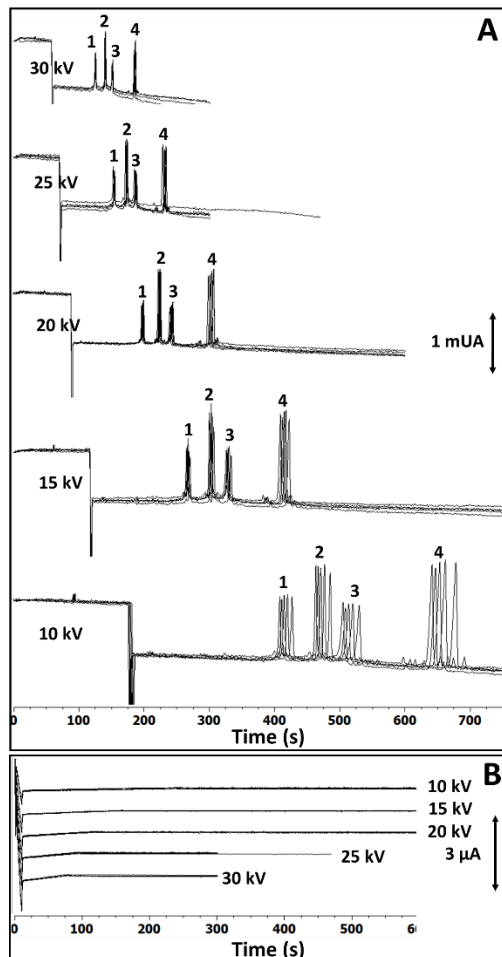


Figure SI1: Electropherograms of the protein test mixture at different applied voltages (as indicated on the graph) on a PB-PMA SMIL coated capillary of 25 μm I.D. (A) and the corresponding current intensities (B). Experimental conditions: Capillary length 40 cm (30 cm to detector) \times 25 μm I.D. Background electrolyte: acetic acid 0.5 M (pH 2.5). Flush before each run: BGE 14.5 psi 3 min. Hydrodynamic injection: 0.8 psi, 8 s. Sample mixture: each Protein at 0.2 gL^{-1} in ultrapure water. Temperature: 25°C. Detection: 214 nm. For the coating procedure, see experimental section II.2. Identification: 1: TI, 2: Myoglobin, 3: RNase A, 4: Lysozyme.

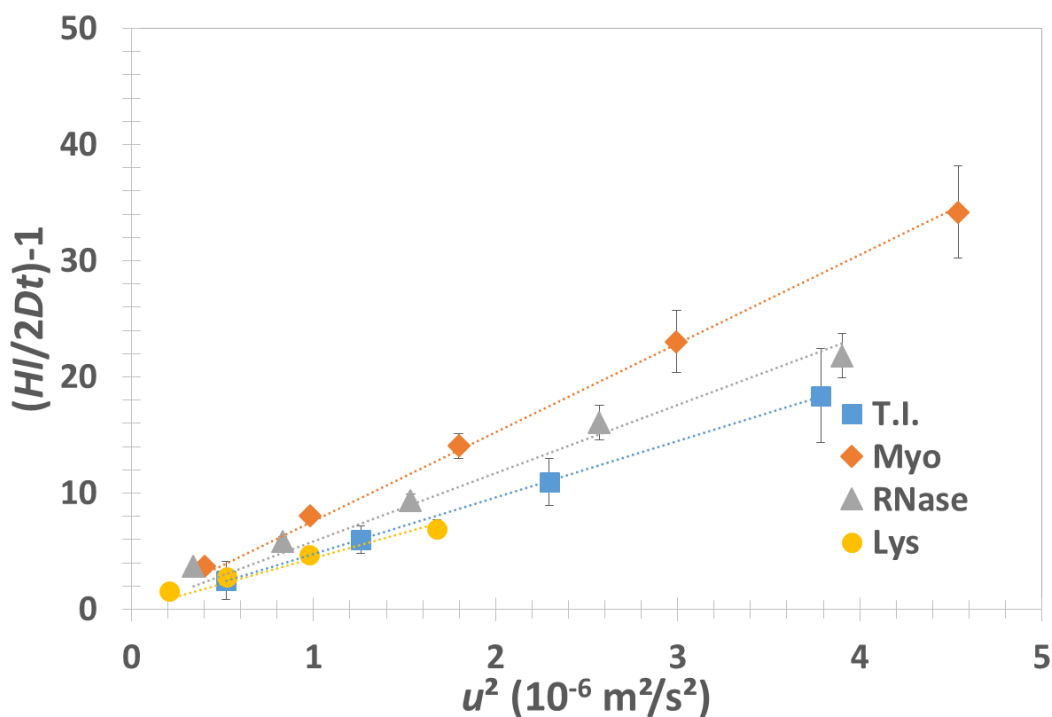


Figure SI2: Representation of $\frac{HI}{2Dt} - 1$ depending on u^2 for the 4 proteins on a PB-PMA SMIL coated capillary of 25 μm I.D. TI (\blacksquare $y = 4.86 u^2 - 0.10$; $R^2 = 0.999$), Myo (\blacklozenge $y = 9.21 u^2 - 2.1$; $R^2 = 0.991$), RNase (\blacktriangle $y = 5.23 u^2 + 1.7$; $R^2 = 0.995$), Lys (\bullet $y = 3.68 u^2 + 0.87$; $R^2 = 0.996$) where u^2 is in $10^{-6} \text{ m}^2\text{s}^{-2}$. Experimental conditions as in Figure SI1.

1.2. 75 μm I.D. PB-PMA SMIL coated capillary

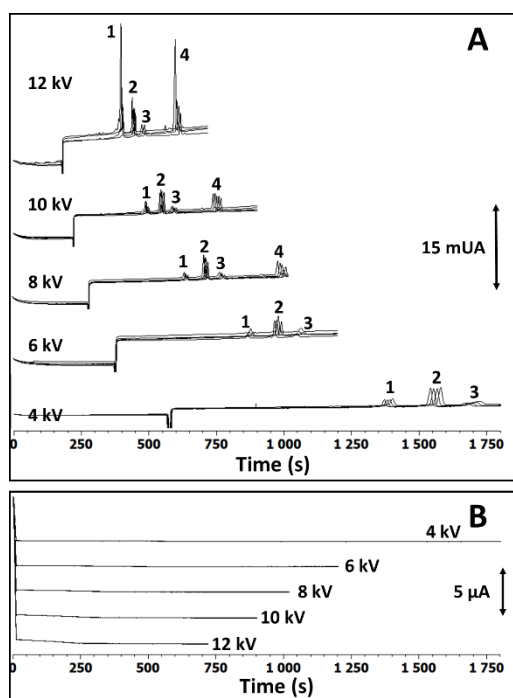


Figure SI3: Electropherograms of the protein test mixture at different applied voltages (as indicated on the graph) on a PB-PMA SMIL coated capillary of 75 μm I.D. (A) and the corresponding current intensities (B). Experimental conditions: Capillary length 40 cm (30 cm to detector) \times 75 μm I.D. Background electrolyte: acetic acid 0.5 M (pH 2.5). Flush before each run: BGE 14.5 psi 3 min. Injection 0.1 psi 7 s. Sample mixture: each protein at 0.2 gL^{-1} in ultrapure water. Temperature: 25°C. Detection: 214 nm. For the coating procedure, see experimental section II.2. Identification: 1: TI, 2: Myoglobin, 3: RNase A, 4: Lysozyme.

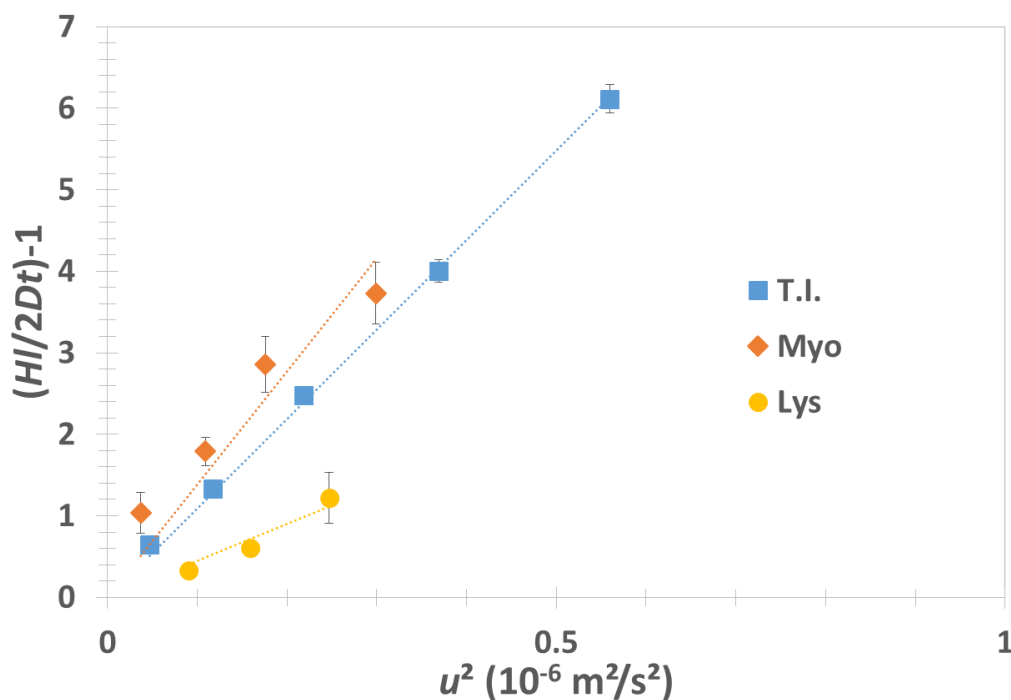


Figure SI4: Representation of $\frac{HI}{2Dt} - 1$ depending on u^2 for the 4 proteins on a PB-PMA SMIL coated capillary of 75 μm I.D. TI (\blacksquare $y = 10.66 u^2 + 0.1$; $R^2 = 0.999$), Myoglobin (\blacklozenge $y = 8.29 u^2 + 1.0$; $R^2 = 0.951$), Lysozyme (\bullet $y = 5.75 u^2 - 0.2$; $R^2 = 0.981$) where u^2 is in $10^{-6} \text{ m}^2\text{s}^{-2}$. Experimental conditions as in Figure SI3.

SI-2. Ohm law study

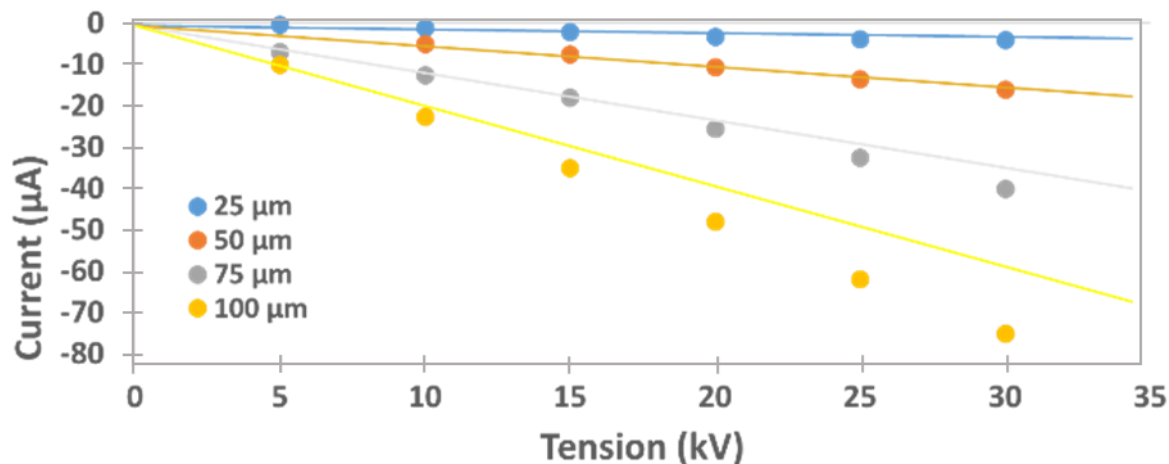


Figure SI 5: Ohm laws for the different capillary I.D.. Experimental conditions: Capillary length 40 cm (30 cm to detector) \times 25, 50, 75 or 100 μm I.D. Background electrolyte: acetic acid 0.5 M (pH 2.5). Temperature: 25°C.

Figure SI 5 shows at which applied voltage Joules effect starts to be non-negligible and the current to voltage relationship is no longer linear. It was possible to work at up to 30 kV without any noticeable Joules effect with 25 and 50 μm I.D. capillaries. In contrast, Joules effect starts between 15 and 20 kV on a 75 μm I.D. capillary which means that it is possible to work with this capillary up to 15 kV. On a 100 μm I.D. capillary, the Joules effect was considered as too high to be used in this study.

SI-3. Study of different capillary lengths on a 50 μm I.D. PB-PMA SMIL coated capillary

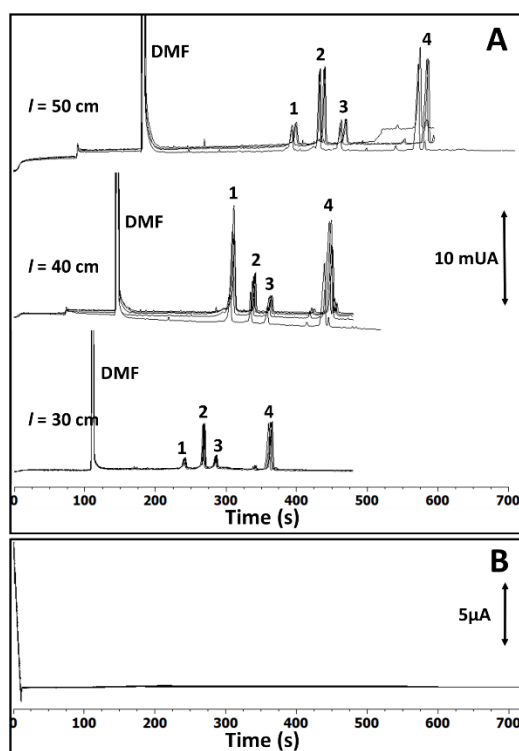


Figure SI6: Electropherograms of the protein test mixture at different capillary lengths (as indicated on the graph) on a 50 μm I.D. PB-PMA SMIL coated capillary (A) and the corresponding current intensities (B). Experimental conditions: Capillary length 60/50/40 cm (50/40/30 cm to detector) \times 50 μm I.D. Background electrolyte: acetic acid 0.5 M (pH 2.5). Injection parameters: 0.4 psi, 6 s ($l = 50$ cm); 0.4 psi, 5 s ($l = 40$ cm) and 0.4 psi, 4 s ($l = 30$ cm). Flush between each run: 22 psi, 3 min ($l = 50$ cm); 18 psi, 3 min ($l = 40$ cm); 14.5 psi, 3 min ($l = 30$ cm). Sample mixture: 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of each protein in ultrapure water. Temperature 25°C. Detection 214 nm. For the coating procedure, see experimental section II.2. Identification: 1: TI, 2: Myoglobin, 3: RNase A, 4: Lysozyme.

SI-4. Study of different capillary coatings

4.1. 50 μm I.D. PB-PLC SMIL capillary coating

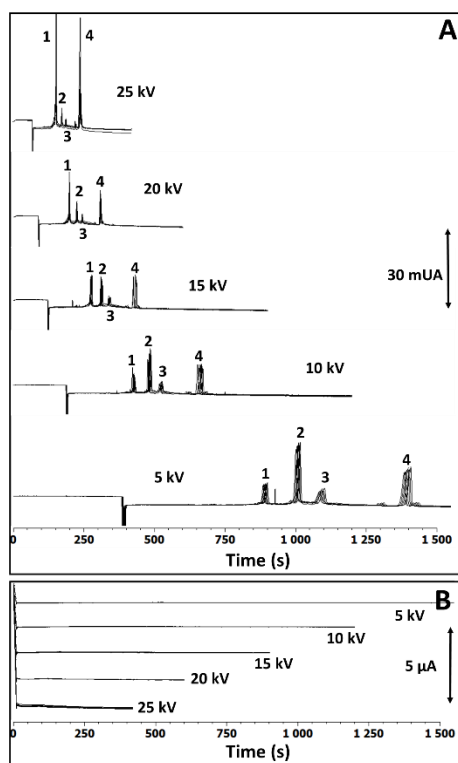


Figure SI 7: Electropherograms of the protein test mixture at different applied voltages (as indicated on the graph) on a PB-PLC SMIL coated capillary of 50 μm I.D. (A) and the corresponding current intensities (B). Experimental conditions: 5-layers PB-PLC SMIL coated capillary, 40 cm total length (30 cm to the detector) \times 50 μm I.D. Background electrolyte: 0.5 M acetic acid, pH 2.5. Flush before each run: BGE 14.5 psi 3 min. Hydrodynamic injection: 0.4 psi, 4 s. Co-injection of 0.1% DMF in ultrapure water: 0.4 psi, 4 s. Sample mixture: each protein at 0.2 gL^{-1} in ultrapure water. Temperature: 25°C. Detection: 214 nm. For the coating procedure, see experimental section II.2. Identification: 1: TI, 2: Myoglobin, 3: RNase A, 4: Lysozyme.

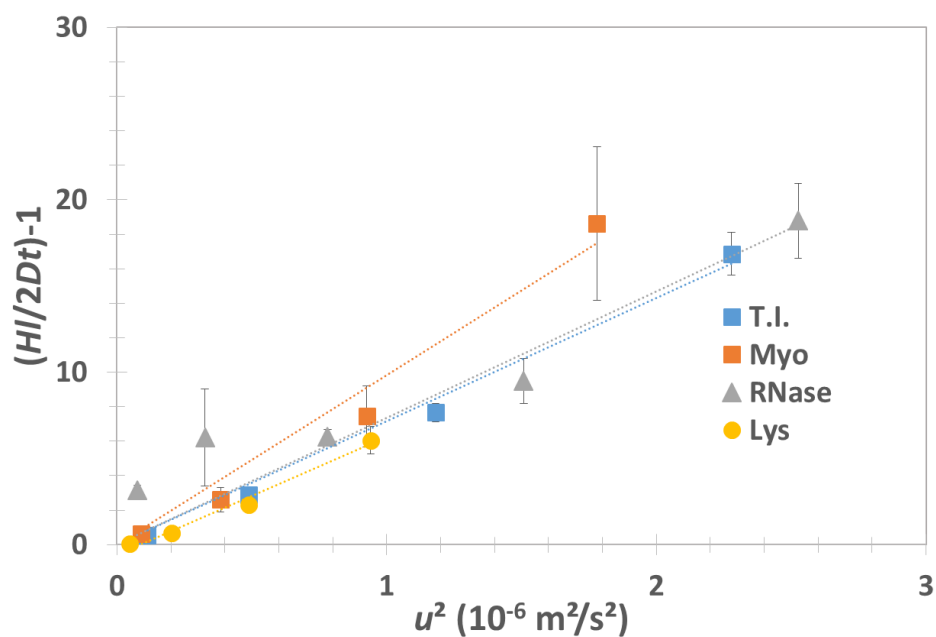


Figure SI8: Representation of $\frac{HI}{2Dt}-1$ depending on u^2 for the 4 proteins on a PB-PLC coated capillary of 50 μm I.D. TI (■ $y = 7.57 u^2 - 0.70$; $R^2 = 0.995$), Myo (◆ $y = 10.75 u^2 - 1.22$; $R^2 = 0.984$), RNase (▲ $y = 5.87 u^2 + 2.65$; $R^2 = 0.935$), Lys (● $y = 6.81 u^2 - 0.58$; $R^2 = 0.985$) where u^2 is in $10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$. Experimental conditions as in Figure SI7.

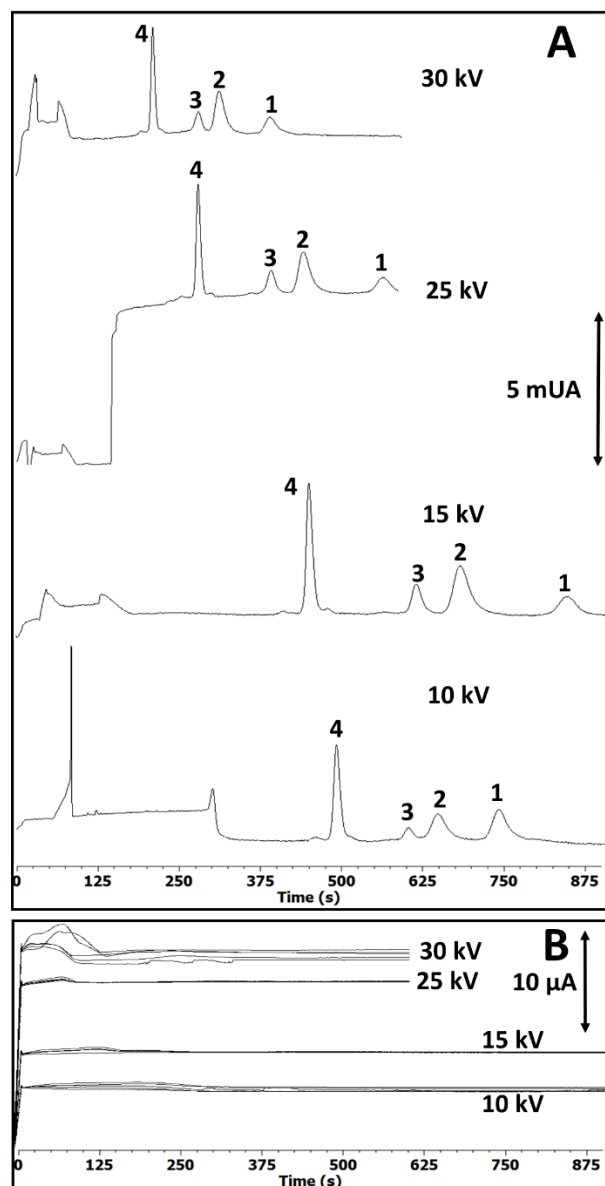
4.2. 50 μm I.D. fused silica capillary


Figure SI 9: Electropherograms of the protein test mixture at different applied voltages (as indicated on the graph) on a fused silica capillary of 50 μm I.D. (A) and the corresponding current intensities (B). Experimental conditions: fused silica capillary, 40 cm total length (30 cm to the detector) \times 50 μm I.D. Background electrolyte: 0.5 M acetic acid, pH 2.5. Flush before each run : HCl 0.1 M 14.5 psi 1 min, then BGE 14.5 psi 3 min. Hydrodynamic injection: 0.4 psi, 4 s. Co-injection of 0.1% DMF in ultrapure water: 0.4 psi, 4 s. Sample mixture: each protein at 0.2 gL^{-1} in ultrapure water. Temperature: 25°C. Detection: 214 nm. For the coating procedure, see experimental section II.2. Identification: 1: TI, 2: Myoglobin, 3: RNase A, 4: Lysozyme.

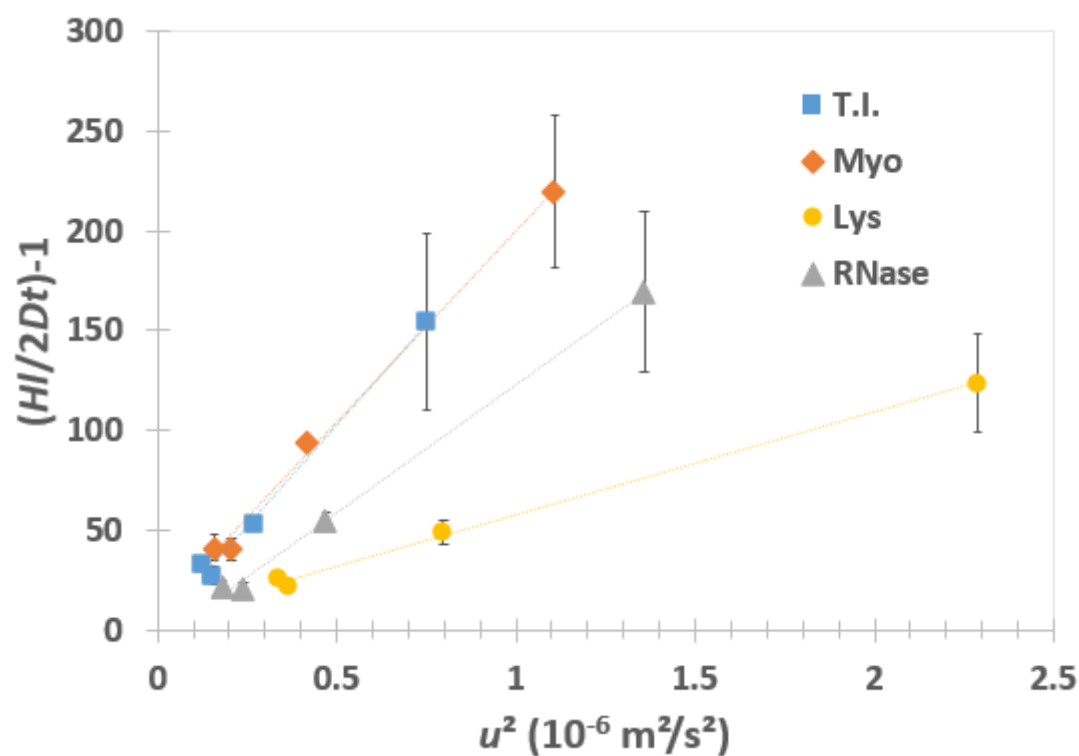


Figure SI10: Representation of $\frac{HI}{2Dt} - 1$ depending on u^2 for the 4 proteins on a fused silica capillary of 50 μm I.D. TI (\blacksquare $y = 203.26 u^2 + 0.70$; $R^2 = 0.9924$), Myo (\blacklozenge $y = 192.42 u^2 + 8.11$; $R^2 = 0.9956$), RNase A (\blacktriangle $y = 128.38 u^2 - 5.43$; $R^2 = 0.9979$), Lys (\bullet $y = 51.435 u^2 + 6.23$; $R^2 = 0.9973$) where u^2 is in $10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}^2$. Experimental conditions as in figure SI9.

SI-5. Optimized separations

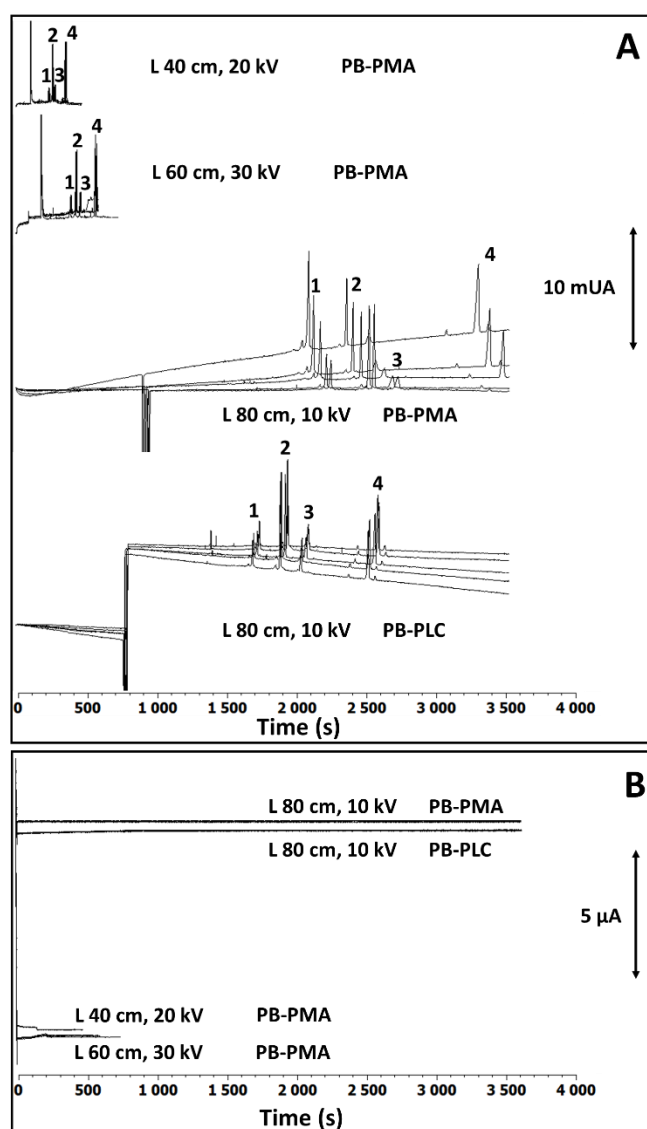


Figure SI11: Electropherograms of the protein test mixture obtained at different applied voltages/capillary lengths (as indicated on the graph) on a PB-PMA or PB-PLC coated capillary of 50 μm I.D. (A) and corresponding current intensities (B). Experimental conditions: Background electrolyte: acetic acid 0.5 M (pH 2.5). Flush before each run: BGE 14.5 psi 3 min. Hydrodynamic injection: 0.4 psi, 8 s ($l = 70$ cm); 0.4 psi, 5 s ($l = 50$ cm) and 0.4 psi, 4 s ($l = 30$ cm). Sample mixture: each protein at 0.2 gL^{-1} in ultrapure water. Injection parameter as specified in Table 1. Temperature: 25°C . Detection: 214 nm. For the coating procedure, see experimental section II.2. Identification: 1: TI, 2: Myoglobin, 3: RNase A, 4: Lysozyme.

Table SI1: A and p values for PB-PMA coated capillaries of different I.D. and for 50 μm I.D. PB-PLC coated capillary.

PB-PMA	PB-PLC	Fused Silica
--------	--------	--------------

	25 μm		50 μm		75 μm		50 μm		50 μm	
	A (10^{-3})	<i>p</i> (10^6)	A (10^{-3})	<i>p</i> (10^6)	A (10^{-3})	<i>p</i> (10^6)	A (10^{-3})	<i>p</i> (10^6)	A (10^{-3})	<i>p</i> (10^6)
TI	32.8	4.9	57.4	11.1	134.6	10.7	84.2	7.6	3.14	203
Myo	53.0	9.2	176.7	11.1	530.0	8.3	181.6	10.8	10.2	192
RNase	34.3	5.2	106.6	6.7	-	-	122.1	5.9	5.6	128
Lys	33.2	3.7	73.2	6.7	191.0	5.8	71.7	6.8	9.57	51

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de cette thèse, différentes méthodes de greffage de capillaire ont été étudiées, afin d'optimiser la séparation de protéines et/ou de peptides par électrophorèse capillaire (CE). La première partie de mes travaux de thèse a permis l'élaboration d'un protocole de greffage original permettant de rendre des capillaires superhydrophobes (SH) ayant des diamètres internes allant de 50 à 180 μm , grâce à l'utilisation d'une solution commerciale de nanoparticules de silice modifiée par des groupements alkyls. La pression d'air appliquée lors de la mise en place du greffage s'est avérée être un paramètre déterminant pour contrôler l'épaisseur, l'homogénéité et la reproductibilité de la couche de greffage. L'épaisseur du revêtement est d'environ 200-300 nm, avec une rugosité de 100 nm et une couche d'air de 100-200 nm lorsque la surface SH est immergée. Le caractère SH des capillaires a été démontré par la forme du ménisque air-eau dans les capillaires, ainsi que par les caractéristiques hydrodynamiques des capillaires greffés : pression minimum limite en-dessous de laquelle l'eau ne rentre pas dans le capillaire et glissement hydrodynamique sous certaines conditions. Ces capillaires ont été employés en CE pour la séparation de peptides en milieu acide, permettant un gain en efficacité d'un facteur 2 par rapport à des capillaires de silice vierge, dans les mêmes conditions expérimentales.

En complément de cette première partie, d'autres revêtements SH ont été testés, réalisés en laboratoire à partir de nanoparticules de silice hydrophobisées (R805), commercialisées sous forme de poudre, seules ou mélangées avec un polymère filmogène (polyacide lactique). L'intérêt était de pouvoir maîtriser la formulation (concentration en nanoparticules, nature du solvant, ratio nanoparticules/polymère). Les résultats se sont avérés prometteurs, mais les capillaires se sont avérés SH que pour de larges diamètres internes (180 μm ou plus).

Dans la deuxième partie de mes travaux de thèse, la possibilité de générer des microbulles d'air en solution aqueuse en utilisant des capillaires SH a été explorée. En utilisant un revêtement de capillaire au Glaco™, et en appliquant un rayonnement UV et une tension électrique, des bulles peuvent être générées dans une électrolyte contenant au moins 0.5% de diméthyl formamide. Ces bulles ont été caractérisées en détail par des mesures électrocinétiques et hydrodynamiques. Elles mesurent ~10 μm de long et 36-39 μm de diamètre, elles ont une charge de surface négative et une mobilité électrophorétique de -49 TU. Le champ électrique appliqué permet de moduler leur vitesse apparente sans modifier leurs dimensions. Ces informations permettent une meilleure compréhension de la nature de l'interface air/eau, et de plus, il est possible

d'utiliser ces bulles pour le transport ou la compartimentation d'organites ou d'objets microniques dans des capillaires, même si le mécanisme exact de la génération de ces bulles n'a pas été éclairci.

La troisième et dernière partie de mes travaux de thèse s'est concentrée sur l'étude de greffages SMIL (multicouches de polyélectrolytes). L'influence des dimensions (longueur et diamètre interne) du capillaire SMIL et de la tension appliquée, a été étudiée pour la séparation électrophorétique d'un mélange de protéines modèles en milieu acide. Le but était de mieux appréhender les phénomènes d'adsorption à la surface du capillaire en mesurant de manière systématique le facteur de rétention (comme on le fait en chromatographie et en utilisant la théorie de l'électrochromatographie). Des lois ont pu être dégagées permettant de définir les meilleures conditions expérimentales possibles pour minimiser l'influence néfaste de l'adsorption sur l'efficacité de la séparation. Plus un capillaire est long et plus la tension appliquée est basse, plus l'efficacité de séparation est importante. La seule limitation est le temps d'analyse qui croît proportionnellement avec l'augmentation de la longueur et avec la diminution de la tension appliquée. Le diamètre interne du capillaire a une double influence, puisque son augmentation diminue certes l'adsorption (facteur de rétention), mais augmente la résistance au transfert de matière. Avec une tension appliquée de 10 kV (champ électrique de $12,5 \text{ V.m}^{-1}$), le capillaire de 80 cm de longueur totale permet d'atteindre des efficacités allant jusqu'à $600\,000 \text{ plates.m}^{-1}$ pour des analyses durant 40 min. De plus, le diamètre interne de 50 μm rend le capillaire compatible avec la MS. En optimisant davantage les paramètres opératoires (notamment la température), il est envisageable d'atteindre le million de plateaux par mètre. Le calcul du facteur de rétention a permis également de comparer deux greffages SMIL différents (PB-PMA et PB-PLC) et de déterminer celui limitant le plus l'adsorption (PB-PLC présente des facteurs de rétention jusqu'à 30% inférieur à celui de PB-PMA pour la même protéine). Bien que les facteurs de rétention soient très faibles (typiquement entre 0.05 et 0.25), il est clair qu'il subsiste de l'adsorption à la surface des capillaires même avec l'utilisation de greffages SMIL. Mais cette méthode de comparaison des adsorptions résiduelles de différents greffages permet de déterminer quel capillaire présente le moins d'adsorption.

En ce qui concerne l'utilisation des revêtements SH en CE, la robustesse du greffage doit être améliorée. En effet, les deux difficultés auxquelles nous avons été confrontés au cours de cette

étude sont : la faible durabilité du revêtement et la présence de microbulles dans le capillaire lors de son remplissage.

Nouvelles approches pour la quantification et la réduction de l'adsorption de biomolécules en électrophorèse capillaire : capillaires superhydrophobes et multicouches de polyélectrolytes

L'objectif de cette thèse est d'étudier différentes approches pour la modification de la paroi interne des capillaires en électrophorèse capillaire pour améliorer les efficacités de séparation de biomolécules (peptides et/ou protéines modèles) en milieu acide. Le premier chapitre (hors étude bibliographique) est consacré à l'étude des revêtements superhydrophobes, dans le but d'empêcher l'adsorption des analytes en supprimant toute interaction entre la paroi superhydrophobe et les analytes (absence de mouillage). Un protocole de greffage original a été développé pour obtenir des capillaires superhydrophobes en étudiant l'influence du nombre de couches déposées, la nature du revêtement, et les pressions de remplissage et de rinçage du capillaire lors du dépôt des couches. Des capillaires superhydrophobes ont pu être obtenus, pour la première fois, avec des diamètres internes allant de 50 μm à 180 μm . Les caractéristiques hydrodynamiques et électrocinétiques de ces capillaires ont été étudiées, donnant une longueur de glissement de 23 μm et des efficacités de séparation électrophorétique 2 fois supérieures à celles obtenues sur un capillaire de silice vierge dans les mêmes conditions électrophorétiques. Le second chapitre étudie la génération de microbulles d'air dans des capillaires superhydrophobes. Les paramètres expérimentaux (tension, rayonnement UV, marqueur, revêtement superhydrophobe) nécessaires à l'obtention de ces microbulles ont été identifiés. Ces bulles ont été caractérisées (diamètre $\sim 35\text{-}39 \mu\text{m}$; longueur $\sim 10 \text{ mm}$; potentiel zeta $\sim -62.6 \text{ mV}$). Le troisième chapitre propose une méthodologie expérimentale, basée sur la théorie de l'électrochromatographie, permettant d'évaluer l'adsorption résiduelle de protéines sur la paroi des capillaires. Cette nouvelle approche présente deux intérêts : (i) pouvoir comparer les performances séparatives sur différents greffages via l'adsorption résiduelle, et (ii) optimiser les paramètres expérimentaux (longueur, diamètre interne, tension appliquée) afin de minimiser l'impact de l'adsorption sur les efficacités de séparation.

New approaches for the quantification and reduction of biomolecules adsorption in capillary electrophoresis : superhydrophobic capillaries and polyelectrolyte multilayer coatings

The main objective of this thesis is to study different approaches for the modification of the capillary wall to enhance separation efficiency for the capillary electrophoresis of biomolecules (model peptides and/or proteins) in acidic conditions. The first chapter (after the bibliographic study) is dedicated to superhydrophobic coatings. The goal of this study is to prevent analytes adsorption by suppressing interactions between the superhydrophobic wall and the analytes (non-wettability). An original coating protocol has been developed to obtain superhydrophobic capillaries by studying the influence of the number of deposited layers, coating nature, and the flushing pressure during layers deposition. Superhydrophobic coatings have been obtained, for the first time, in capillaries of internal diameters from 50 μm to 180 μm . Hydrodynamic and electrokinetic characteristics have been studied, giving slipping length of 23 μm and increased of separation efficiency compared to fused silica capillary in the same electrophoretic conditions. The second chapter studies the generation of air microbubbles in superhydrophobic capillaries. The experimental parameters (voltage, UV radiation, marker, superhydrophobic coating) required to obtain those bubbles have been identified. The microbubbles have been characterized (diameter $\sim 35\text{-}39 \mu\text{m}$; length $\sim 10 \text{ mm}$; zeta potential $\sim -62.6 \text{ mV}$). The third chapter offers an experimental methodology, based on the electrochromatography theory, allowing to evaluate the residual adsorption of proteins on the capillary wall. This approach has two benefits: (i) the comparison of separation performances of different coatings via the quantification of residual adsorption, and (ii) the optimization of the experimental parameters (length, internal diameter, applied voltage) to minimize the impact of adsorption on the separation efficiencies.