

Mobilité ionique-Spectrométrie de masse & Caractérisation de macromolécules

Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de masse

Hameau de l'étoile

29 Mars 2018

Pr Christine Enjalbal

Université de Montpellier (UM)_Directrice Laboratoire de Mesures Physiques

Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM)_Responsable Equipe Sciences Analytiques



❖ Quelques pionniers

Mike T. Bowers

University of California Santa Barbara
<http://bowers.chem.ucsb.edu/>



Martin F. Jarrold

University of Indiana
<http://nano.chem.indiana.edu/>



David E. Clemmer

University of Indiana
<http://www.indiana.edu/~clemmer/>



David H. Russel

Texas A&M University
<http://www.chem.tamu.edu/rgroup/russell/>



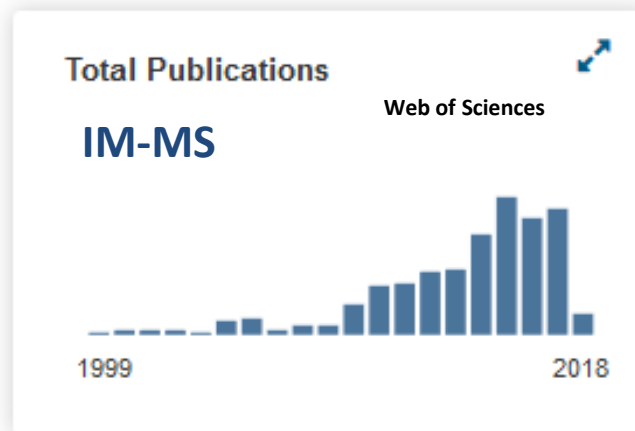
Richard D. Smith

Pacific Northwest National Laboratory
http://www.pnl.gov/biology/staff/staff_info.asp?staff_num=5832



Et aussi P. Barran, C.V. Robinson, M.M. Kappes, E. Leize , P. Dugourd,

❖ Un nombre croissant de publications



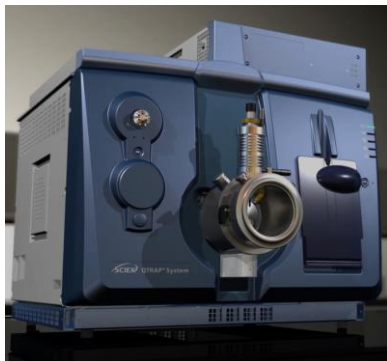
1. Liu, Y., Valentine, S. J., Counterman, A. E., Hoaglund, C. S., Clemmer, D. E., **Injected-Ion mobility analysis of Biomolecules.** *Anal. Chem. News Features* **1997**, 728A-735A.
2. Gidden, J., Bowers, M. T., **Gas-phase conformation and energetic properties of deprotonated nucleotides.** *Eur. Phys. J. D* **2002**, 20, 409-419.
3. Clowers, B. H., Hill, H. H. **Mass analysis of mobility-selected ion populations using dual gate, Ion mobility, Quadrupole ion trap mass spectrometry.** *Anal. Chem.* **2005**, 77, 5877-5885.
4. McLean J. A, Ruotulo, B. T., Gillig, K. J., Russell, D. H., **Ion mobility-mass spectrometry: a new paradigm for proteomics.** *Int. J. Mass Spectrom.*, **2005**, 240, 301-315.
5. Dwivedi, P., Bendiak, B., Clowers, B. H., Hill, H. H. **Rapid resolution of carbohydrate isomers by Electrospray Ionization ambient Pressure Ion mobility Spectrometry Time-of-flight mass spectrometry.** *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, 18, 1163-1175.
6. Trimpin, S.; Clemmer, D. E., **Ion mobility spectrometry/Mass spectrometry snapshots for assessing the molecular compositions of complex polymeric systems.** *Anal. Chem.* **2008**, 80, 9073-9083.
7. Ruotolo, B. T., Benesch, J. L. P., Sandercock, A. M., Hyung, S-J., Robinson, C. V., **Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes,** *Nature Protocols*, **2008**, 3, 1139-1152.
8. Bleiholder, C., Dupuis, N. F., Wyttenbach, T., Bowers, M. T., **Ion mobility-mass spectrometry reveals conformational conversion from random assembly β -sheet in amyloid fibril formation.** *Nature. Chem.* **2011**, 3, 172-177.
9. Wyttenbach, T., Pierson, N. A., Clemmer, D. E., Bowers, M. T., **Ion mobility analysis of molecular dynamics.** *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2014**, 65, 175-196.
10. Hoffmann, W., Von Helden G., Pagel, K., **Ion mobility-mass spectrometry and orthogonal gas-phase techniques to study amyloid formation and inhibition.** *Curr. Op. Struc. Biol.*, 2017, 46, 7-15.

Books & Reviews

1. **Ion Mobility Spectrometry-Mass spectrometry: Theory and Applications**, C. L. Wilkins & S. Trimpin Eds, CRC Press **2011**.
2. Kanu, A. B., Dwivedi, P., Tam, M., Matz, L., Hill, H. H. **Ion mobility-mass spectrometry.** *J. Mass Spectrom.*, **2008**, 43, 1-22.
3. Uetrecht C., Rose, R. J., van Duijn, E., Lorenzen K., Heck A. J. R., **Ion mobility mass spectrometry of proteins and proteins assembly.** *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1633-1655.
4. Laphorn, C., Pullen, F., Chowdhry, B. Z., **Ion mobility spectrometry-mass spectrometry of small molecules: separating and assigning structures of ions.** *Mass Spectrom. Rev.*, **2012**, 1439, 3-25.
5. Ewing, M. A., Glover, M. S., Clemmer, D. E., **Hybrid Ion mobility and mass spectrometry as a separation tool.** *J. Chrom. A*, **2016**, 1439, 3-25.

❖ Appareillages commerciaux

Constructeur	Type IM	Année
Excellims	DT-IMS	
Tofwerk	DT-IMS	
Waters	TWIMS	2006
Thermo	FAIMS	2011
Owlstone Nanotech	FAIMS	
ABSciex SelexION	DMS	2011
Sionex	DMS	
Agilent	DT-IMS	2014
Bruker	TIMS	2016



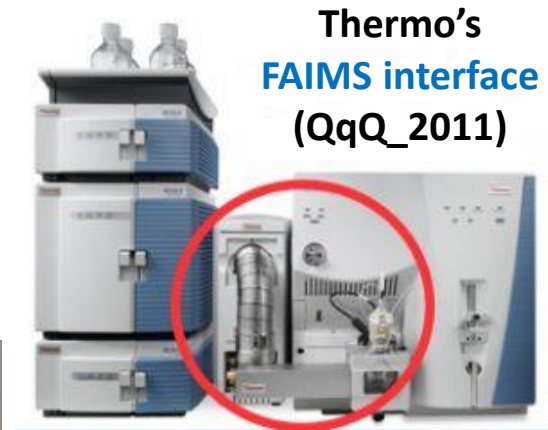
Sciex's **SelexION™**
(QqQ, Q-IT_2011)



Waters's **Synapt G2S™**
(Tof_G2_2009 /G2S_2011)



Bruker's **timsTOF™**
(Tof_2016)



Thermo's
FAIMS interface
(QqQ_2011)

❖ IMS (Ion Mobility Spectrometry)

✓ *Technologie ancienne:*

⇒ Ions soumis à un champ électrique dans un courant de gaz contraire → Déplacement freiné !



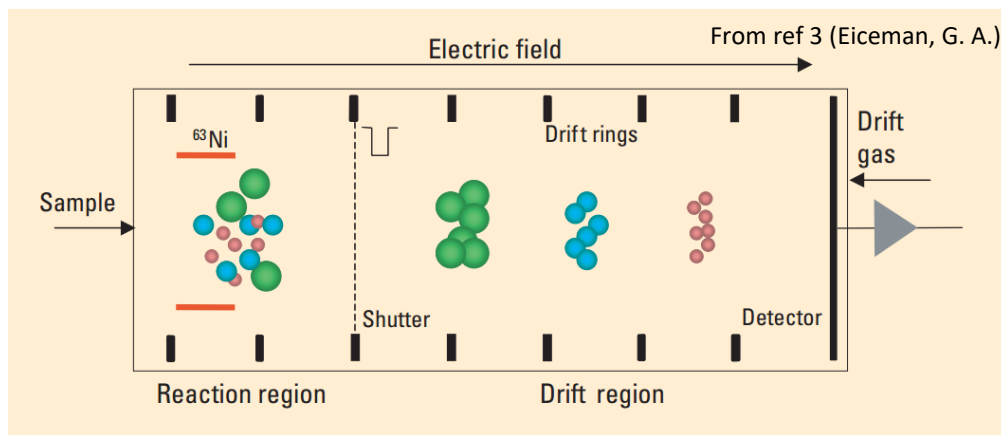
"STRONG WIND TODAY?"



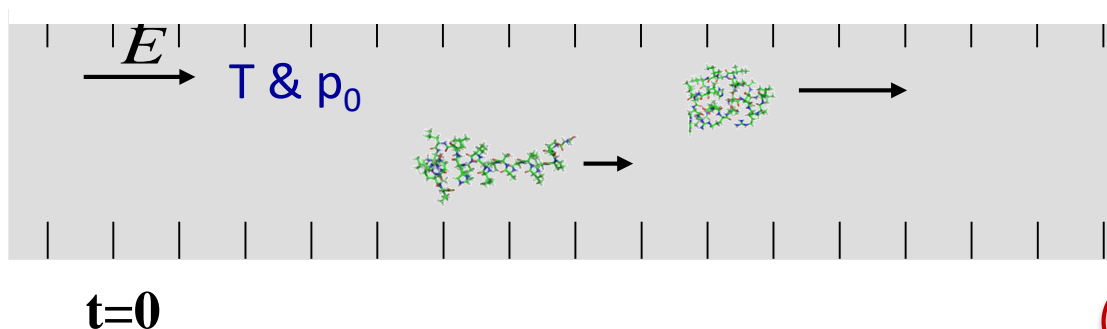
- ⇒ 2 forces opposées (accélération et frictions) !
- ⇒ Séparation selon la charge (E) et des interactions avec le gaz (taille/forme & masse de l'ion)
- ⇒ Pour un **contrôle précis des temps arrivées des ions**

✓ *Mesure du temps de dérive :*

Formation d'ions → Tube de dérive (Drift tube) → Détecteur → Spectre de mobilité



Ions soumis à un champ électrique faible dans un courant de gaz (T & P)



Temps de dérive
(Drift Time : t_D)
/
Mesure des
Distributions
des Temps d'Arrivée
des ions (ATD)

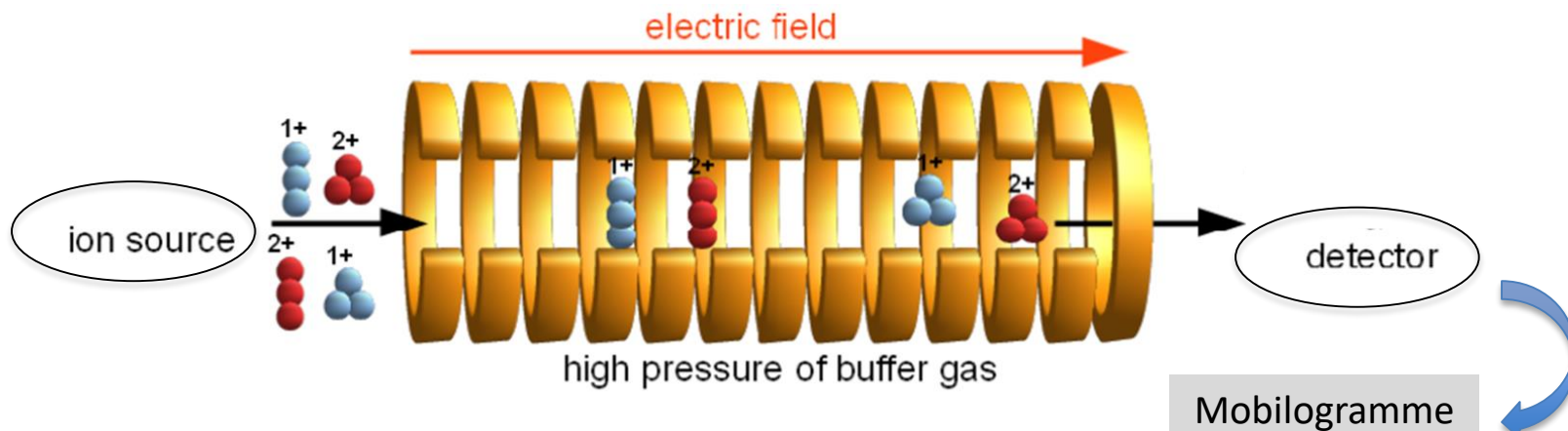


1. Langevin P. **Une formule fondamentale de théorie cinétique.** *Ann. Chim. Phys.*, **1905**, 5:245.
2. Powell, C. F., Brata, L., **Mobility of alkali ions in gases,** *Proc. Roy. Soc.*, **1932**, A138, 117-132.
3. Borsdorf, H.; Eiceman, G. A. **Ion Mobility Spectrometry: Principles and Applications.** *Applied Spectroscopy Reviews* **2006**, 41 (4), 323-375.

✓ Analyse en phase gazeuse:

⇒ Séparation selon la vitesse des ions

⇒ Séparation selon la charge et selon la taille/forme (structure 3 D) & masse des ions



$$\frac{E}{N} \leq 2.10^{-17} \text{ C.cm}^2$$

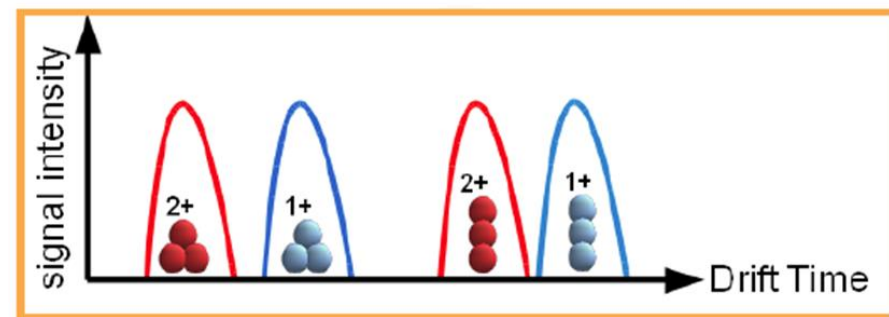


Champ électrique faible

Frictions/collisions avec gaz de dérive (He, N₂, ...)

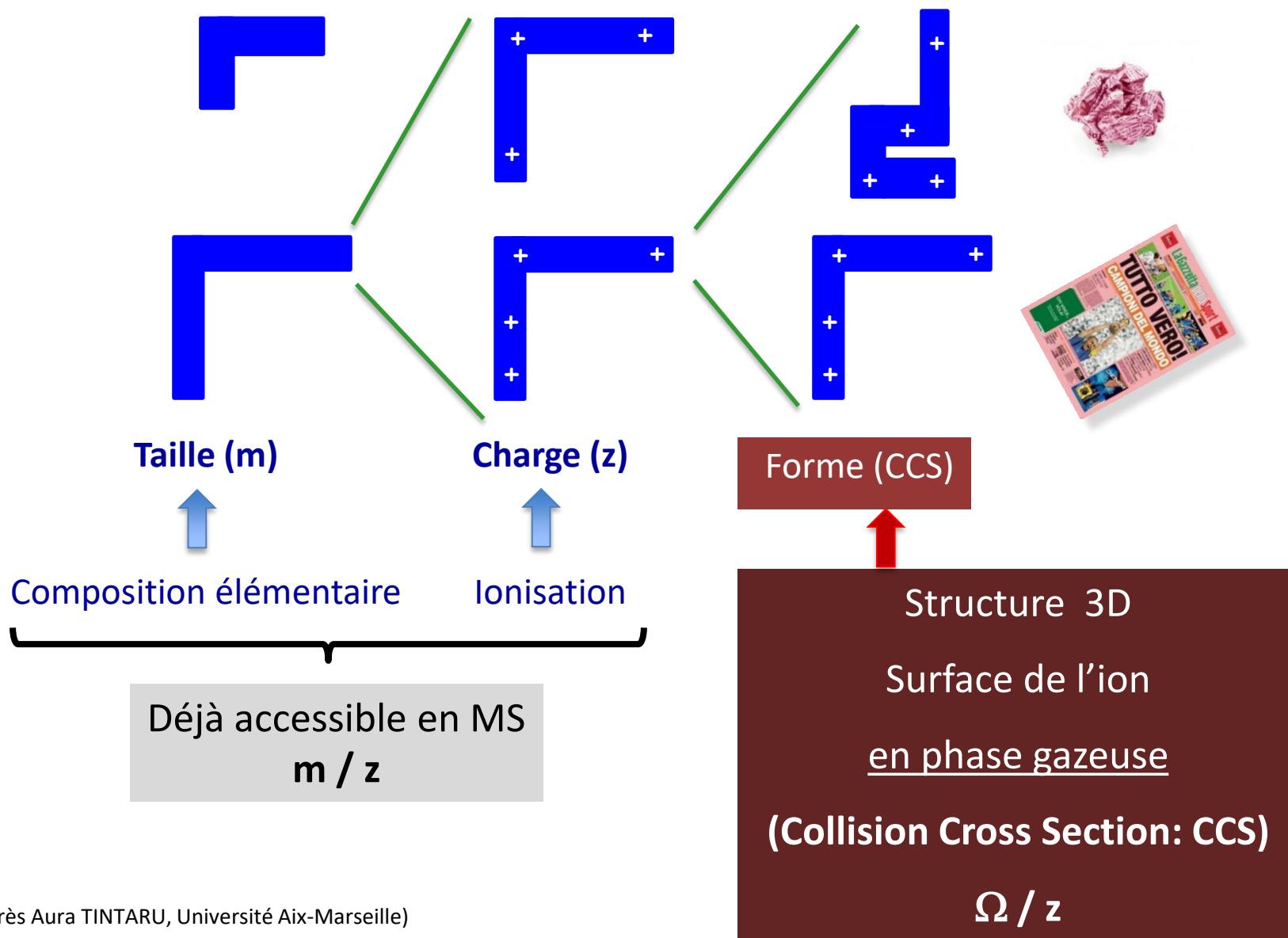


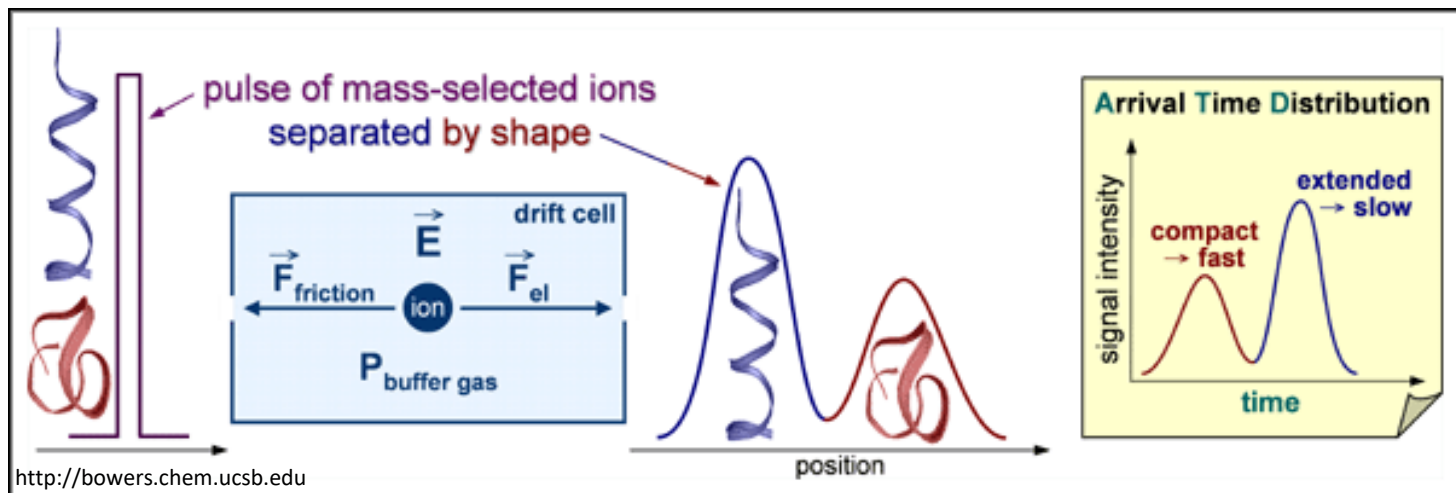
Régime de diffusion (Energie_{Collisions} > Energie_E)



In case of low electric field :
thermal energy supplied from collisions >
energy the ions obtained from the electric field
→ diffusion processes are dominant

⇒ Séparation selon 3 paramètres : $Dt = f(\text{Taille, forme et charge des ions})$



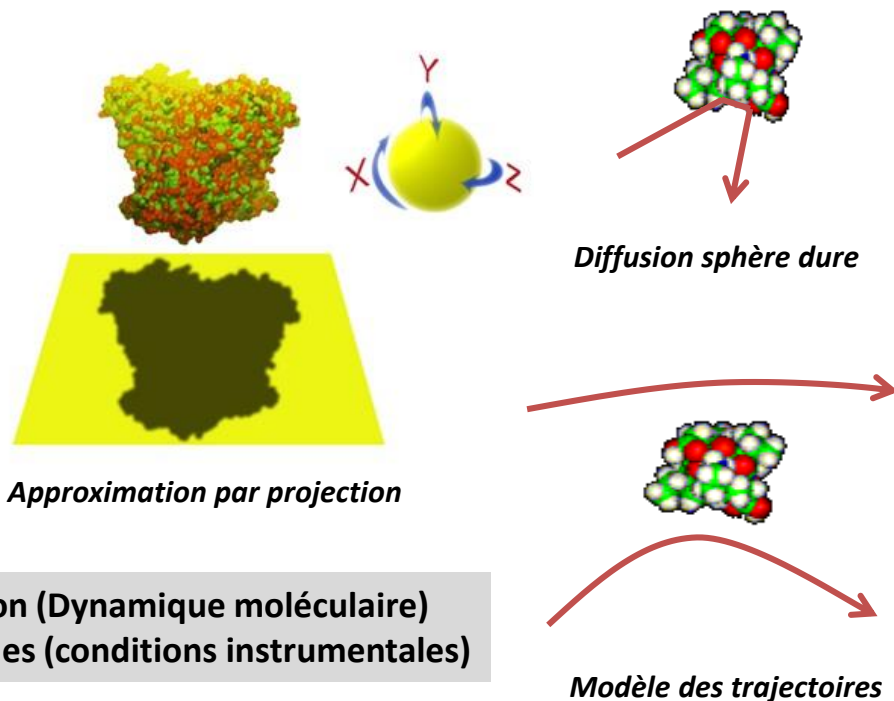


Valeur de CCS dépend de la structure 3D de l'ion
mais aussi de la nature du gaz de dérive



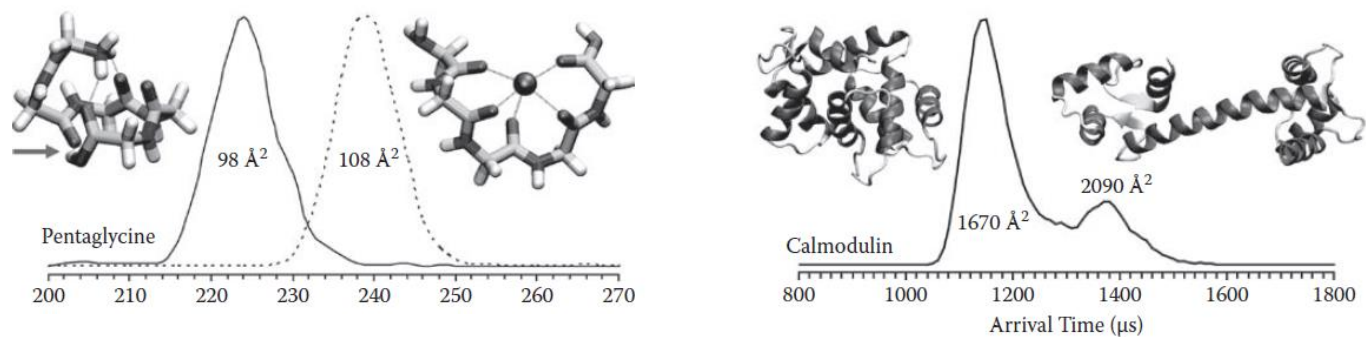
Ion sphérique idéal → Structure réelle

$$CCS : \Omega = \pi d^2$$



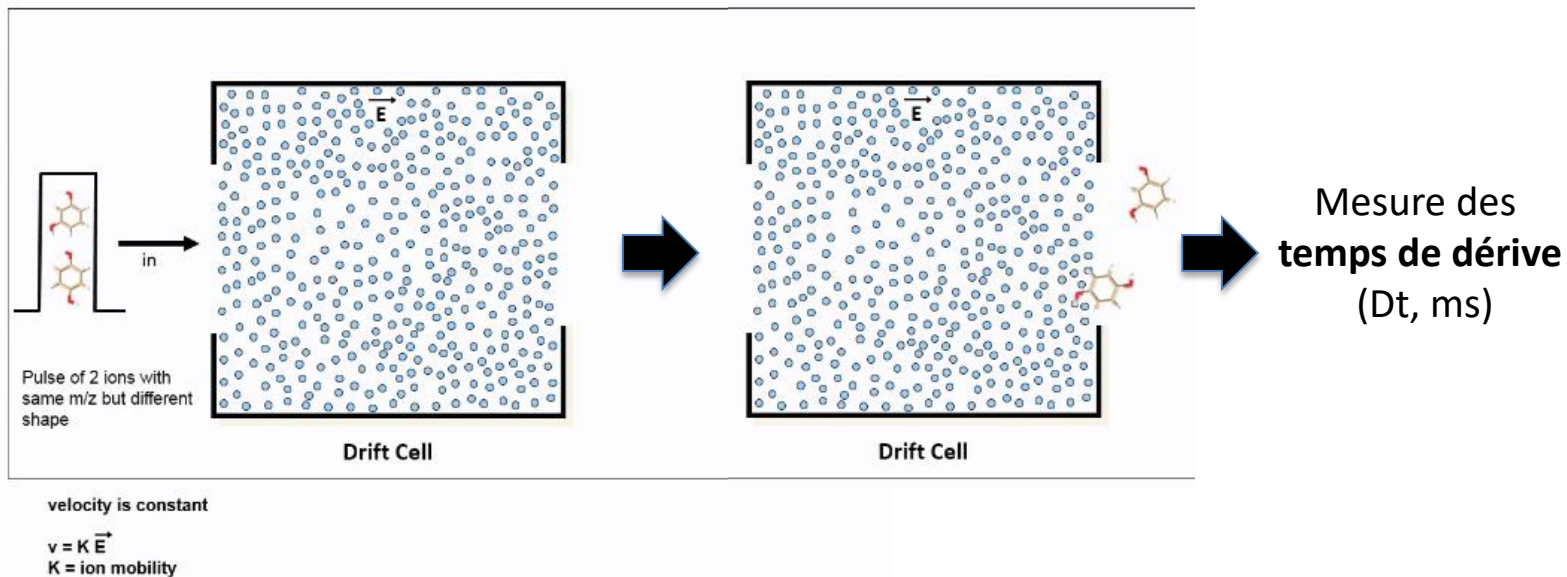
Calcul / Modélisation (Dynamique moléculaire)
Mesures expérimentales (conditions instrumentales)

Exemple de séparation de macromolécules selon la taille/forme



Autre exemple: Utrecht C., Rose, R. J., van Duijn, E., Lorenzen K., Heck A. J. R., *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1633-1655.

Exemple de séparation d'isomères selon leur taille/forme



✓ *Points forts:*

- ⇒ Technique séparative sans solvant (**gaz**)
- ⇒ Séparation des ions très rapide (**millisecondes**)
- ⇒ Mobilité ionique plus rapide que la chromatographie en phase gazeuse (**secondes**)
- ⇒ Limite de détection très basse (**nanogrammes**)
- ⇒ Equipement simple et robuste
- ⇒ **Miniaturisation / Appareillage portable / Mesures sur le terrain**

Applications principales:
Détection d'agents de guerres chimiques
& d'explosifs
(Contrôles aéroport / Défense)

From ref 1 (Eiceman, G. A.)



FIGURE 3. IMS on the ground.

(a) The CAM is a handheld analyzer for screening surfaces for nerve and blister agents. (b) The GID-3 monitors for chemical weapons in ambient air. The LCD (p 390 A) is an ion mobility spectrometer with a miniaturized drift tube and corona discharge ion source. Photos courtesy of Smiths Detection.

1. Eiceman, G. A., Stone, J. A. **Ion mobility spectrometers in national defense.** *Anal. Chem.* **2004**, 76(21), 390A-397A.
2. Zolotov YA. **Ion mobility spectrometry.** *J. Anal. Chem.* **2006**, 61, 519.
3. Armenta, S.; Alcalá, M.; Blanco, M. **A review of recent, unconventional applications of ion mobility spectrometry,** *Analytica Chimica Acta*, **2011**, 703, 114-123.

✓ *Technologie 'post-ionisation':*

- ⇒ Compatible avec la spectrométrie de masse (ions, charge, masse) → IM-MS
- ⇒ Insertion du tube de dérive entre la source d'ionisation et l'analyseur de masse
- ⇒ Compatible avec diverses sources (API et MALDI)
- ⇒ Compatible avec divers analyseurs de masse (B*, Tof, Q, linear IT, ICR)
- ⇒ Couplage LC-IM-MS/MS

✓ *IM = Nouvelle dimension pour la MS :*

⇒ MS → Identification/Caractérisation structurale

- Masse moléculaire (Mesure m/z)
- Formule élémentaire (Haute Résolution)
- Connectivité atomique (MS/MS)

⇒ IM → Technique séparative en phase gazeuse

- Pré-filtrage les ions avant MS
- Tri selon ATD (Mesure d'un temps de dérive Dt)
- Structure 3D (Détermination CCS)

** Ion mobility spectrometry was first hyphenated to a mass spectrometer by Barnes, Martin, and McDaniel (1961) using a magnetic sector mass spectrometer.*

❖ IM-MS (Ion Mobility-Mass Spectrometry)

✓ *Techniques IM utilisées en couplage avec la MS :*

⇒ Techniques dispersives

- **IMS** (Agilent)
- **TWIM** (Waters)
- **TIMS** (Bruker)

⇒ Techniques sélectives

- **DMS/FAIMS** (AB Sciex, Thermo)
- DMA
- Overtone IM
- Circular IM
- Transversal modulation IM

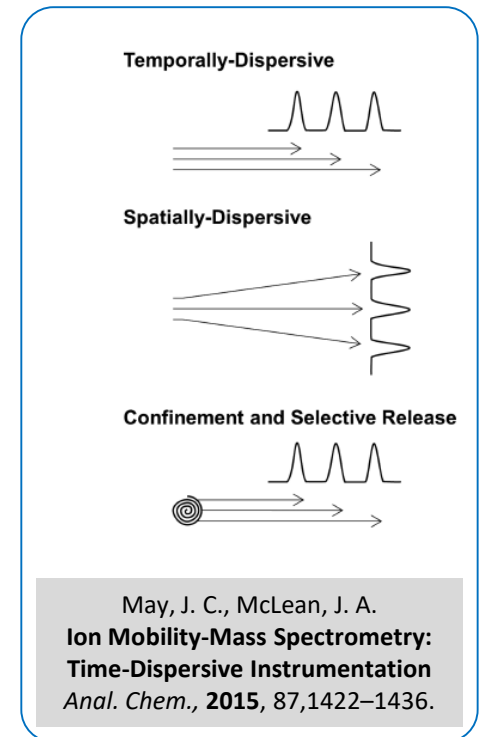
✓ *Diverses géométries de couplage IM-MS :*

⇒ le type de technologie de mobilité ionique

- **Courant électrique** (continu / alternatif / oscillant)
- **Pression**, Température et longueur du tube de dérive

⇒ selon le type de source d'ionisation :

- **faisceau d'ions pulsé** (IMS/TWIM/TIMS couplé avec ToF) (Waters, Bruker)
- **faisceau d'ions continu** (DMS/FAIMS couplé avec Q/IT/ICR/...) (AB Sciex, Thermo)



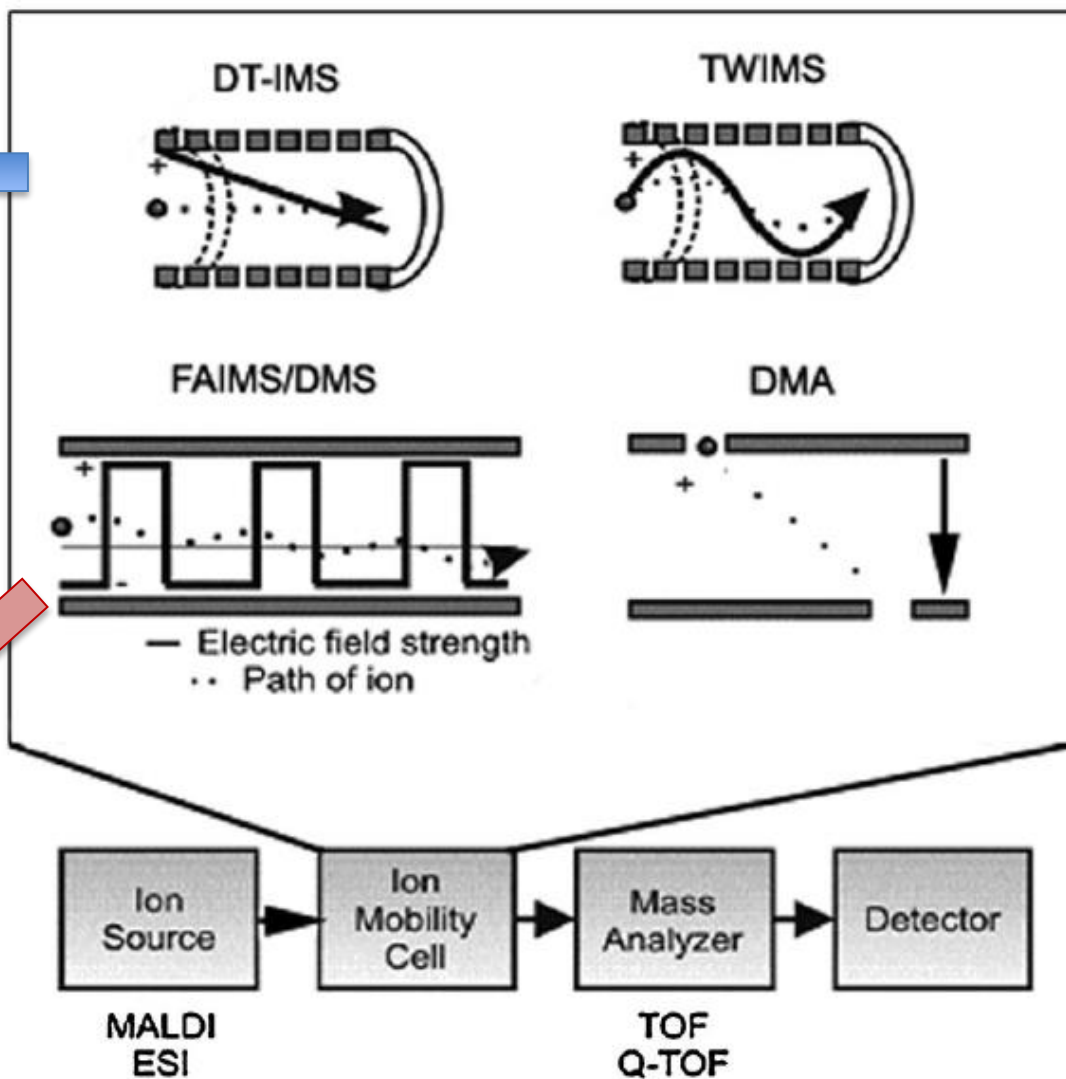
❖ Configurations IM-MS types

DTIMS se réfère à:

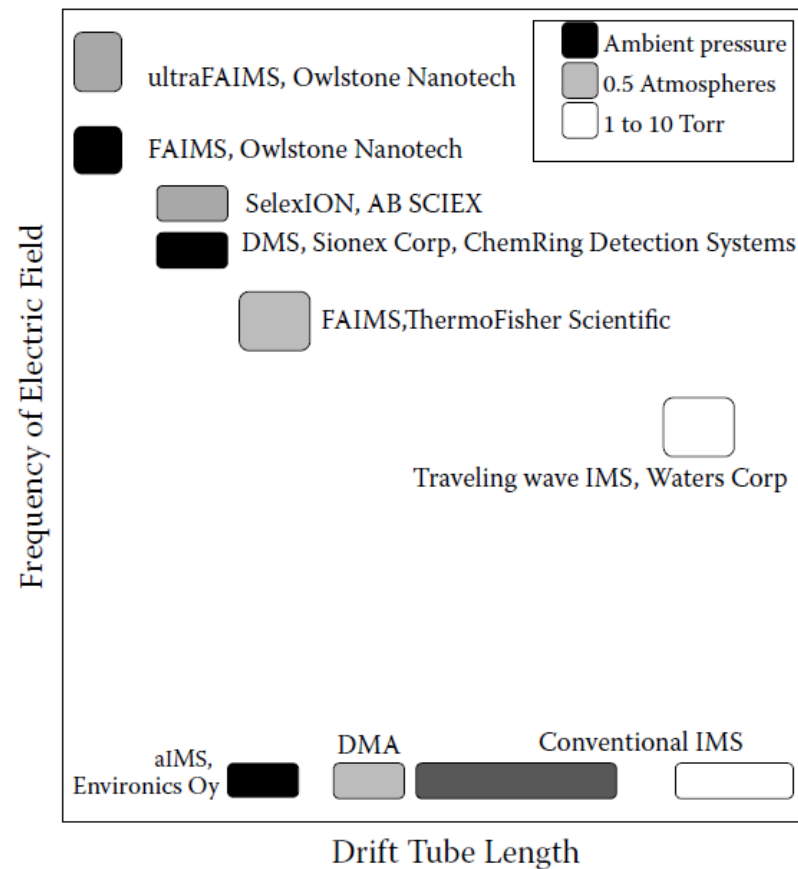
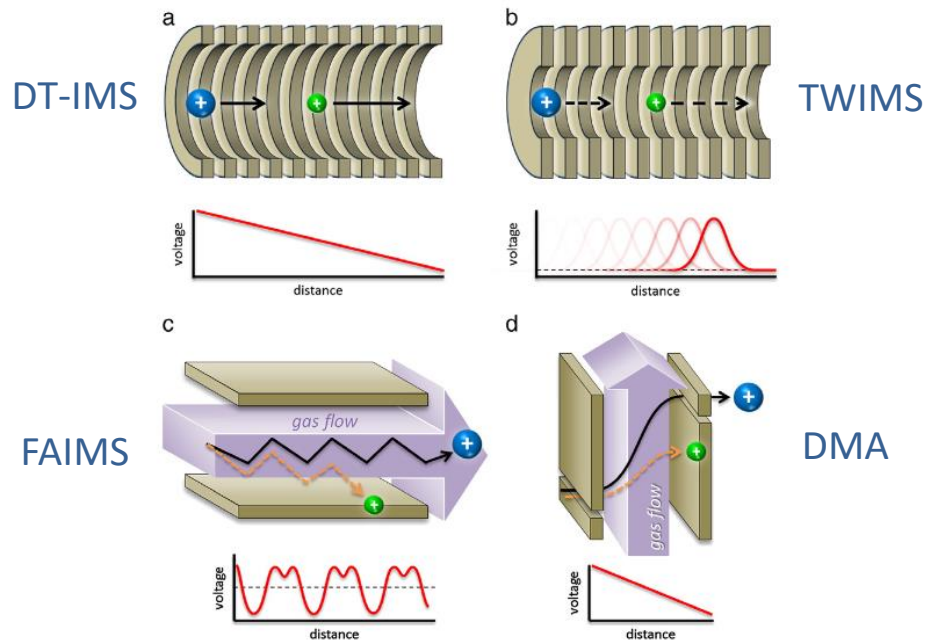
- classical IMS,
- conventional IMS,
- standard IMS,
- DT-IMS,
- TOF IMS,
- traditional IMS,
- plasma chromatography,
- ion chromatography.

DMS comprend

- high-FAIMS,
- field ion spectrometry,
- ion mobility spectroscopy.



Ne pas confondre les sigles / abréviations
(plusieurs appellations pour la même technologie !!!)



Kliman, M., May, J. C., McLean, J. A., **Lipid analysis and lipidomics by structurally selective ion mobility-mass spectrometry.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1811, 935-945.

&

Laphorn, C., Pullen, F., Chowdhry, B. Z., **Ion mobility spectrometry-mass spectrometry of small molecules: separating and assigning structures of ions.** *Mass Spectrom. Rev.*, 2012, 1439, 3-25

Type of IMS system	Pressure regime	Typical operating pressure	References
Ambient DT-IMS	Ambient pressure	1000 mbar	Kanu et al., 2008
Reduced pressure DT-IMS	Reduced pressure	10 ⁻⁵ to 1.3 mbar	Ruotolo et al., 2002b, Valentine et al., 2001
FAIMS or DMS	Ambient pressure->ambient pressure	400 to 1571 mbar	Kolakowski & Mester, 2007
Travelling wave IMS	Reduced pressure	0.5 mbar (Waters Synapt G1) to >3 mbar (Waters Synapt G2)	Giles, Williams & Campuzano, 2011
Differential mobility analysis	Ambient pressure	1013 mbar	

✓ *Deux types d'application:*

⇒ Séparation en forme/charge → Dimension analytique supplémentaire

- **Pré-séparation rapide des ions avant l'analyseur de masse** (Modes 'filtre d'ions' ou 'Full scan', IM dispersive/sélective) → Analyse plus sensible qui augmente la capacité de détection

- **Informations Forme et Masse complémentaires**

→ Analyse bidimensionnelle qui augmente la capacité analytique (*mais pas totalement orthogonale car IM et MS liées par la taille*)

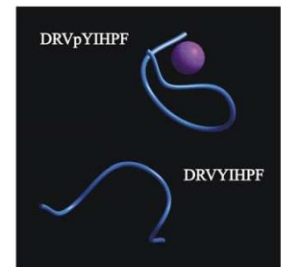
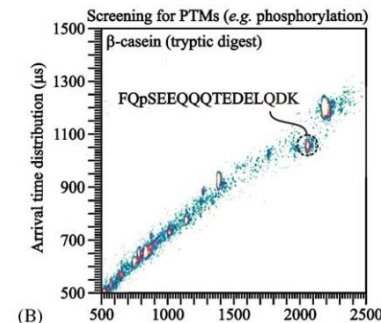
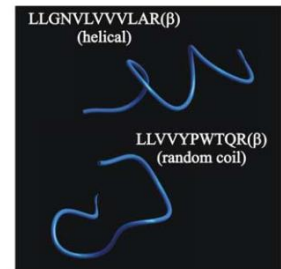
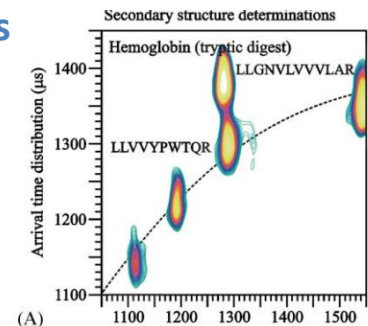
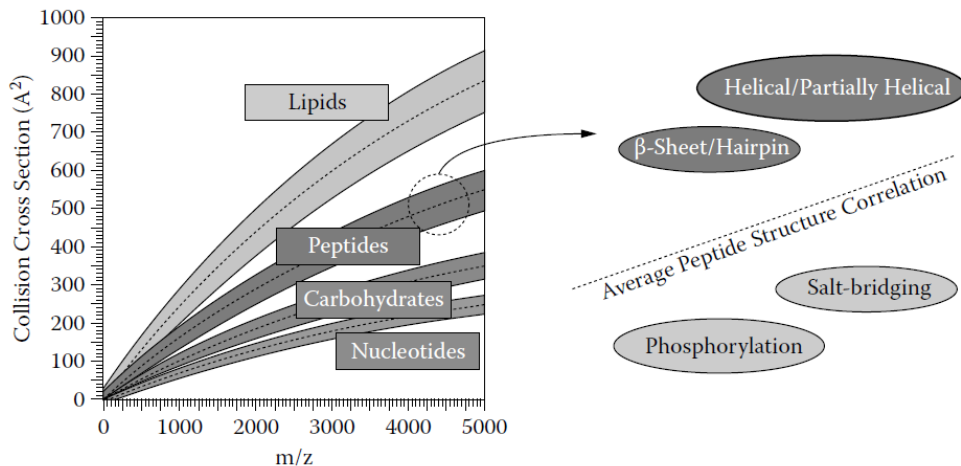
- **2 paramètres mesurés (Dt & m/z)** dans des conditions expérimentales contrôlées

→ Identification par comparaison avec des **Bases de données**

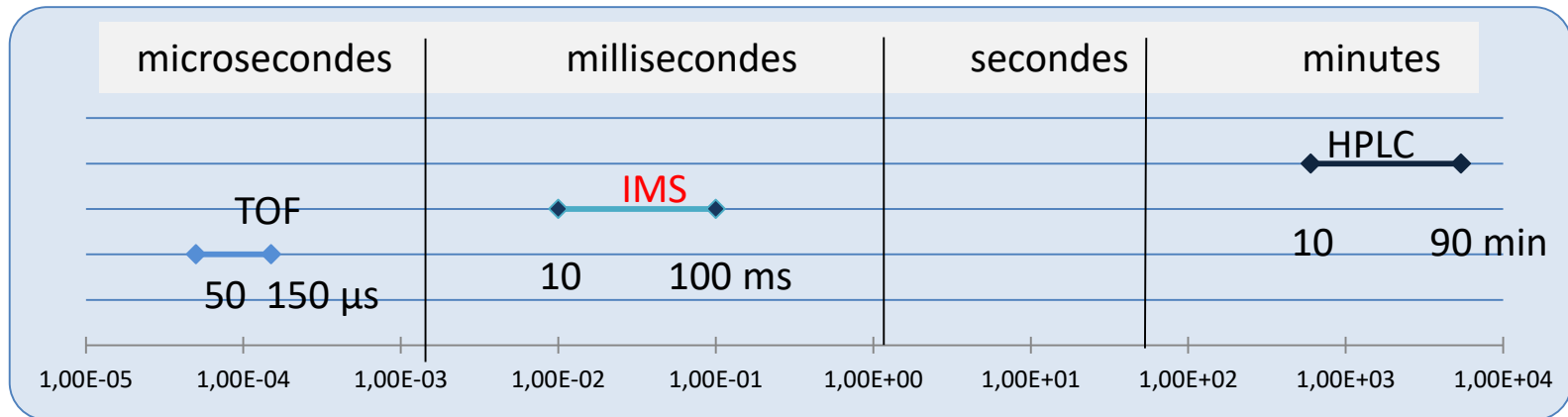
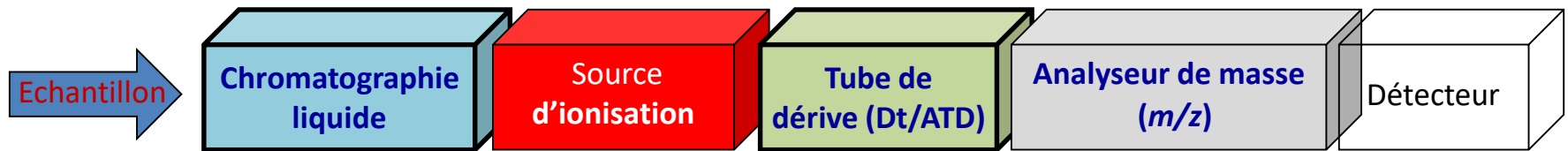
⇒ Analyse en forme → Conformation, complexation, ...

- Détermination CCS (mesure absolue en DTIMS ou relative par étalonnage)

→ Comparaison avec **Bases de données** ou avec **Calculs**

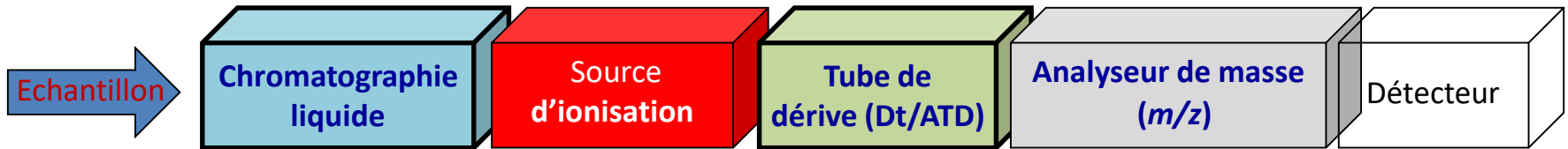


❖ Spécificités du couplage LC-IM-MS



	Mass Spectrometry (TOF-MS)	Ion Mobility (DT-IM)	Gas Phase (GC)	Liquid Phase (LC)
Analytical Measure	Flight Time	Drift Time	Ret. Time	Ret. Time
Property Measured	m/z	CCS	Partition Coeff.	Partition Coeff.
	A property of the analyte	A property of the analyte, drift gas and temperature	A property of the analyte, stationary and mobile phases and temperature	
System Accuracy	< 1 ppm	Typ. 2%	1% RRT	Variable

❖ Spécificités du couplage LC-IM-MS



LC-MS → Triple correlation

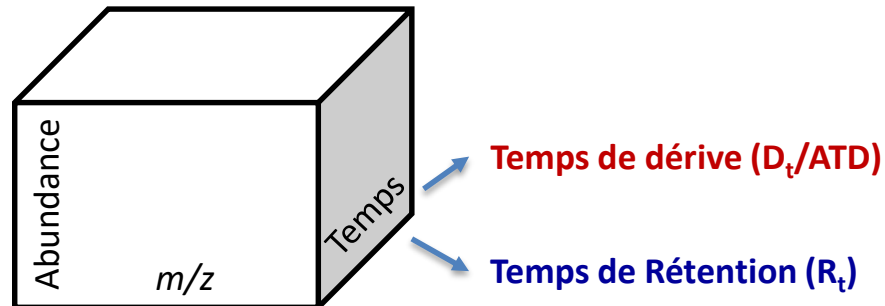
Temps de Rétention (R_t)

m/z & Abondance

IM-MS → Triple correlation

Temps de dérive (D_t/ATD)

m/z & Abondance

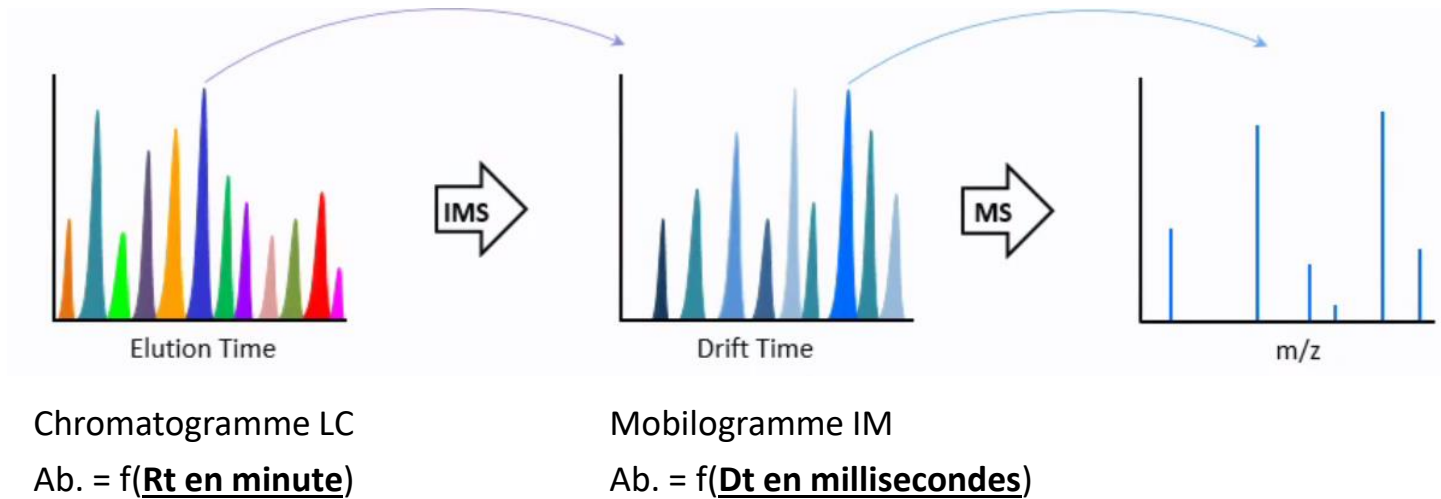


4 jeux de données en LC-IM-MS

❖ Spécificités du couplage LC-IM-MS

✓ *Affichage des données LC-IM-MS*

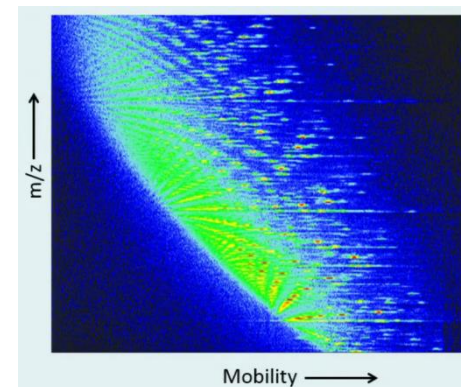
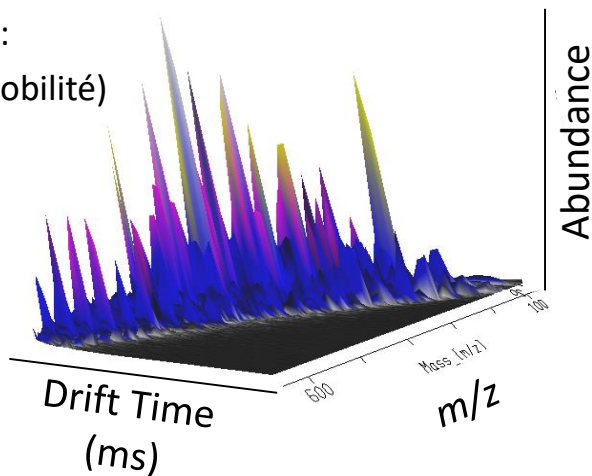
⇒ Affichage 2D: Chromatogrammes & Mobilogrammes



⇒ Affichage 3D: Cartographie avec code couleur pour indiquer l'abondance (Density View)

Exemple 1:

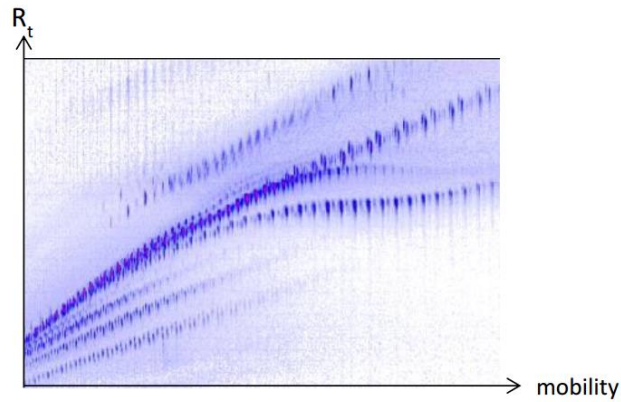
$m/z = f(\text{Mobilité})$



❖ Spécificités du couplage LC-IM-MS

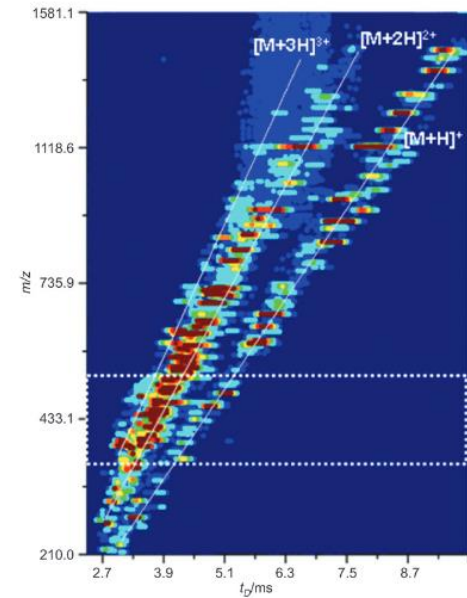
Exemple 2:

$R_t = f(\text{Mobilité})$



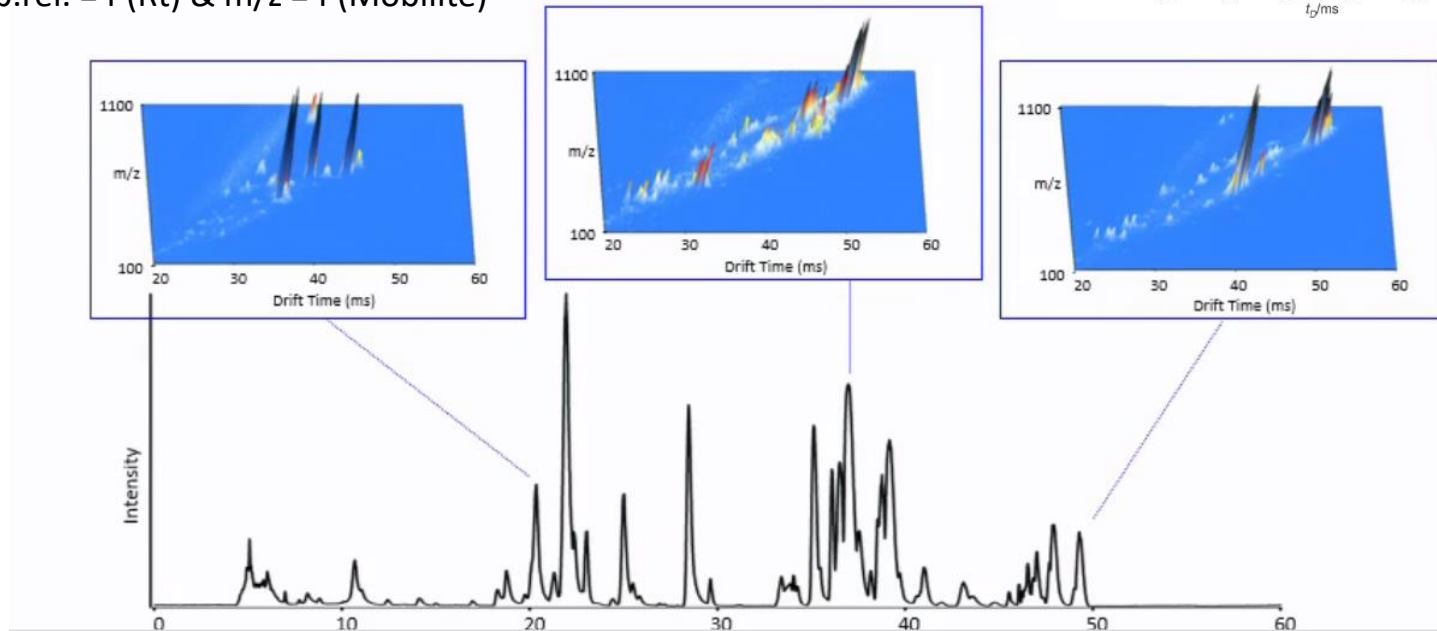
Exemple 1:

$m/z = f(\text{Mobilité})$



Exemple 3:

$\text{Ab. rel.} = f(R_t) \text{ \& } m/z = f(\text{Mobilité})$



❖ Spécificités du couplage LC-IM-MS

✓ Différentes géométries **IM-MS** → Performances et Applications différentes !!

⇒ Principe de fonctionnement

- 4 Techniques différentes de IM

- IMS (Agilent)
- TWIM (Waters)
- TIMS (Bruker)
- DMS/FAIMS (AB Sciex, Thermo)

- Duty cycle (Injection des ions, temps de résidence des ions dans le tube de dérive)
- Limite de détection/sensibilité (Transmission des ions vs neutres)
- **Capacité de séparation** (Résolution & Méthodes 2D/3D)

Technique	Approximate peak capacity
FAIMS	8.9-44 (Canterbury et al., 2008)(Schneider et al., 2010b)
DT-IMS	90 (Dwivedi et al., 2010)
HPLC	300 (Guo et al., 2009)
UHPLC	400 (Wren, 2005)
MS	3000 (Dwivedi et al., 2010)
IMS-MS	19000 (Dwivedi et al., 2010)
LC-MS	900000
LC-IMS-MS	11340000 (Dwivedi et al., 2010)

⇒ Mobilité et structure en phase gazeuse

- Structures phase liquide/gazeuse ?
- Cause et effets du chauffage des ions ?

Separation dimensions	Peak capacity (ϕ)
One dimension	
Capillary electrophoresis (CE) ^b	1×10^3
High-performance liquid chromatography (HPLC) ^b	60
Ultrahigh pressure HPLC	3×10^2
Gas chromatography (GC)	75
Two dimensions	
2D-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)	1×10^4
HPLC-Capillary zone electrophoresis (CZE)	6.5×10^2
Capillary isoelectric focusing (CIEF)-MS/MS	9×10^2
LC-Fourier transform ion cyclotron resonance-MS	6×10^7
MALDI-ion mobility-TOFMS	5.5×10^3
Three dimensions	
HPLC-ion mobility-MS	4×10^5
Size exclusion chromatography-HPLC-CZE	2.8×10^3

❖ Drift-Time IM-MS (DTIM-MS)

✓ Configuration classique (DTIM):

Tube de mobilité de 1cm x 6 cm (L)

T ambiante et P_{atmos} , Gaz de dérive = N_2 ou He

Introduction pulsée des ions

$E \sim 5$ à 100 V/cm

Force électrostatique (champ électrique)

Forces de friction (ion, gaz tampon, nombre de collisions, température)

→ équation de Mason–Schamp pour un champ faible:

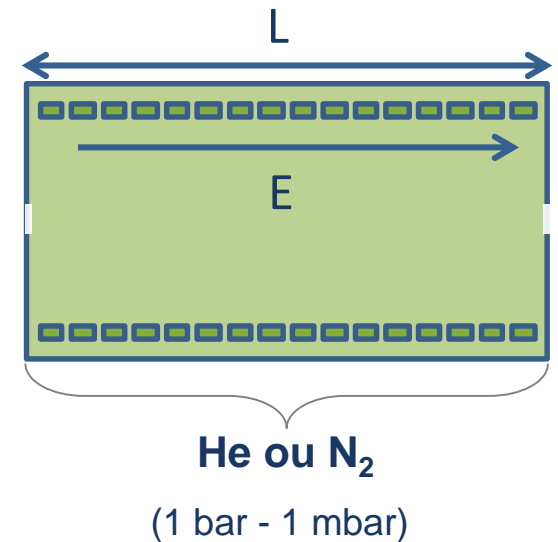
$$E = \frac{V}{L} \quad \longrightarrow \quad \vec{v} = K\vec{E}$$

Vitesse des ions $v_d = K \cdot E$ avec v_d (cm/s), E (V/cm) et $K =$ Coefficient de mobilité (cm²/V.s)

K = Coefficient de mobilité caractéristique de l'ion

K dépend du gaz de dérive, de T & P mais indépendant de E d'où utilisation de **K normalisée**: K_0

$$K_0 = K \frac{P}{P_0} \frac{T_0}{T} \quad (P_0 = 1 \text{ bar}, T_0 = 273 \text{ K})$$



1. Karasek, F.W., *Anal. Chem.*, **1974**, 46, 710A.

2. Mason E.A. and McDaniel, E.W., **Transport Properties of Ions in Gases**, Wiley, New-York, **1988**.

3. Eiceman, G.; Karpas, Z. **Ion Mobility Spectrometry second**. CRC Press, Taylor & Francis LLC; Boca Raton, **2005**.

❖ Drift-Time IM-MS (DTIM-MS)

$$v_D = KE \quad \& \quad v_D = \frac{L}{t_D}$$



$$t_D = \frac{L}{KE} \quad \& \quad E = \frac{V}{L}$$



$$t_D = \frac{L^2}{K V}$$

Fonction Linéaire :

$$t_D = f(1/V)$$

Pente : L^2 / K

Temps d'arrivée des ions t_a

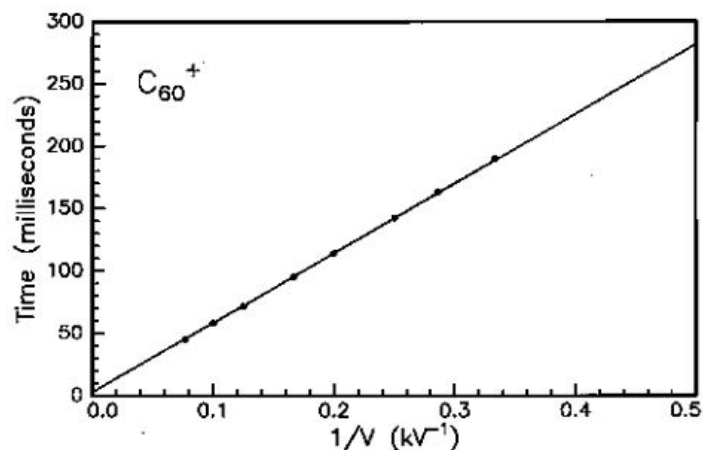
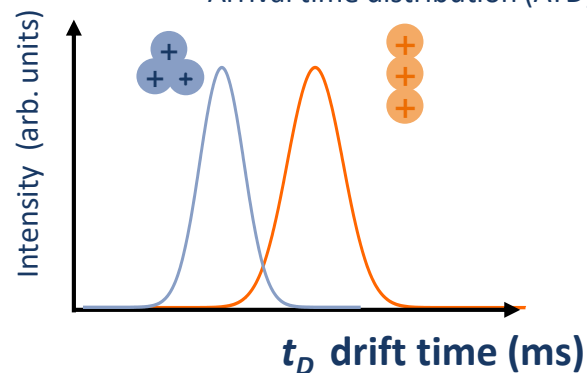
$$t_a = t_0 + t_d$$

Temps passé avant le tube de dérive t_0

Temps passé dans le tube de dérive t_d

Extracted ion mobility spectrum (m/z)

Arrival time distribution (ATD)



1. Karasek, F.W., *Anal. Chem.*, **1974**, 46, 710A.

2. Dugourd P, Hudgins RR, Clemmer DE, Jarrold MF, *Review of Scientific Instruments*, **1997**, 68, 1122.

3. Eiceman, G.; Karpas, Z. **Ion Mobility Spectrometry second**. CRC Press, Taylor & Francis LLC; Boca Raton, **2005**.

❖ Drift-Time IM-MS (DTIM-MS)

Fonction Linéaire :

$$t_D = f(1/V)$$

Pente : L^2/K

Mobilité réduite K_0

$$K_0 = K \frac{T_0 P}{T P_0} = K \frac{N}{N_0}$$

Densité du gaz dans le tube de dérivation

$$N = \frac{n \times N_A}{V} = \frac{P}{kT}$$

N_A Nombre d'Avogadro

n Nombre de mole

V Volume

P Pression

k = Constante de Boltzman

$N_0 = 2,69 \cdot 10^{25} \text{ m}^{-3}$ (Loschmidt value)

$P_0 = 1 \text{ bar}$

$T_0 = 273 \text{ K}$

$$t_d = \frac{L}{v} = \frac{L}{KE} = \frac{L^2 T_0}{K_0 P_0 T} \frac{P}{V}$$

$$t_a = t_0 + t_d$$

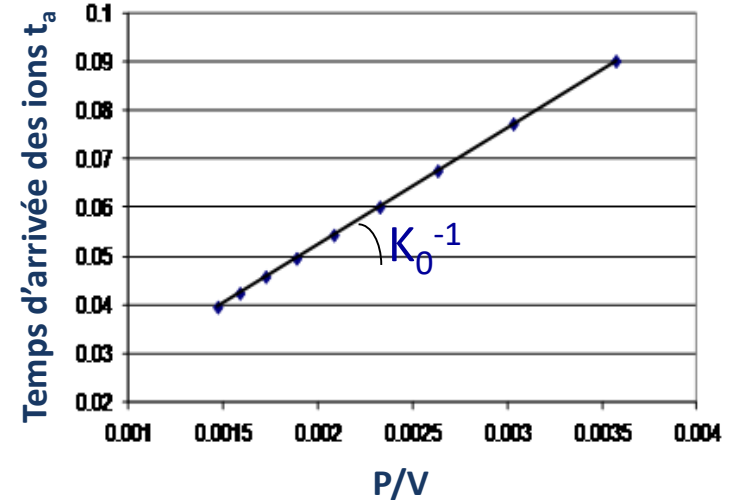
$$t_a = t_0 + \frac{L^2 T_0}{K_0 P_0 T} \frac{P}{V}$$

Fonction Linéaire à T fixée:

$$t_D = f(P/V)$$

Pente : $1/K_0$

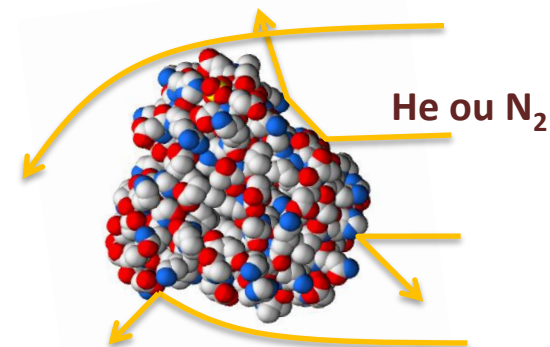
(Ordonnée à l'origine: t_0)



N (in units of molecules per volume) is used as the relevant quantity to express pressure because N is, in contrast to pressure P , decoupled from the temperature T .

❖ Drift-Time IM-MS (DTIM-MS)

- ✓ *Mesure **absolue** de K et donc de **CCS** :*
- ⇒ **Gaz de dérive / gaz tampon (pas d'aggrégation)**
- ⇒ **Pression réduite**



Collision cross section (CCS) avec He ou N₂ : Ω_{He} ou Ω_{N_2} en Å²

$$K = \frac{\sqrt{18\pi}}{16} \frac{e}{N\sqrt{kT}} \frac{z}{\sqrt{\mu}} \frac{1}{\Omega}$$

Mobilité réduite K_0



$$\Omega = \frac{\sqrt{18\pi}}{16N_0} \cdot \frac{\sqrt{m+M}}{\sqrt{mM}} \cdot \frac{ze}{\sqrt{kT}} \cdot \frac{1}{K_0}$$

- $e = 1,602 \cdot 10^{-19}$ C
- $k = 1,38 \cdot 10^{-23}$ J · K⁻¹ (constante de Boltzman)
- T température (Kelvin)
- N densité du gaz de dérive (m⁻³)
- μ masse réduite (molécule et gaz de dérive) (kg)
- z nombre de charge
- Ω Collision cross section

Mesure expérimentale de t_a → Valeur de K_0

→ Valeur expérimentale de CCS

K₀ for measurements in low pressures with non clustering gases such as He; K₀ values influenced by gas temperature, pressure, and gas composition on ion identities, collision cross sections (caution at ambient pressure in polarizable gases).

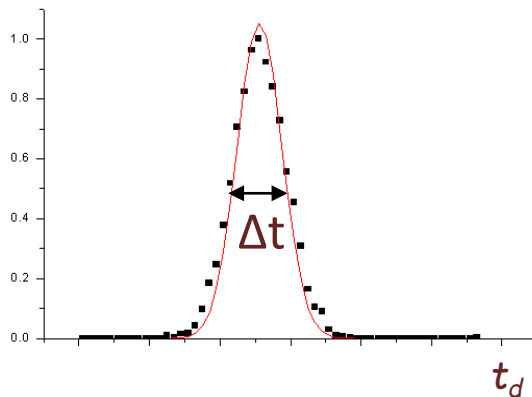
Revercomb, H. E.; Mason, E. A. *Anal. Chem.* **1975**
(D'après F. Chiroit & P. Dugourd, Université de Lyon et
H. Lavanant, Université de Rouen)

❖ Drift-Time IM-MS (DTIM-MS)

Résolution & Capacité de séparation

✓ Résolution IM

- Largeur du signal à mi-hauteur du signal
- Elargissement dû à 4 composantes (pulse d'injection, diffusion des ions, effets charge/espace, interaction des ions avec le gaz)
- Diffusion majoritaire (W_d) / coefficient de diffusion D



$$R = \frac{t}{\Delta t}$$

$$W_d = 4.7 \sqrt{2Dt_d}$$

$$D = K \frac{kT}{q} = \frac{v}{E} \frac{kT}{q}$$

$$R = \sqrt{\frac{qEL}{44.2kT}}$$

Résolution IM

- Directement proportionnelle à E & L (longueur du tube de dérivation):
 - Augmenter L (en gardant E faible) ou → augmenter E (en gardant L): **DMS/FAIMS**
- Inversement proportionnelle à T
 - Diminuer T

✓ Résolution MS

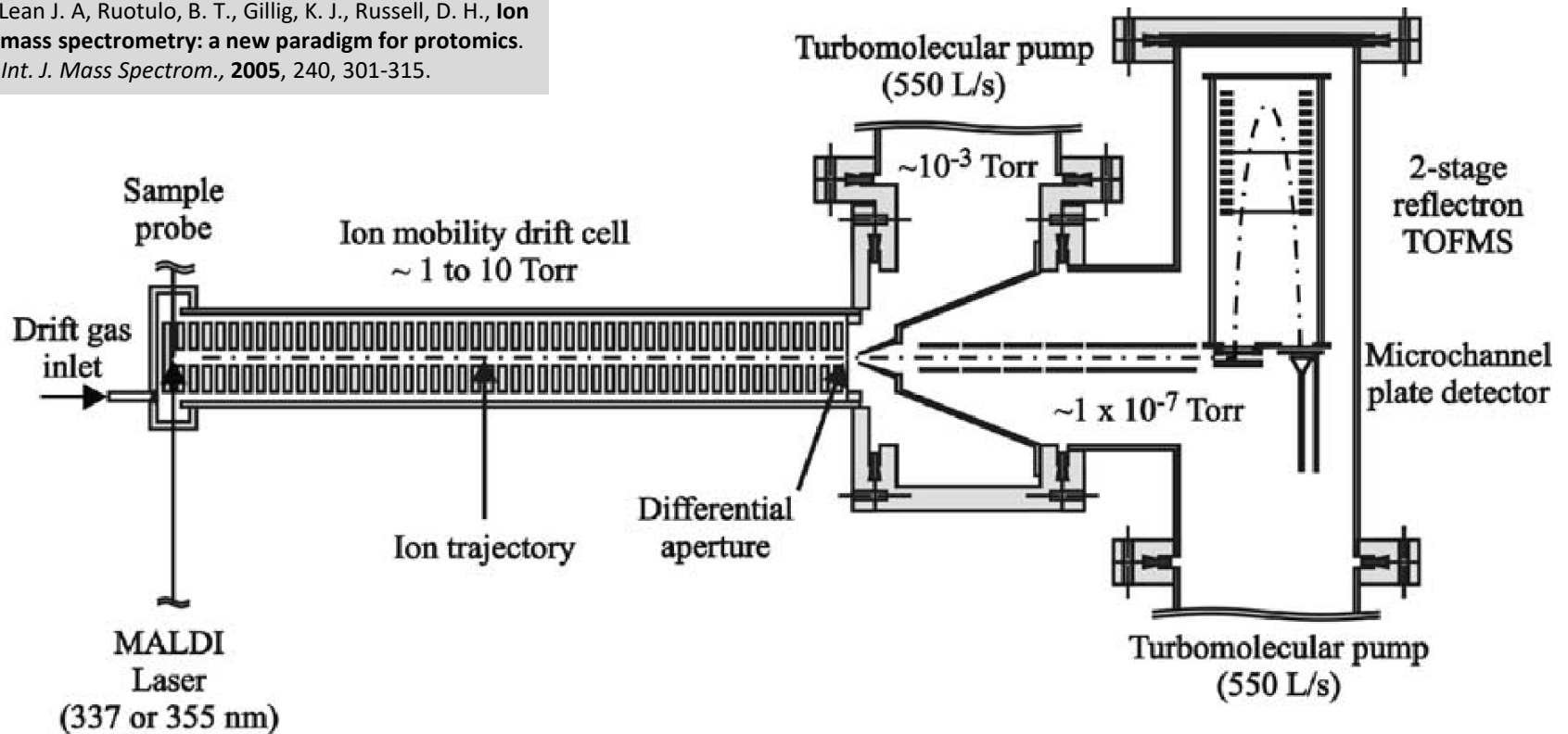
- Largeur du signal à mi-hauteur du signal (FWHM)

✓ Capacité de séparation = nombre maximum de pics détectés dans une méthode 2D

- chaque méthode (IM & MS) doit posséder une résolution élevée
- orthogonalité maximum entre les deux méthodes (différence entre principe de séparation): $P_c = R_{IM} \times R_{MS} \times \text{fraction d'orthogonalité}$

❖ Exemple MALDI-DTIM-MS

From McLean J. A, Ruotulo, B. T., Gillig, K. J., Russell, D. H., **Ion mobility-mass spectrometry: a new paradigm for proteomics.** *Int. J. Mass Spectrom.*, 2005, 240, 301-315.



Difficultés pour maintenir la sensibilité :

- (i) utiliser tous les ions générés en source,
- (ii) élimination des neutres lors de la transmission des ions vers l'analyseur de masse.

DT-IMS → faisceau d'ions pulsé → manque inhérent de sensibilité (ions analysés par paquets)
 → perte en Duty cycle (car le temps entre les paquets d'ions n'est pas exploité)

❖ Differential mobility Spectrometry (DMS & FAIMS)

✓ Deux configurations très similaires → *Filtres d'ions / Techniques sélectives*

⇒ Differential Mobility Spectrometry (DMS)

Développée dans les années 1980 et adoptée comme outil analytique en 1993

Différence de mobilité des ions lorsqu'ils sont soumis dans un gaz de dérive à P_{atmos} à des **champs électriques faibles et élevés**

⇒ Field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS)

Variante de DMS (FIS: Field Ion Spectrometry)

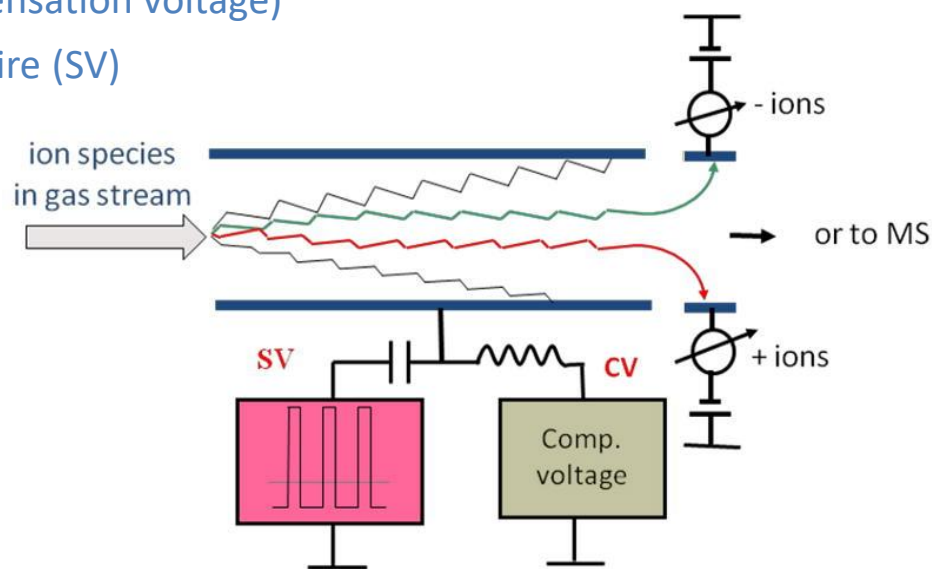
ions introduits en continu → sources d'ionisation API et duty cycle ~ 100%

SV (separation voltage) + CV (compensation voltage)

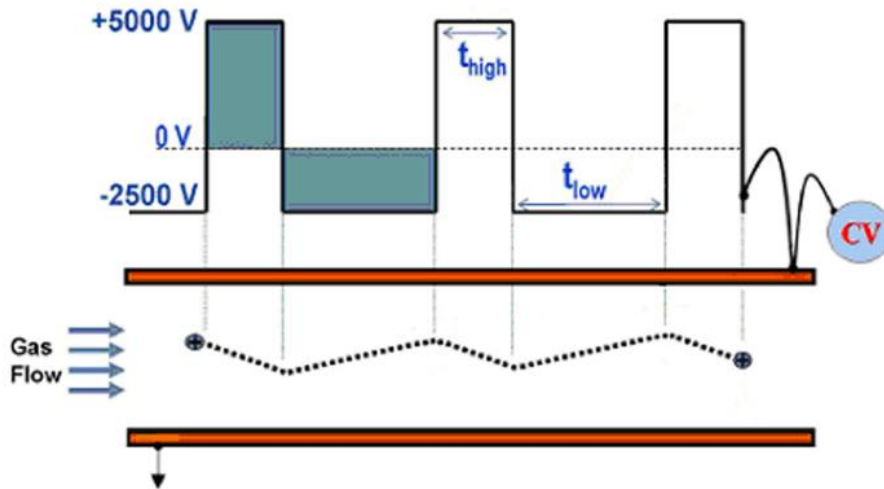
CV corrige l'amplitude de la trajectoire (SV)

Method is based on ions undergoing changes in mobility coefficients under strong field conditions (at constant N), so that mobility should be understood for most ions as

$$K(E/N) = K_0 (1 + a (E/N))$$



❖ Differential mobility Spectrometry (DMS & FAIMS)



- ⇒ Champ fort (SV) de courte durée
- ⇒ Champ faible (CV) de longue durée
- ⇒ Electrodes planes (DMS) ou incurvées (FAIMS)
- ⇒ Divers modes de fonctionnement selon SV & CV
 - i. SV+CV fixes → Filtre un type d'ions
 - ii. SV fixe + CV variable → Spectre linéaire
 - iii. SV +CV variables → Spectre de dispersion

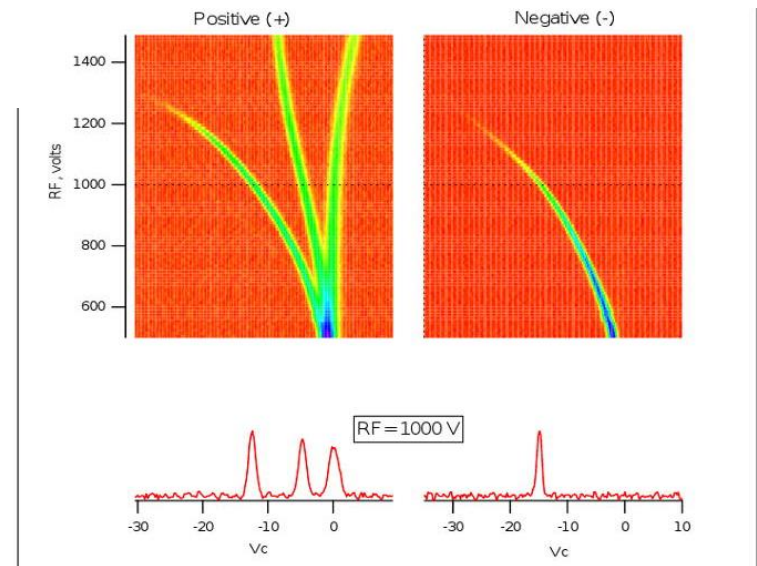
Small and inexpensive ion filters to reduce "chemical noise" in MS determinations

From Thermo Fisher Scientific Inc., **FAIMS Operators Manual, 2007.**

The fundamentals of DMS and FAIMS by Shvartsburg and Purves (2010)

Schneider, B. B.; et al. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2010, 298, 45-54.

Laphorn, C., Pullen, F., Chowdhry, B. Z., *Mass Spectrom. Rev.*, 2012, 1439, 3-25.



SelexION Technology

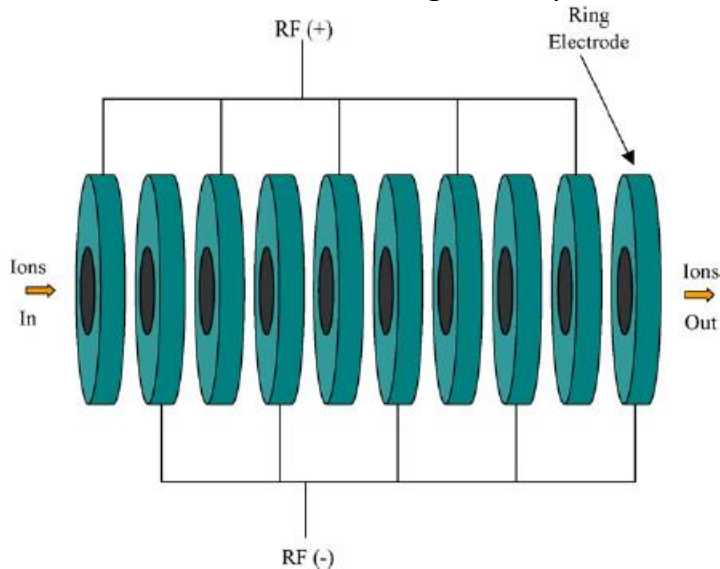
**Analyses de Médicaments / Métabolites
en LC/FAIMS/MS-MS(QqQ)**

❖ Traveling Wave Methods of IMS (TWIMS)

- ⇒ 1^{er} instrument commercial avec IM dispersive
- ⇒ Point de rupture dans l'IM-MS

A stacked ring ion guide (SRIG)

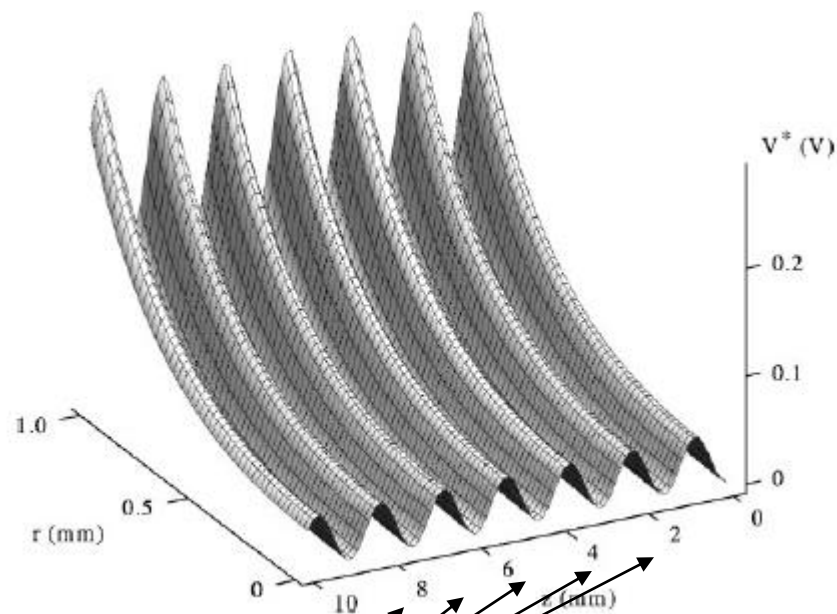
Empilement d'électrodes circulaires au sein desquelles circulent des vagues de potentiel



SYNAPT Technology

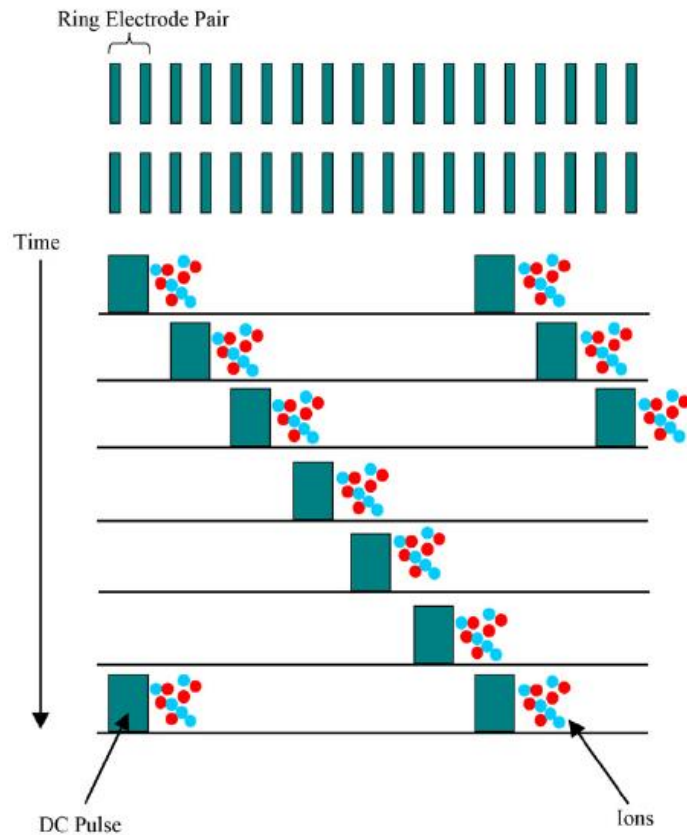
*Analyses de Biomolécules / Polymères
en LC/TWIM/MS-MS(QqTof)*

Effective potential V in the SRIG device

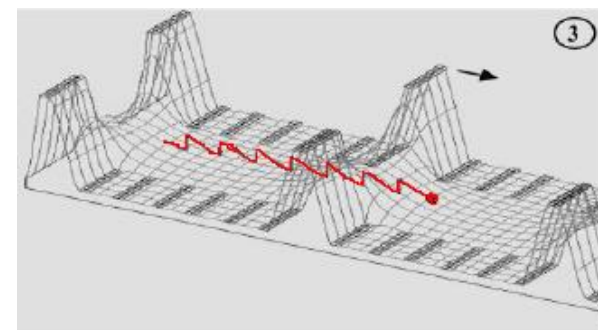
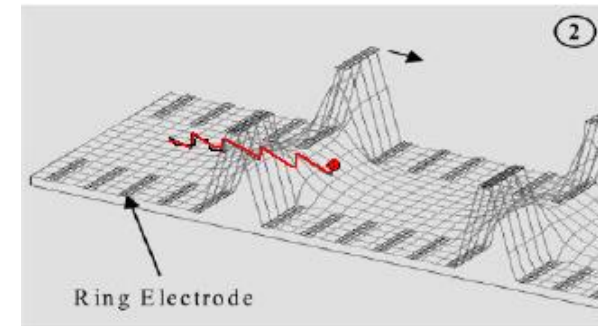
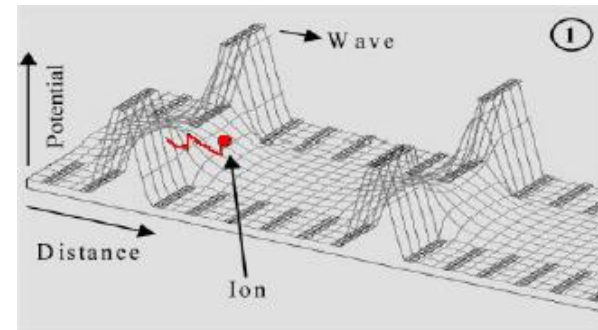


If these wells are deep enough, they can impede the progress of ions through the device.

❖ Traveling Wave Methods of IMS (TWIMS)

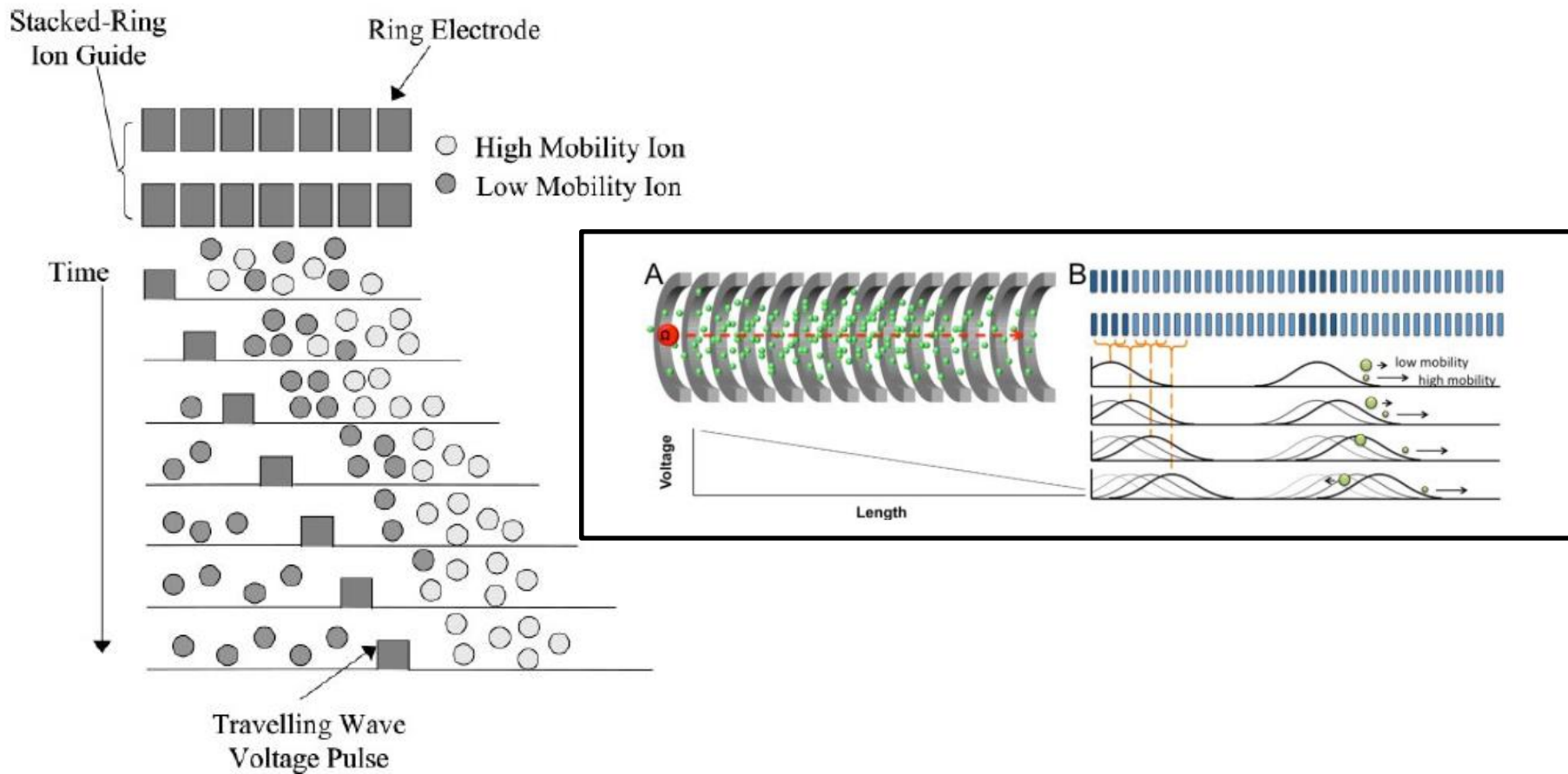


- ⇒ Capacité de l'ion à 'surfer la vague' dépend de K
- ⇒ Transport effectif sur la vague dépend de la hauteur et de la vitesse du pulse ainsi que de la pression du gaz de dérive



3D SIMION ion motion simulation

❖ Traveling Wave Methods of IMS (TWIMS)



- ⇒ Ion de faible mobilité K glissent derrière la vague que ceux de plus haute mobilité
- ⇒ Séparation selon K au fur et à mesure de la progression des ions
- ⇒ Paramétrages du transport des ions (hauteur et vitesse du pulse pour régler la vague) cruciaux / 'Vidange' de la cellule de mobilité entre deux transports

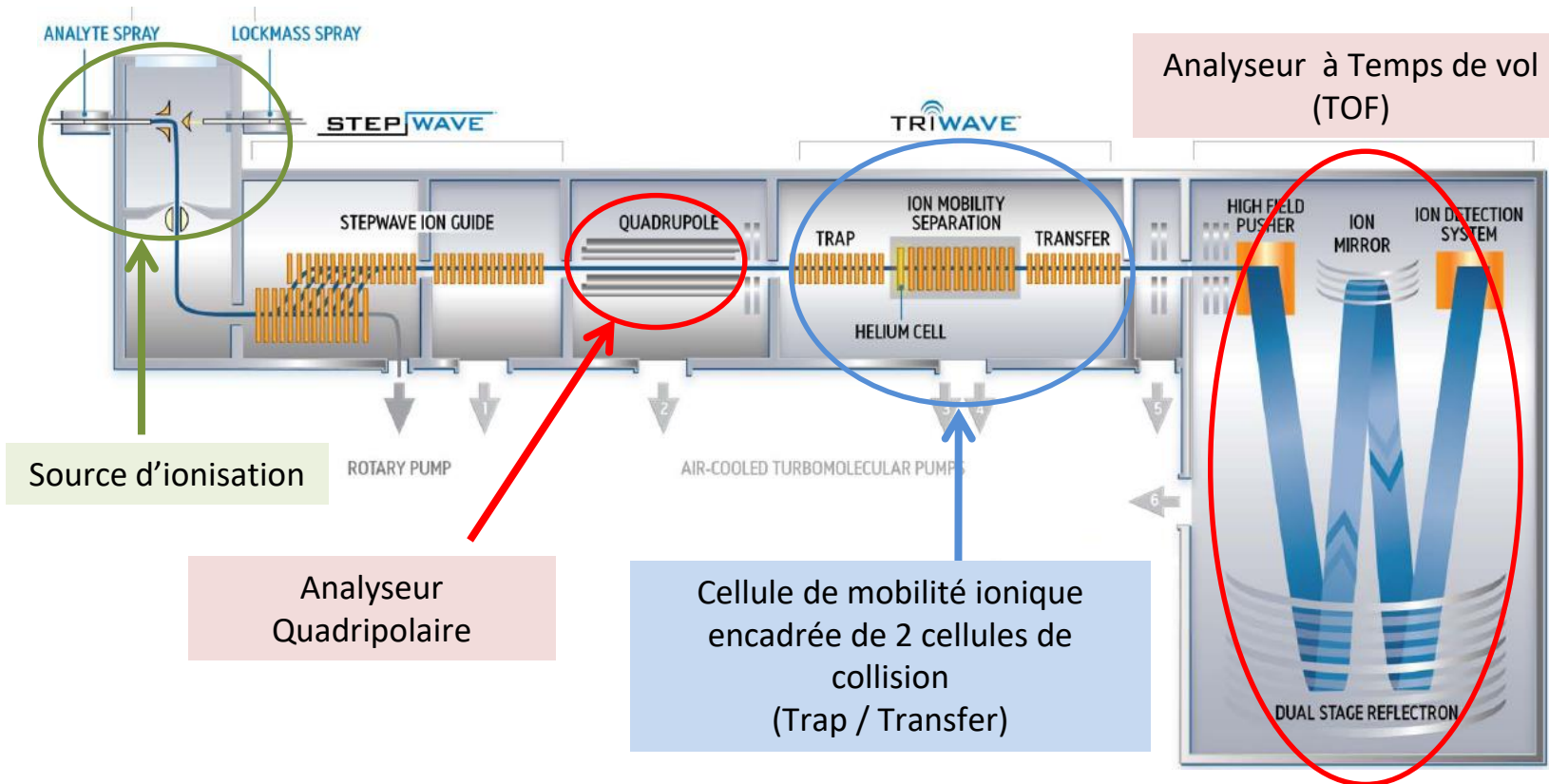
❖ LC-TWIM-MS/MS → SYNAPT G2-S (Waters)

Haute résolution
LC/HR-MS et LC/HR-MS/MS

- ✓ Mesures de masses exactes
- ✓ Profils isotopiques
- ⇒ **Composition élémentaire**
(ion moléculaire et ions fragments)

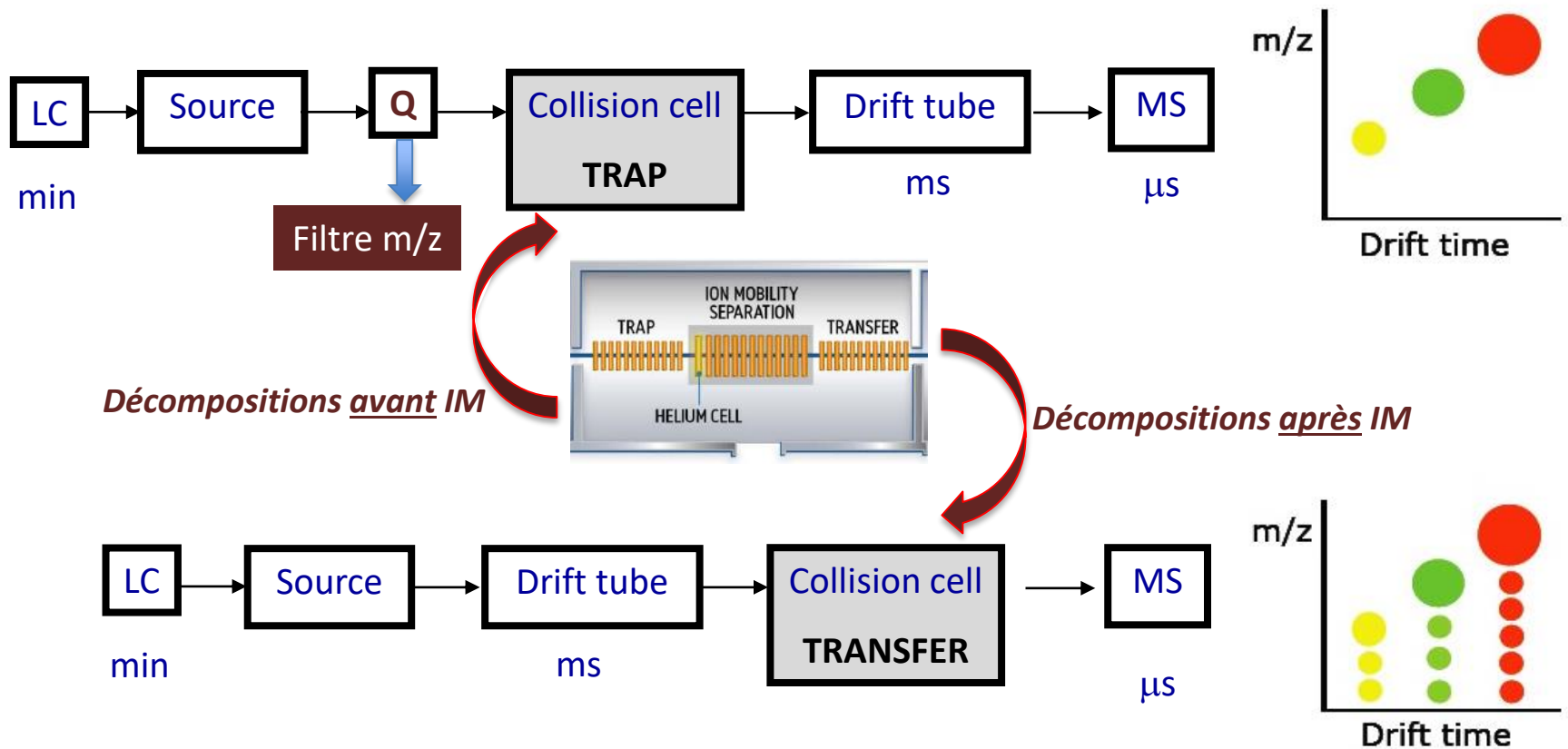
Mobilité ionique
LC/IM-MS et LC/IM-MS/MS

- ✓ Séparation en phase gazeuse
- ✓ Temps de dérive (Taille, forme et charge des ions)
- ⇒ **Section efficace de collision (CCS)** par étalonnage



❖ LC-TWIM-MS/MS → SYNAPT G2-S (Waters)

- ☺ **Trois dimensions de séparation** : Rt (LC), Dt (IM) & m/z (MS)
- ☺ **Deux dimensions de caractérisation** : Composition élémentaire (HR) & fragmentations (MS/MS)
- ☺ **Plusieurs expériences de MS/MS**:
 - Activations vibrationnelles (CID basse énergie dans la cellule de collision: TRAP ou TRANSFER)
 - Décompositions avant ou après la cellule de mobilité

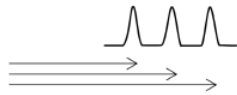


■ CID en TRAP → Ions fragments séparés selon IM (TRANSFER=bande passante)

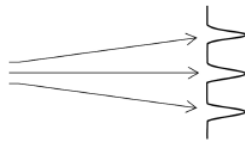
■ CID en TRANSFER → Ions moléculaires séparés selon IM (TRAP=bande passante)

❖ Trapped Ion Mobility Spectrometry (TWIMS)

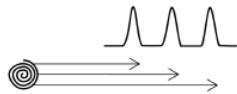
Temporally-Dispersive



Spatially-Dispersive



Confinement and Selective Release



May, J. C., McLean, J. A.

**Ion Mobility-Mass Spectrometry:
Time-Dispersive Instrumentation**
Anal. Chem., 2015, 87,1422–1436.

Drift Tube IM-MS
Travelling Wave IM-MS

Field Asymmetric IM-MS (FAIMS)
Differential Mobility MS (SelectION)

Trapped Ion Mobility Spectrometry (TIMS) 2010 → 2016 (Bruker)

Introduction

1961 →
2003 →

Commercial

2014 (Agilent)
2006 (Synapt G1, Waters)
2009 (Synapt G2, Waters)
2011 (Synapt G2-S, Waters)

1999 → 2011 (*Thermo, Sciex*)

➤ Spécificité du TIMS :

- DTIMS/TWIM: E pousse les ions vers l'analyseur & Gaz tampon 'stationnaire' qui les ralentit.
- TIMS: Fort débit de gaz qui pousse les ions vers l'analyseur & E les retarde

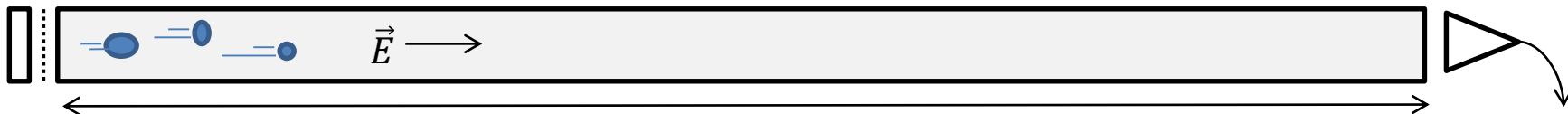
➔ *Confinement des ions puis relargage contrôlé*

➤ Avantages du TIMS :

- Longueur du tube de dérive très courte & **Résolution** augmentée
- **Rapide et sensible**

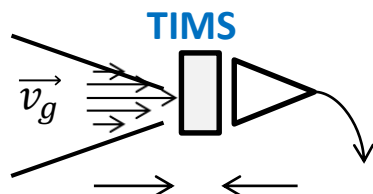
❖ LC-TIMS-MS/MS → timsTOF (Bruker)

Drift Tube (Temporally dispersive)



Longueur du tube de dérive détermine la résolution
 (L = 80 cm pour R ~ 50, L = 200 cm pour R ~ 100
L = 1 000 cm pour R ~ 200)

$$R = \sqrt{\frac{qEL}{44.2kT}}$$



l = 0.05 m

L = 5 cm pour R ~ 200

$$R = \sqrt{\frac{q v_g t_p E_e}{16 \ln 2 k_b T}}$$

Vitesse du gaz et temps de residence des ions

D'après Y. Hébert, Bruker

➤ **E variable :**

➔ Rampe des Champs forts (retardent tous les ions) vers les champs faibles (ne retardent aucun ion).

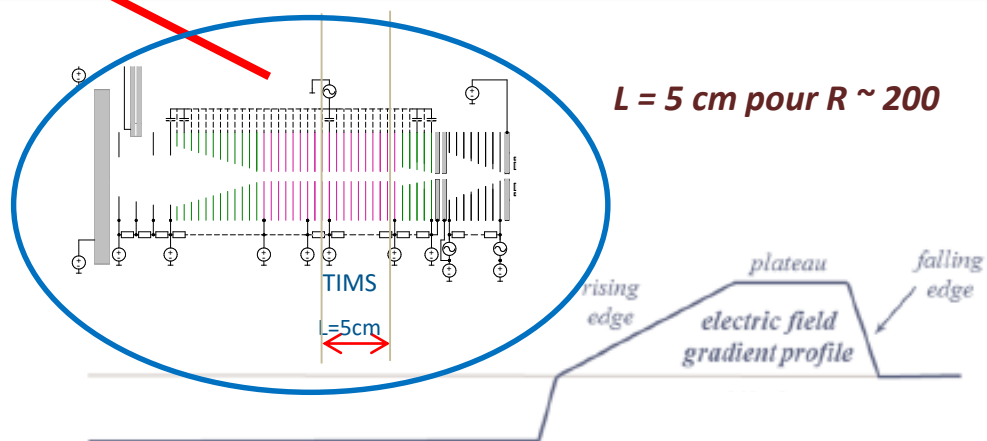
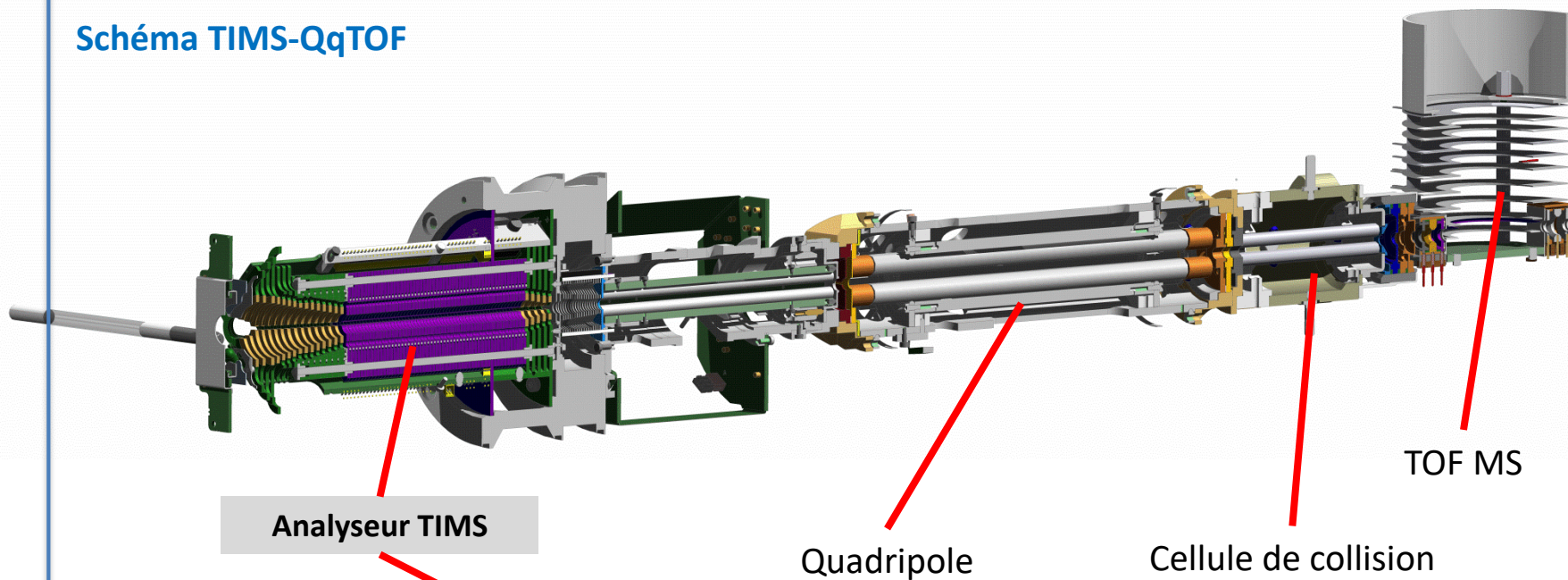
➤ **Inversion des mobilités :**

TIMS éjecte les ions les plus larges (CCS élevées) avant ceux de plus faible taille (CCS petites)

➔ **Ordre de séparation inverse au DTIMS/TWIM.**

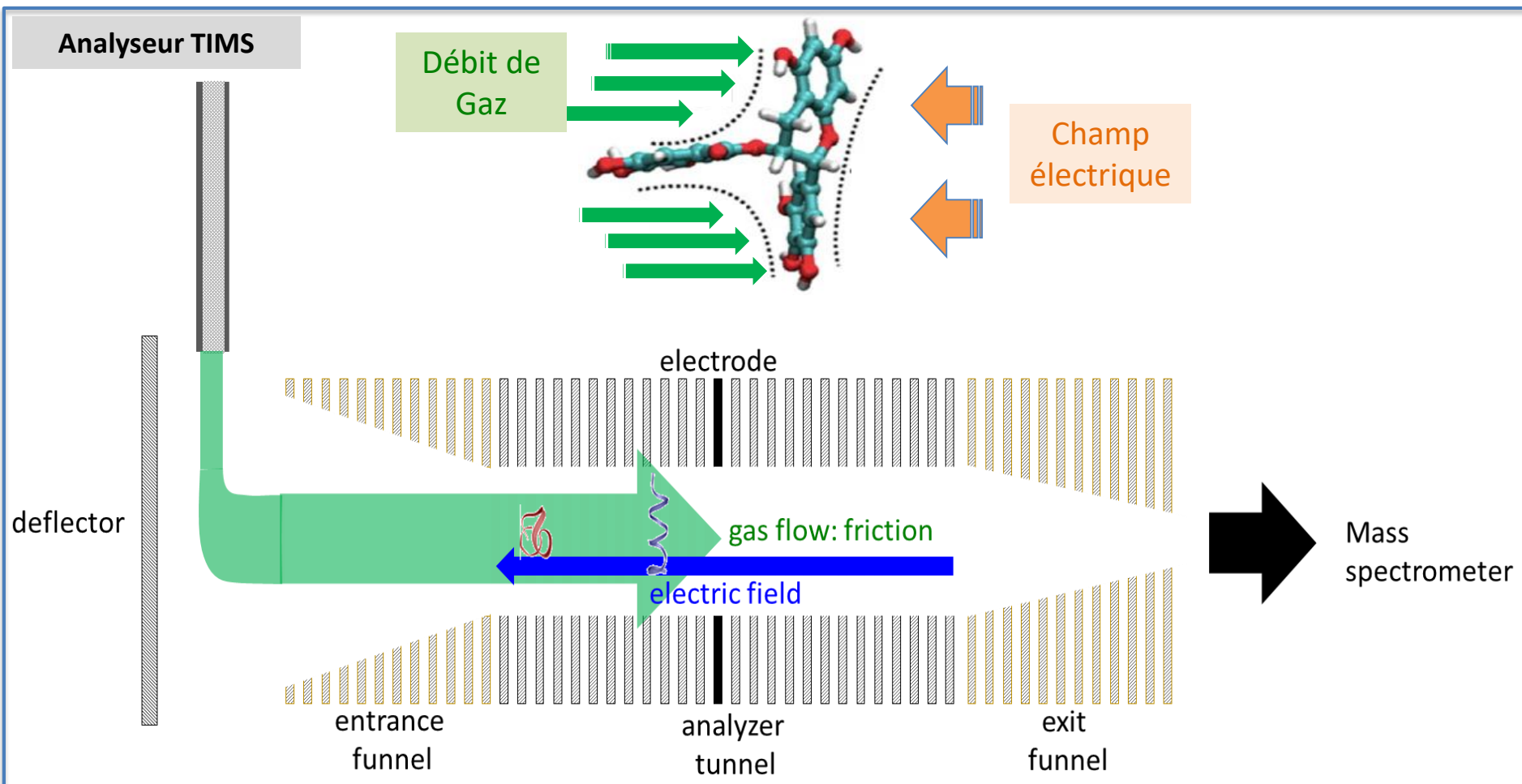
❖ LC-TIMS-MS/MS → timsTOF (Bruker)

Schéma TIMS-QqTOF



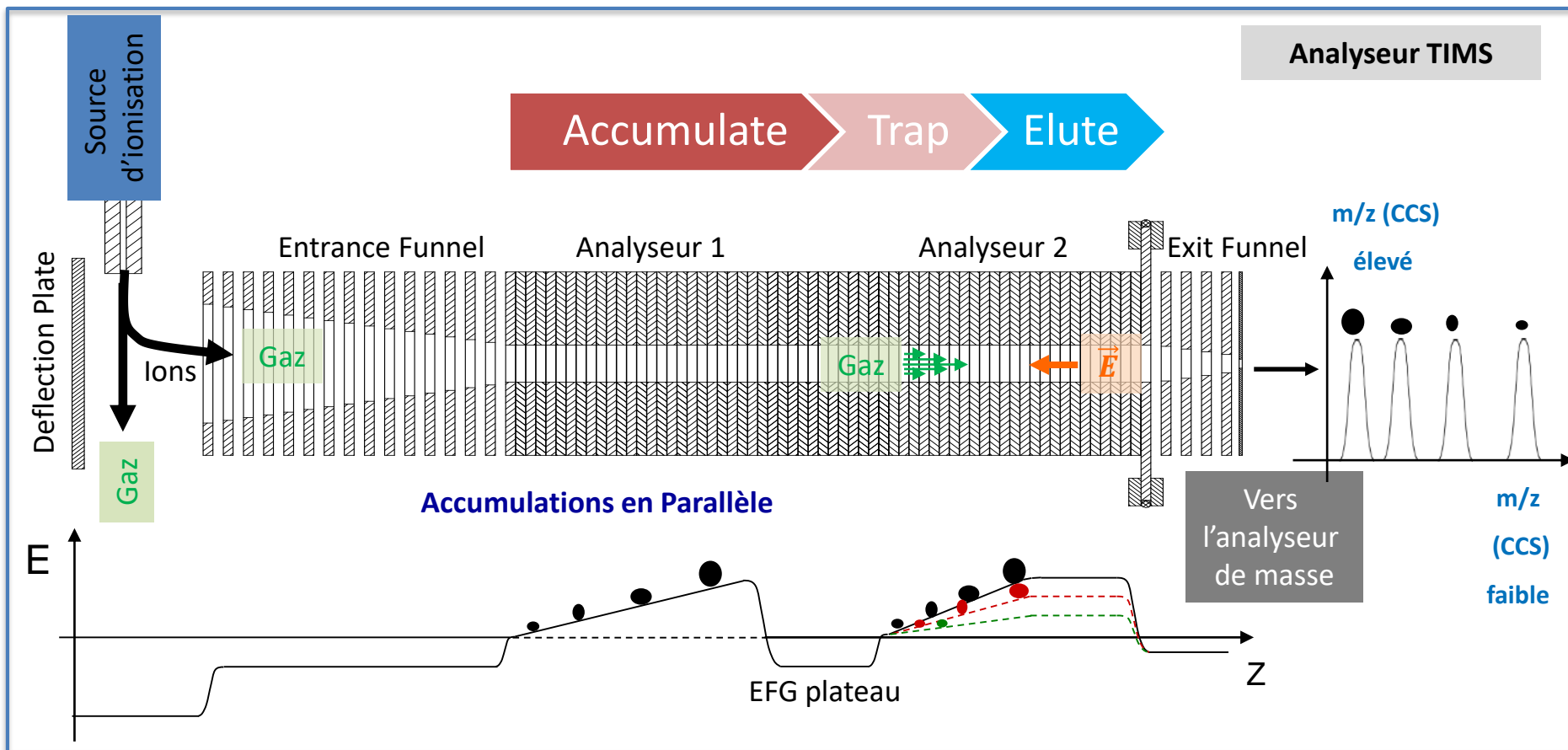
❖ LC-TIMS-MS/MS → timsTOF (Bruker)

Accumuler, piéger et relarguer/éluer pour améliorer sensibilité et résolution



❖ LC-TIMS-MS/MS → timsTOF (Bruker)

Accumuler, piéger et relarguer/éluer pour améliorer sensibilité et résolution



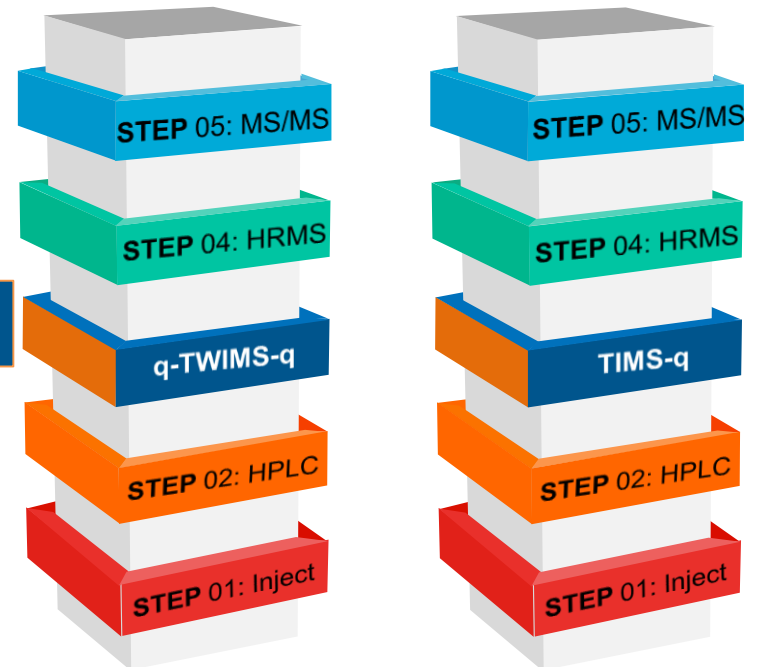
► **TIMS : 100% Duty cycle → Sensibilité maximum**

❖ Performances des 4 type d'appareillages IM-MS commerciaux

	FAIMS/DMS	DTIMS	TWIMS	TIMS
Séparation	Spatiale (filtre)	Temporelle	Temporelle	Confinement & Relâche sélective
Résolution	~30	~60-100	~40	>200 (<u>Variable!</u>)
Duty Cycle	n/a	~1%	~10%	~100%
CCS	Non	Mesure absolue	Mesure relative	Mesure relative
MS/MS	Après mobilité	Après mobilité	Avant/après mobilité	Après mobilité

- ❖ Résolution / Sensibilité
- ❖ Expériences de MS/MS

Différenciation



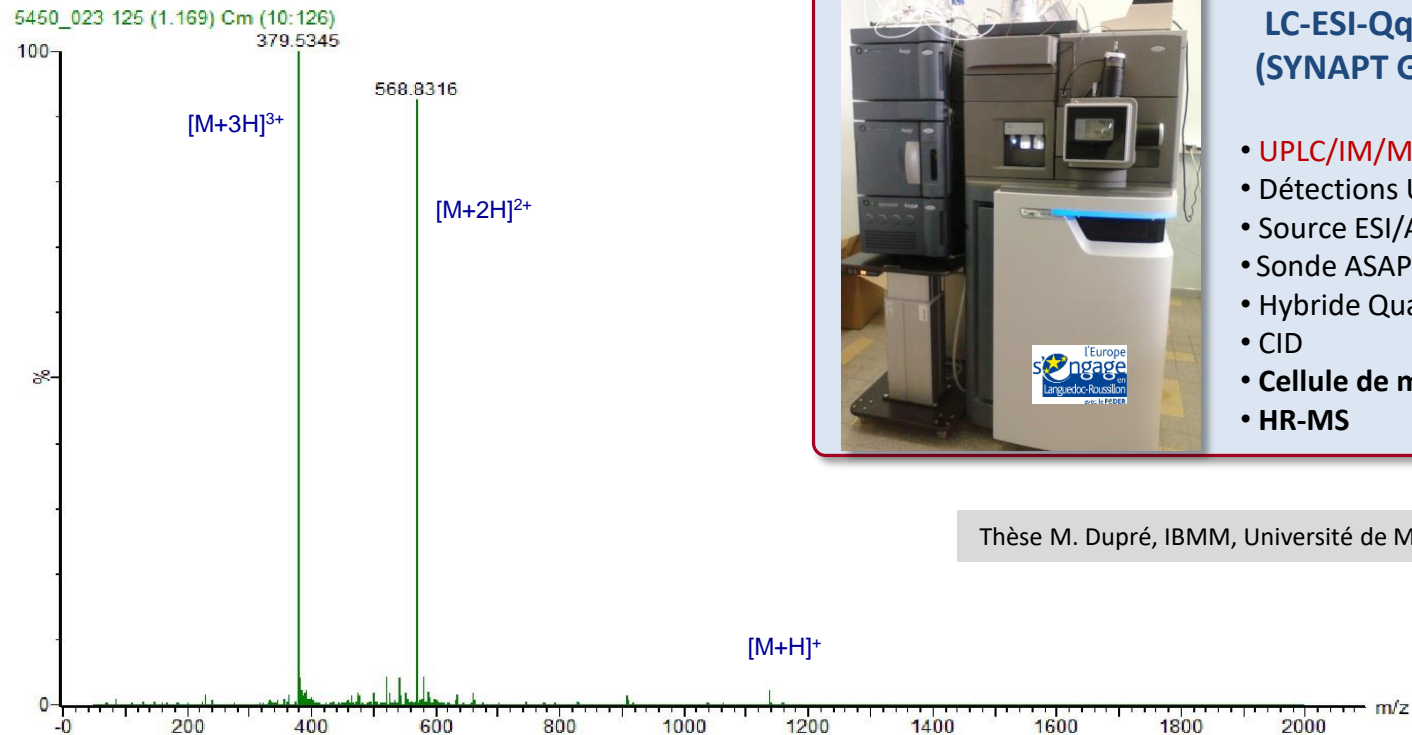
❖ Séparation de peptides tryptiques isobariques en mélange

PGAHIWEAGAK

M monoisotopique = 1135.58 g/mol

VEYLASITLK

M monoisotopique = 1135.65 g/mol



**Expériences HR-MS, IM et MS/MS:
Complémentarité des outils analytiques
pour une identification correcte**



LC-ESI-QqTOF-IM-MS (SYNAPT G2-S Waters)

- UPLC/IM/MS/MS
- Détections UV (PDA) & MS
- Source ESI/APCI (Z-spray™)
- Sonde ASAP
- Hybride Quadripôle-TOF
- CID
- Cellule de mobilité ionique
- HR-MS

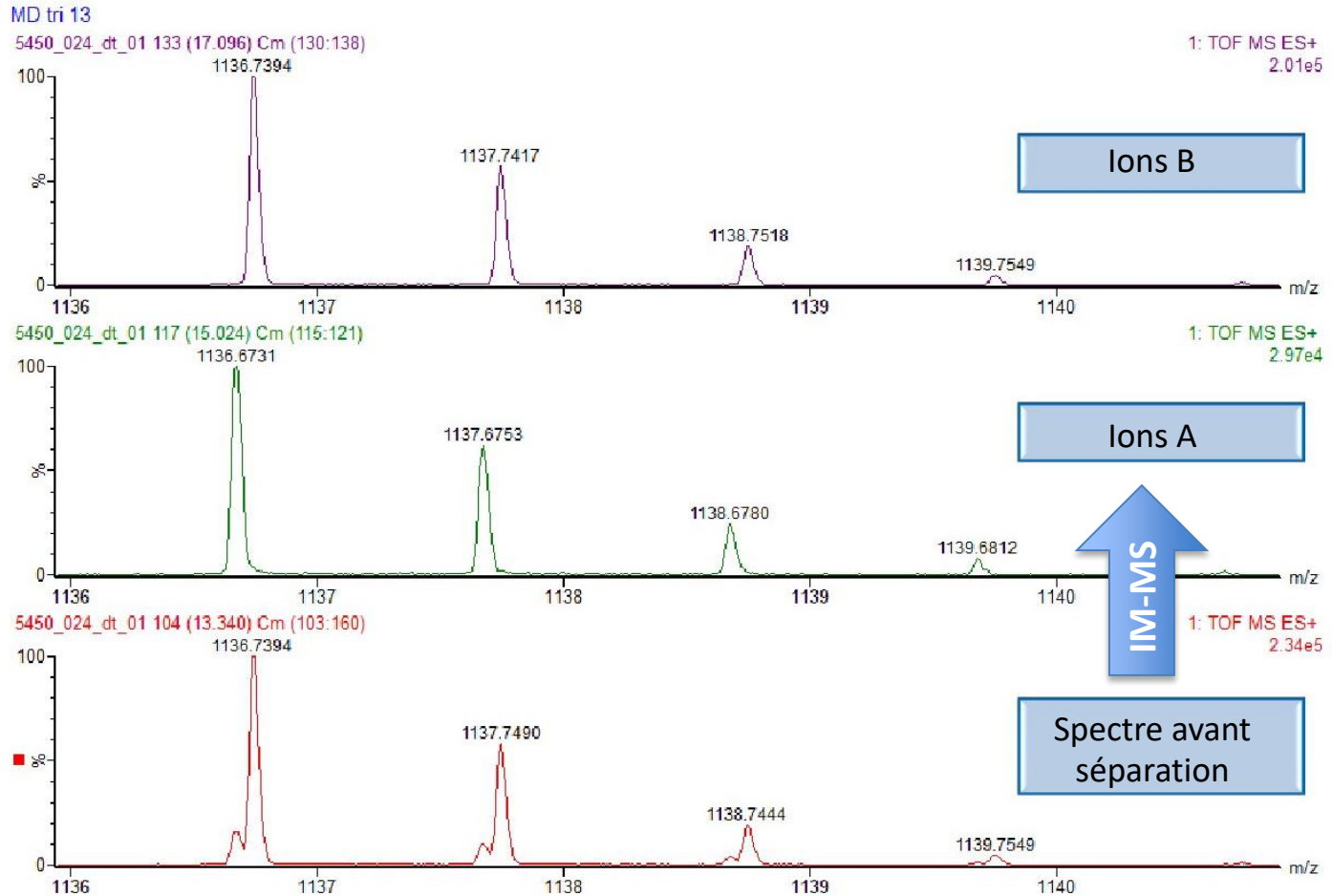
Thèse M. Dupré, IBMM, Université de Montpellier

PGAHIWEAGAK

Ions A

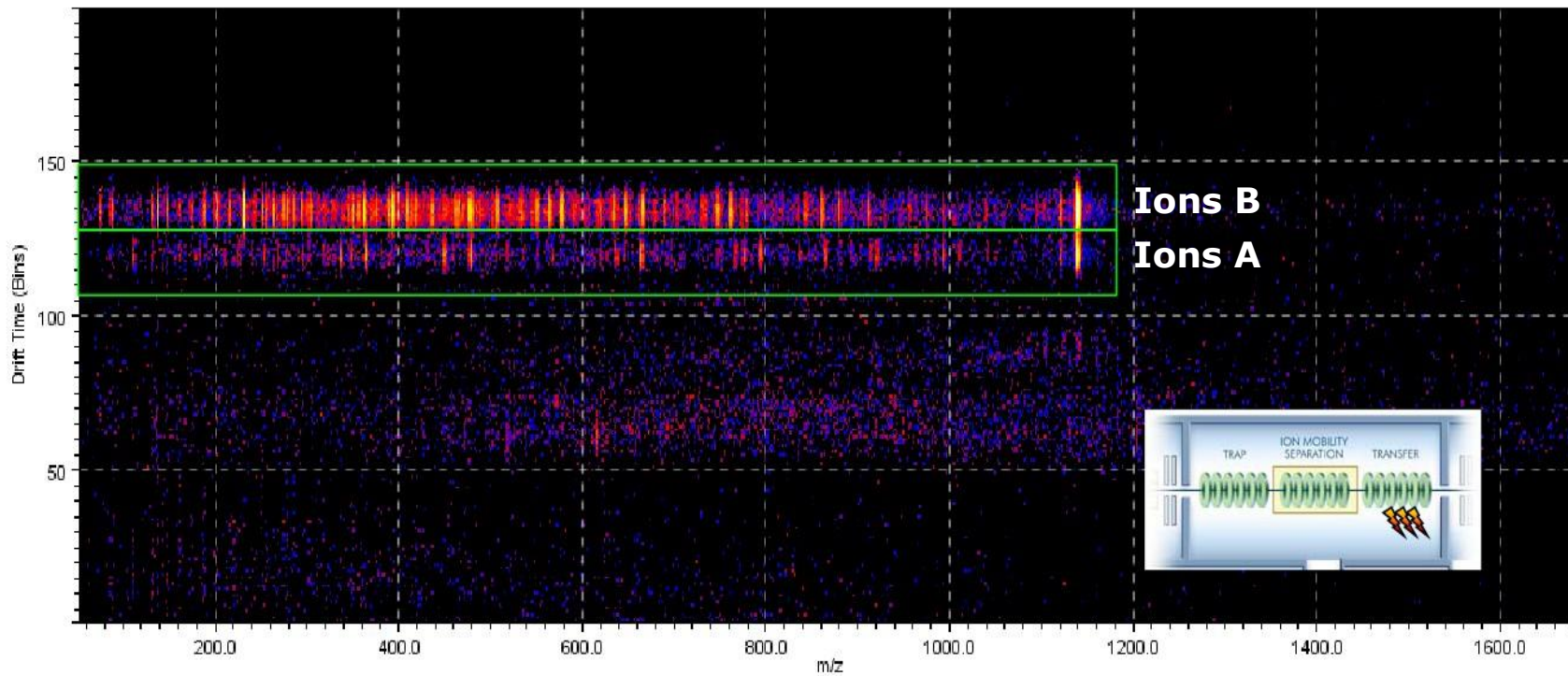
VEYLASITLK

Ions B



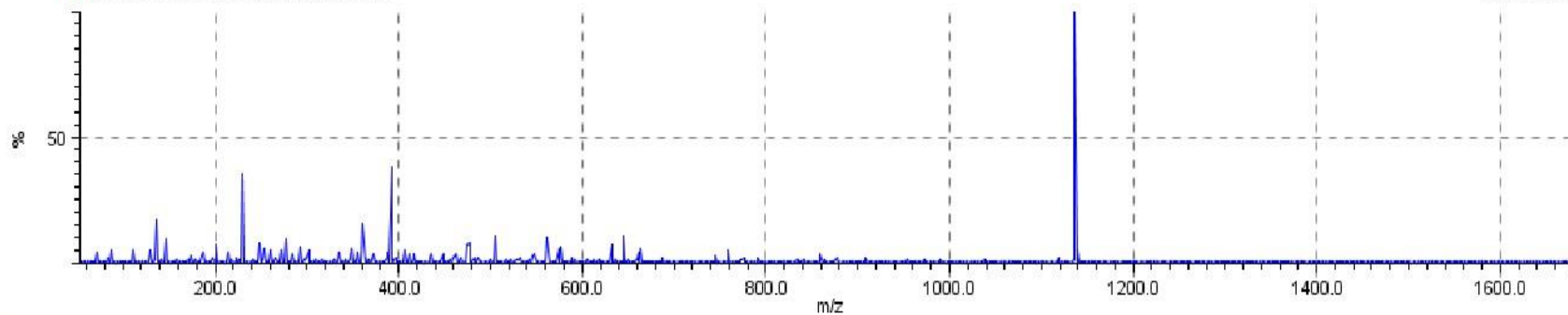
(0.05_2.00) (1.00_200.00) (51.00_1997.00)

max: 200 Drift Time (Bins)



■ (0.05_2.00) (1.00_200.00) (51.00_1997.00)

(1137;51982)



PGAHIWEAGAK

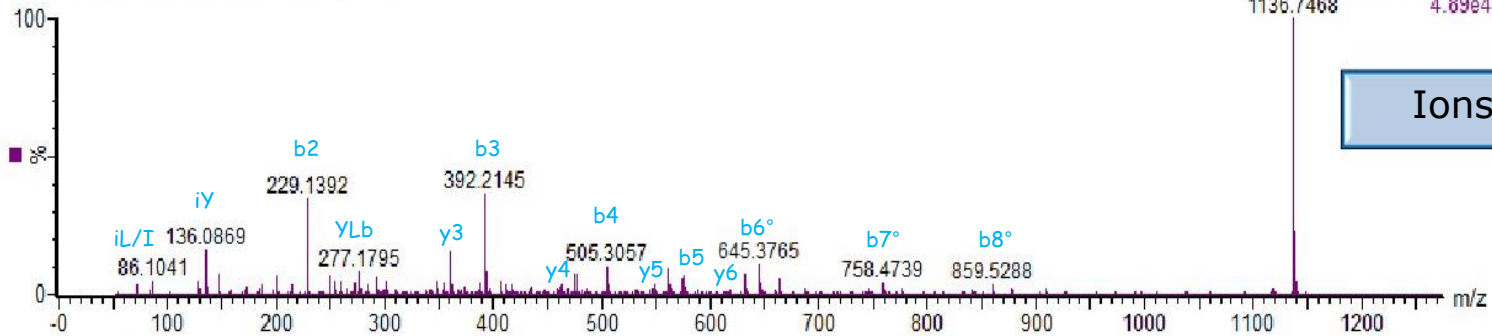
VEYLASITLK

Ions A

Ions B

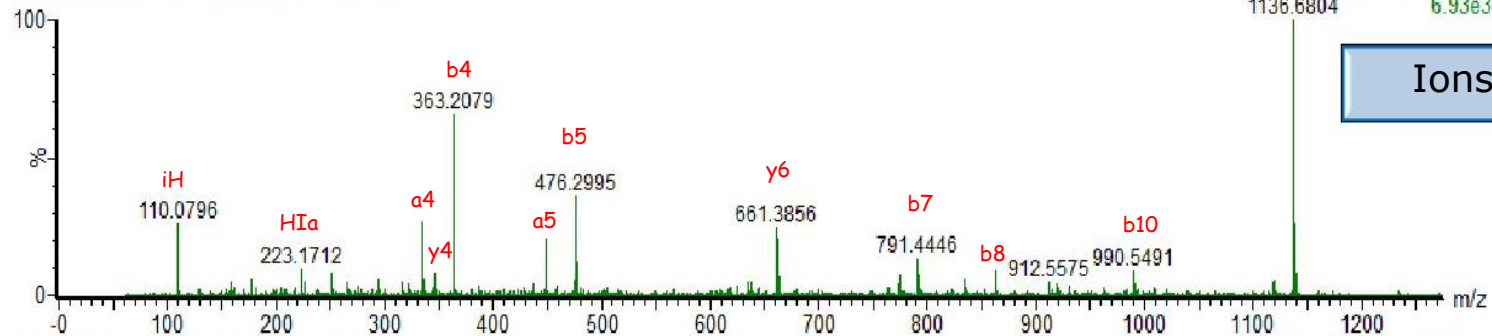
MD tri 13

5450_028_dt_01 134 (17.226) Cm (130:140)



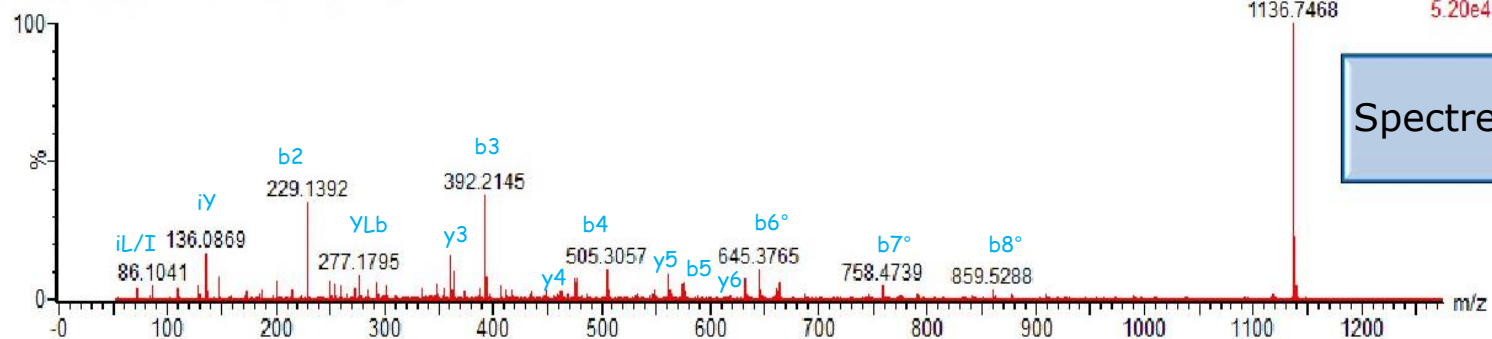
Ions B

5450_028_dt_01 120 (15.413) Cm (117:123)



Ions A

5450_028_dt_01 134 (17.226) Cm (111:147)



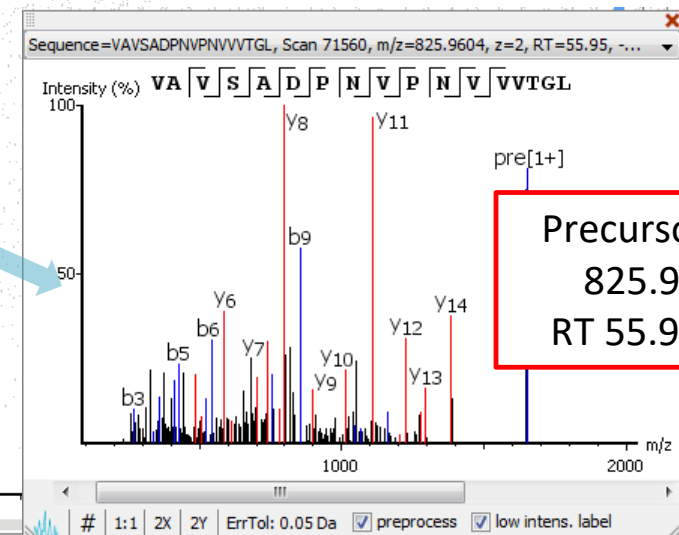
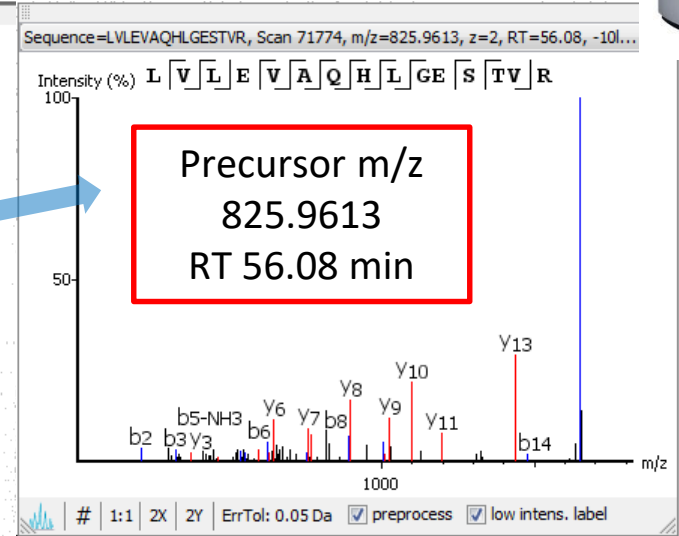
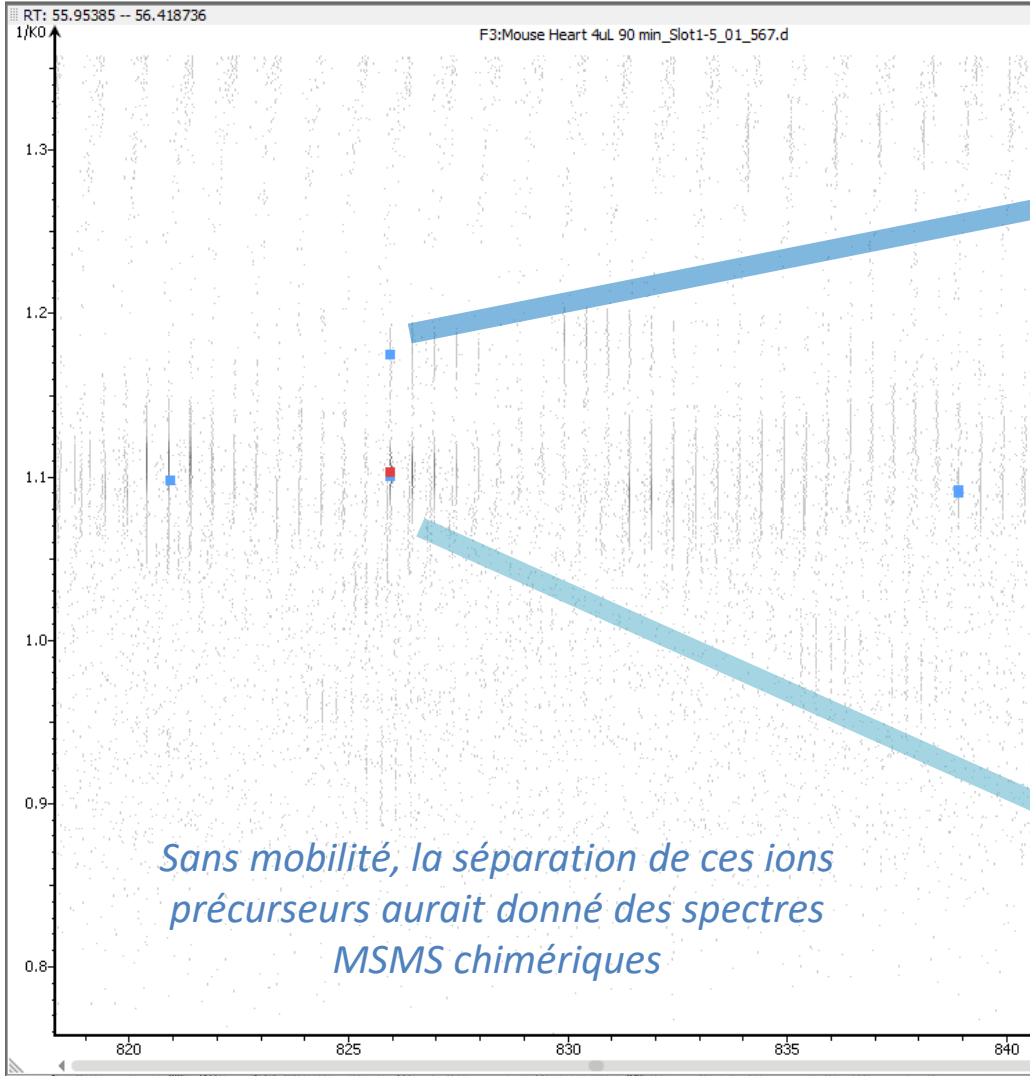
Spectre complet

Sans mobilité, un peptide n'aurait pas été détecté en MSMS



❖ Séparation de peptides tryptiques isobariques en co-élution

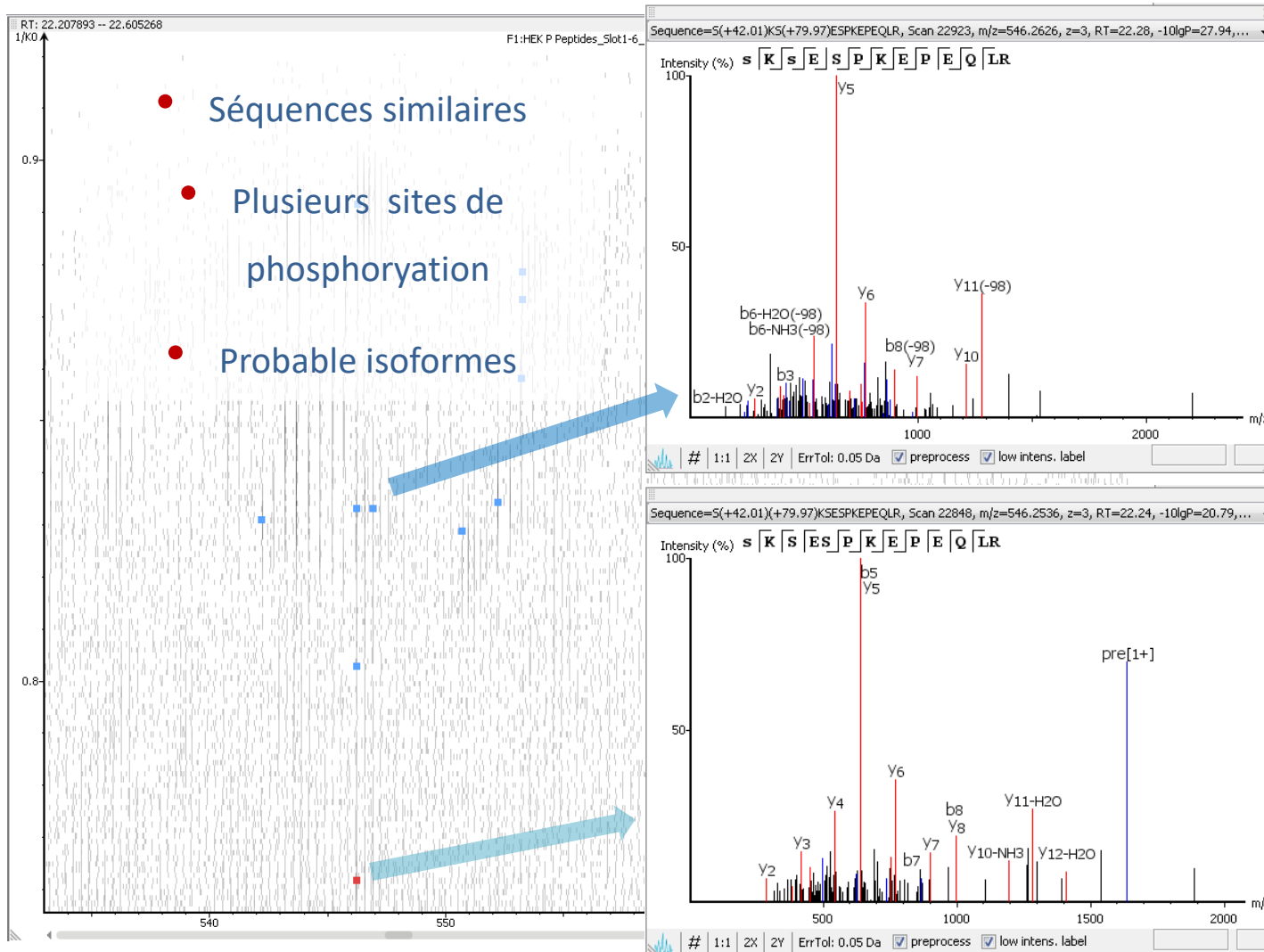
$\Delta m/z = 0,9 \text{ mDa} \rightarrow R > 900\,000$





❖ Séparation de peptides tryptiques isobariques en co-élution

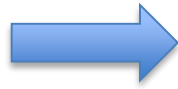
HEK phosphopeptides isobariques et co-élus → Régioisomères !!





❖ Séparation de peptides tryptiques isomères en mélange

Séquence Peptidique
PFGK



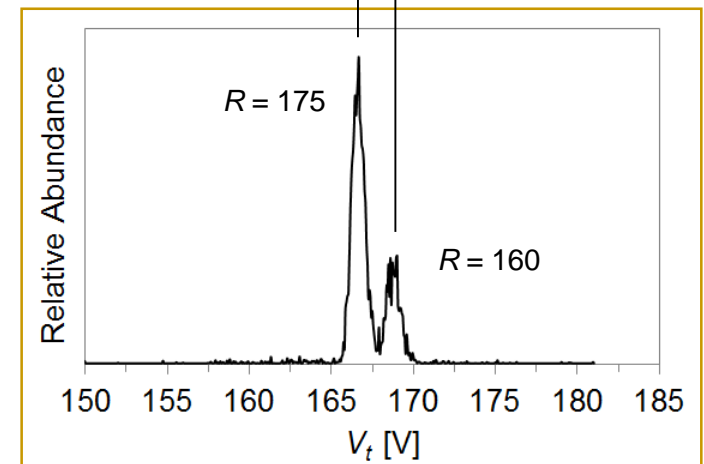
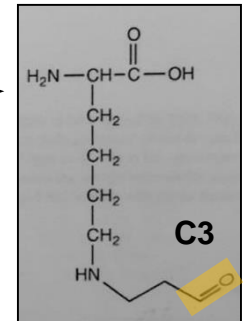
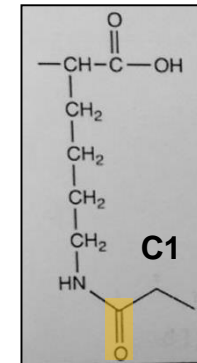
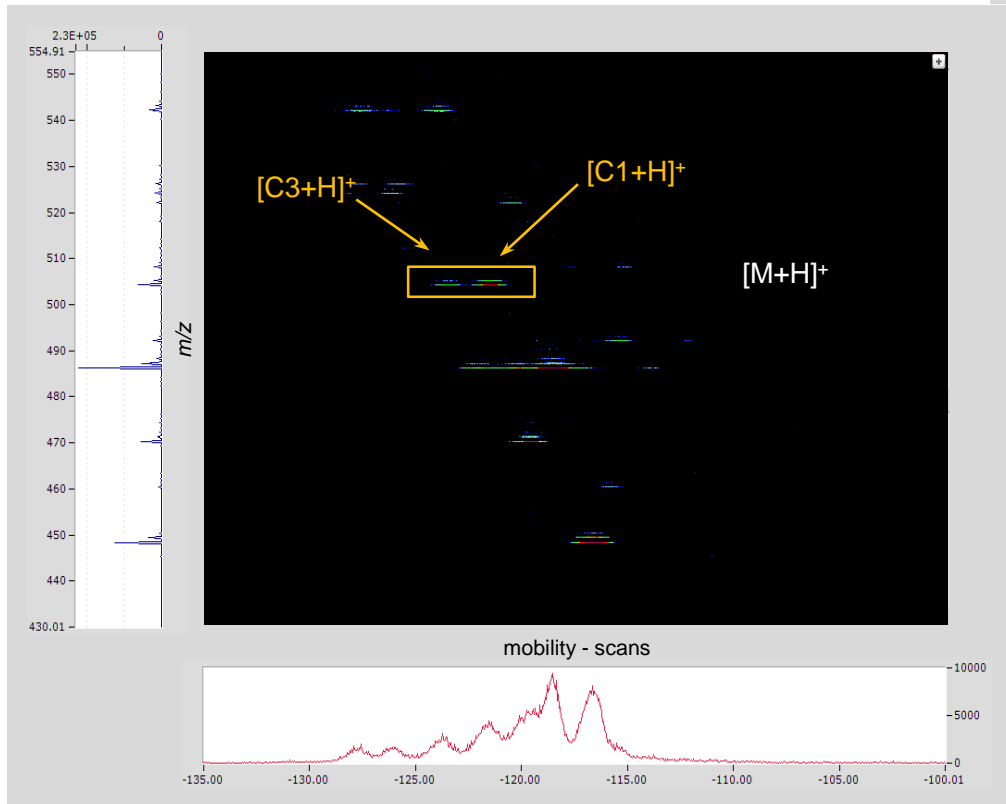
Mass shift de 56.03 Da → PTM



Lysine propionylation (C1) ou propanal (C3) carbonyl acylation ?

différences en mobilité de seulement 1%

Comment distinguer 2 régioisomères en MS ?

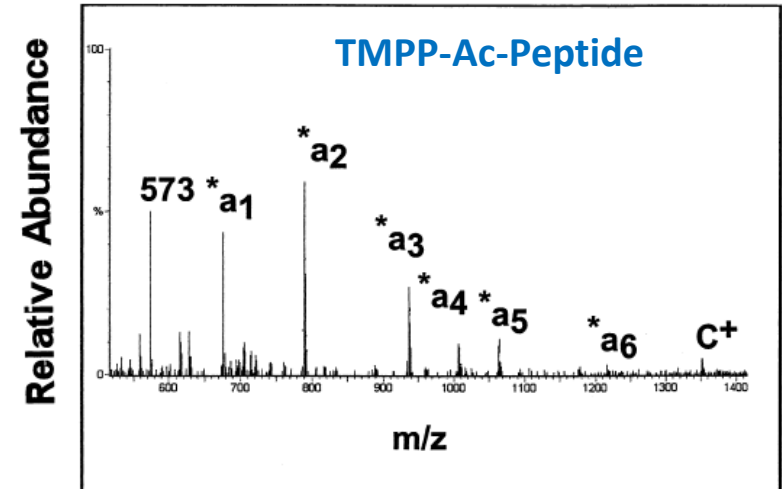
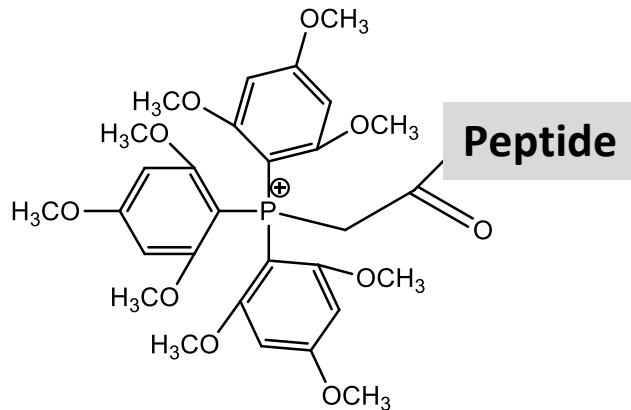


❖ Dérivatisation par groupement chargé: Modulation détection / séquençage

- ➔ **N-terminal:** Ammonium et phosphonium quaternaire
- ➔ **C-terminal / chaîne latérale**

❖ Analyse par spectrométrie de masse de peptides à charge piégée

- ➔ Ion préformé
- ➔ Pas de proton mobile
- ➔ Fragmentation CRF



K. D. Roth, Z-H. Huang, N. Sadagopan, J. T. Watson, *Mass Spec. Rev.* 1998, 17, 255-274.

Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry.

P-C. Liao, Z-H. Huang, J. Allison. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 1997, 8, 501-509.

Charge remote fragmentation of peptides following attachment of a fixed positive charge : a matrix-assisted laser desorption/ionisation postsource decay study.

N. Sadagopan, J.T. Watson. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2000, 11, 107-119.

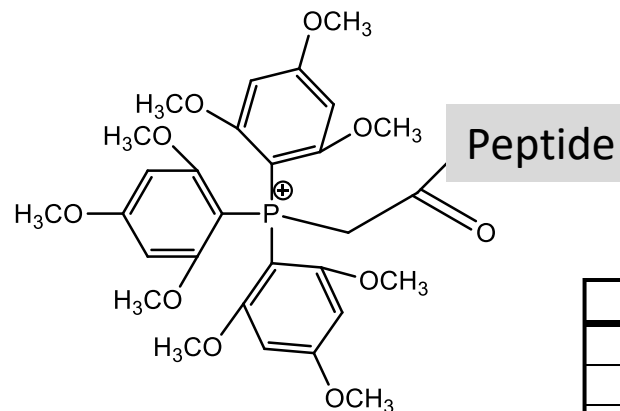
Investigation of the tris(trimethoxyphenyl)phosphonium acetyl charged derivatives of peptides by electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry.

S. Gallien, E. Perrodou, C. Carapito, C. Deshayes, J-M. Reytrat, A.V. Dorsselaer, O. Poch, C. Schaeffer, O. Lecompte. *Genome Res.* 2009, 19, 128-135.

Ortho-proteogenomics: Multiple proteomes investigation through orthology and a new MS-based protocol.

M. Baudet, P. Ortet, J-C. Gaillard, B. Fernandez, P. Guérin, C. Enjalbal, G. Subra, A. de Groot, M. Barakat, A. Dedieu, J. Armengaud, *Molecular and Cellular Proteomics*, 2010, 9, 415-426.

Proteomic-based refinement of *Deinococcus deserti* genome annotation reveals an unwonted use of non-canonical translation initiation codons



➔ Influence de la séquence

Réactivité / Régiosélectivité / Fragmentations

ESI-QqTof & MALDI-Tof/Tof CID & LID/CID

Spectres MS/MS à partir des ions précurseurs monochargés



LC-ESI-QqTOF-IM-MS
(SYNAPT G2-S Waters)

MALDI-LIFT-TOF/TOF (Ultraflex III Bruker)



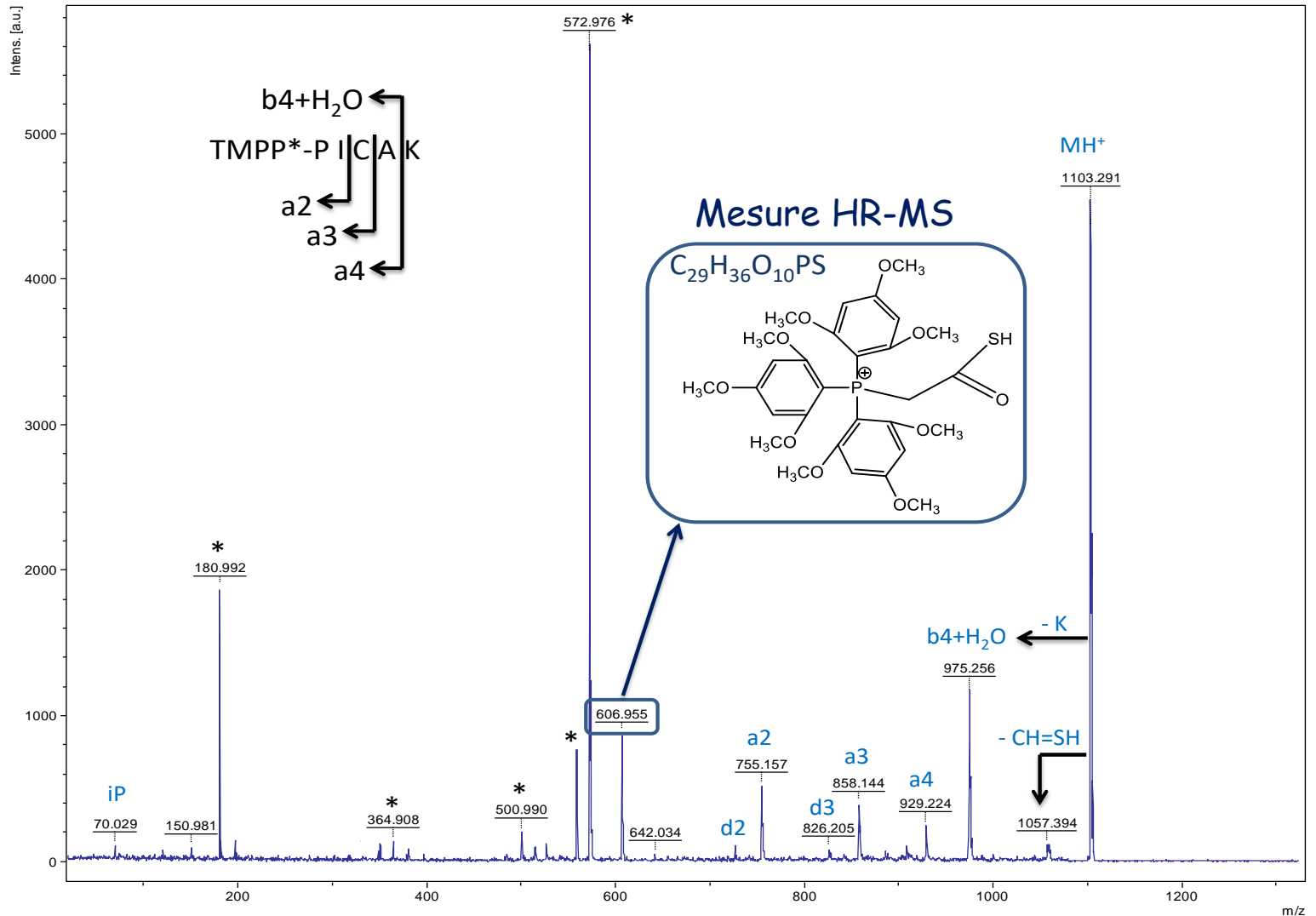
- MALDI-MS/MS
- Laser smartbeam ITM 355 nm, 200 Hz
- Technologie LIFT
- Mode imagerie

N°	Peptides modifié en N-terminal par TMPP	M (g.mol ⁻¹)	Fonction C-Terminale
1	TMPP-P I C A K	1103,29	Acide
2	TMPP-F A Q I R	1206,36	Acide
3	TMPP-A L I A G F V	1262,38	Acide
4	TMPP-F V A E K F A	1383,43	Acide
5	TMPP-W L I A G D R	1402,44	Acide
6	TMPP- G H A P E V R	1450,48	Acide
7	TMPP-Y D T S I V Q K	1525,49	Acide
8	TMPP-Y D T S I V Q R	1553,49	Acide
9	TMPP- G E V A V L G H M K	1612,55	Acide
10	TMPP-A F A L G T I E D K	1636,55	Acide
11	TMPP-A D P N Y H I G E T K	1816,58	Acide
12	TMPP-V L H D F A F A M V G P L A E Y K	2479,97	Acide
13	TMPP-G P L F A V A	1245,36	Amide
14	TMPP-R L A V A I A	1284,44	Amide
15	TMPP-L A V R A I A	1284,44	Amide
16	TMPP-L A V A I A R	1284,44	Amide
17	TMPP-R D A V A I A	1286,39	Amide
18	TMPP-A V A R D I A	1286,39	Amide
19	TMPP-A V A I A R D	1286,39	Amide
20	TMPP-A F I S V G P L A R	1601,46	Amide
21	TMPP-L H F V K M G R A C A I G R	2129,85	Amide
22	TMPP-A L K E F A F I S V G P L A R	2189,87	Amide
23	TMPP-L H F V K M G R A W A I G R	2212,85	Amide

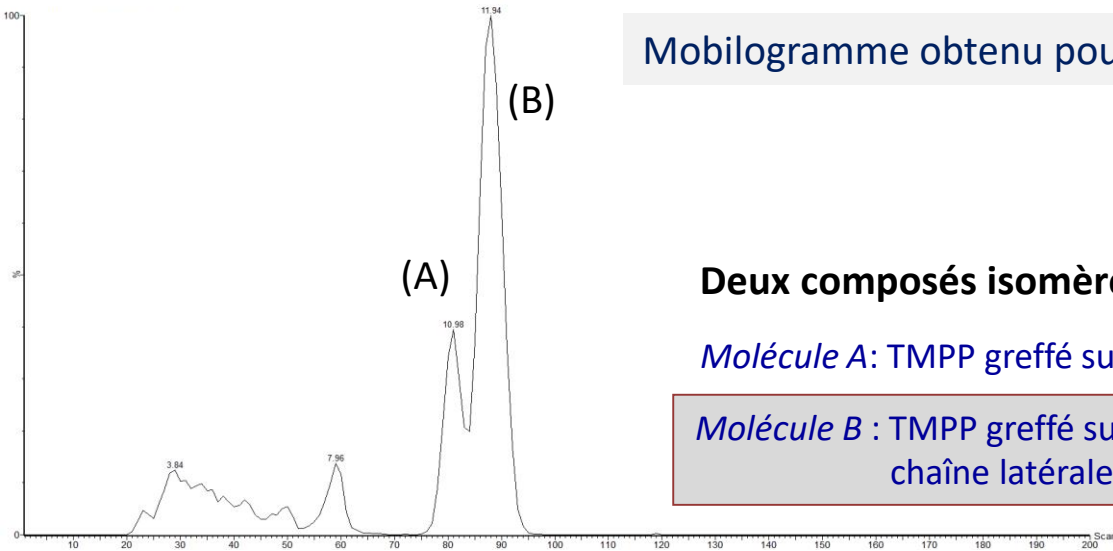
❖ Regiosélectivité de l'acylation par TMPP ?

➔ fonction amine: positions N-terminale (α -NH₂) / position latérale (ϵ -NH₂) ?

➔ fonction thiol : SH₂ (résidu cystéine libre)?



Mobilogramme obtenu pour l'ion 1103.5 Da (TMPP-PICAK)



Deux composés isomères séparés en mobilité ionique

Molécule A: TMPP greffé sur l'amine N-terminale du peptide

Molécule B: TMPP greffé sur le groupement sulfhydryle de la chaîne latérale de la cystéine (C) !!!

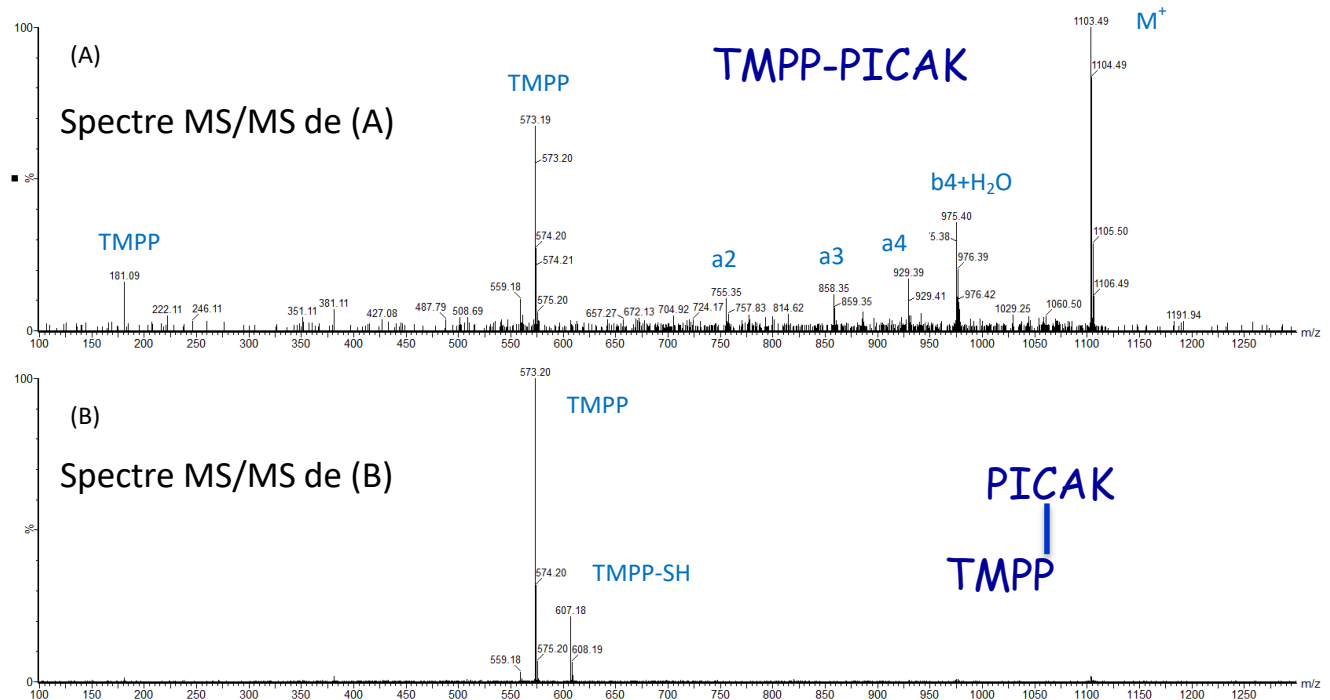


MS/MS

CID

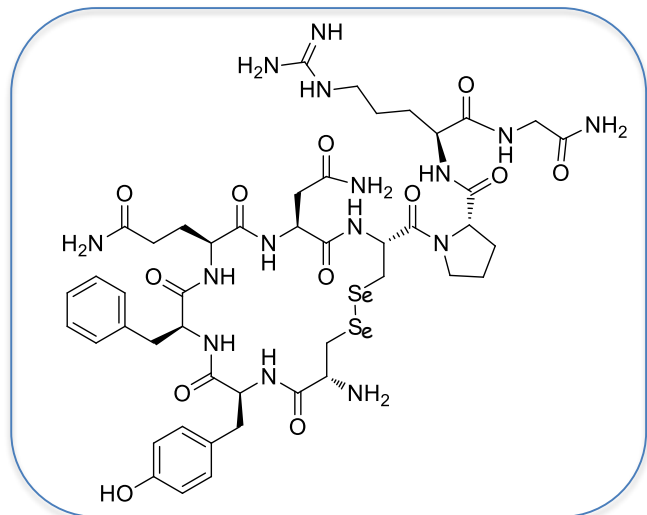
Après la séparation

(Transfer)

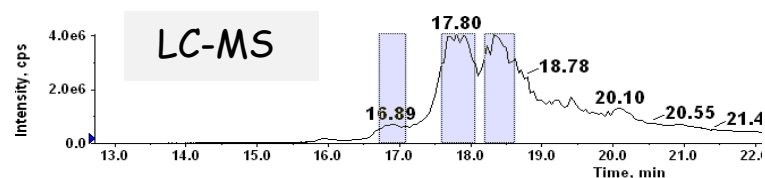
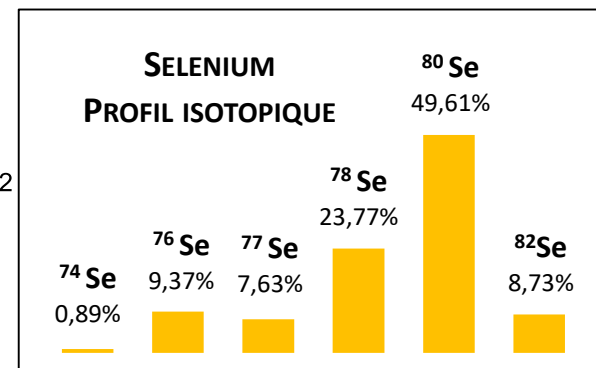


❖ Séparation de cyclopeptides en mélange : Monomère vs dimère ?

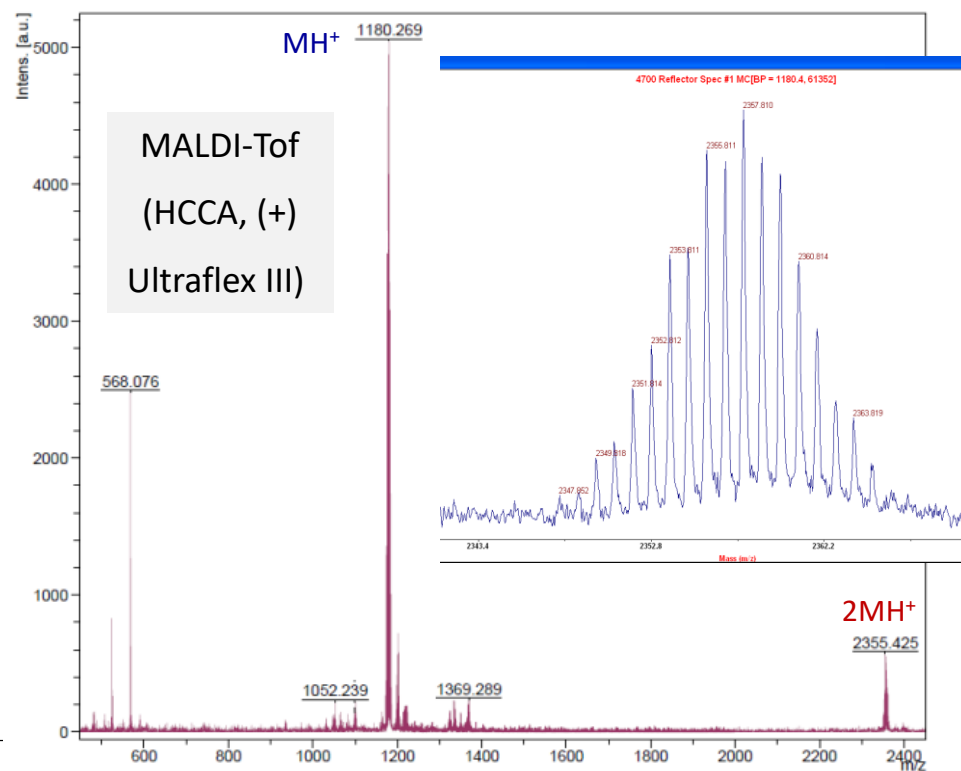
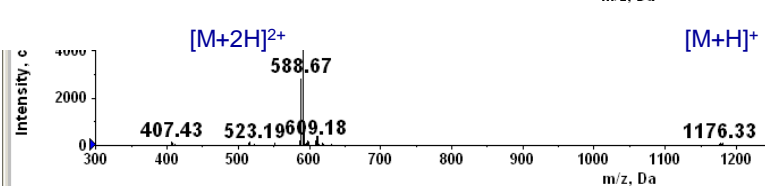
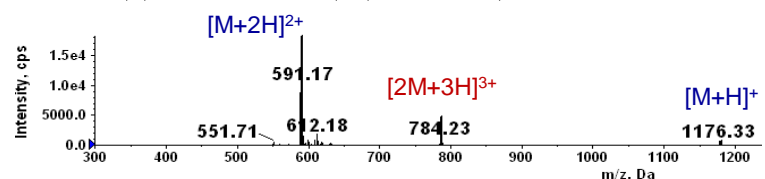
Synthèse de peptides séléniés → [Se-Se]AVP



Sec-Tyr-Phe-Gln-Asn-Sec-Pro-Arg-Gly-NH₂
 (Se-Se)



+TOF MS: Exp 1, 18.1944 to 18.6272 min from Sample 1 (EC 20140428 S NH2 10) of EC 20140428 S NH2 10.viif different calibrat



LC-ESI-MS (TIC → m/z 1180)

Mobilogramme

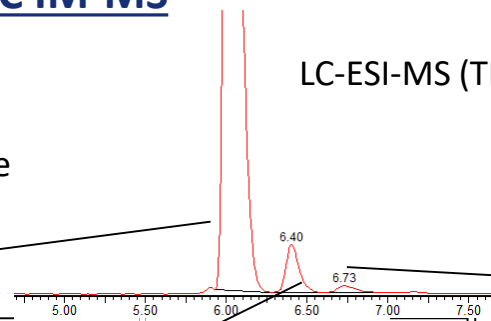
Rt= 6,02 min

Mobilogramme

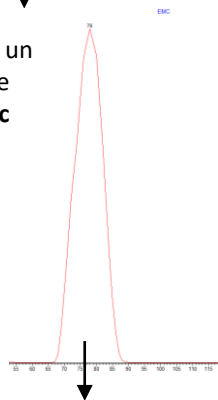
Rt= 6,40 min

Mobilogramme

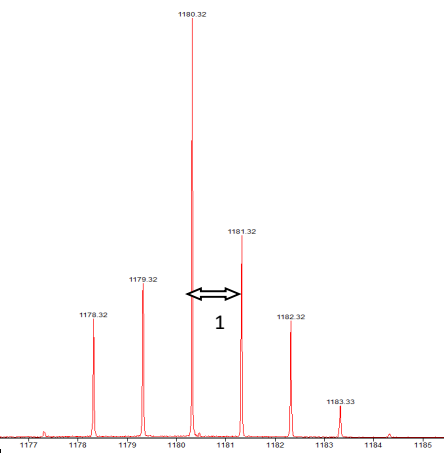
Rt= 6,73 min



1 seul signal pour un temps de dérive (DT) de 78 msec



Massif Isotopique: ion monochargé (Rt = 6,02min, DT 78 msec)



2 signaux

49 msec

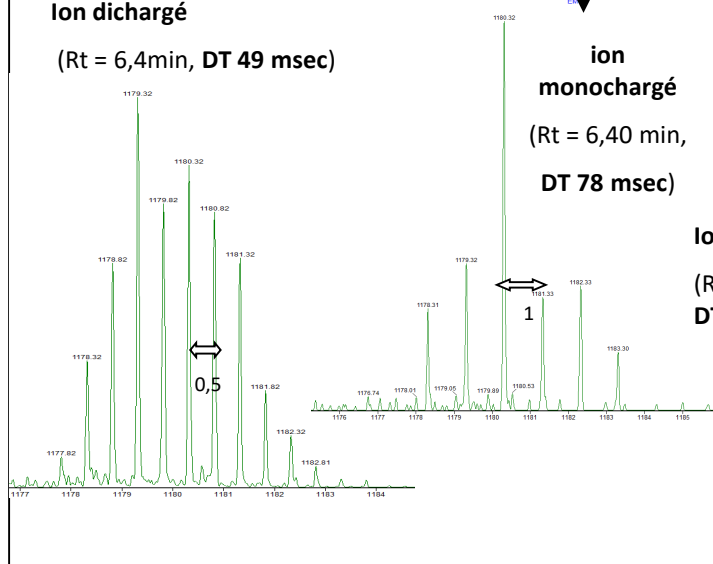
78 msec

Ion dichargé

(Rt = 6,4min, DT 49 msec)

ion monochargé

(Rt = 6,40 min, DT 78 msec)



3 signaux

49 msec

39 msec

78 msec

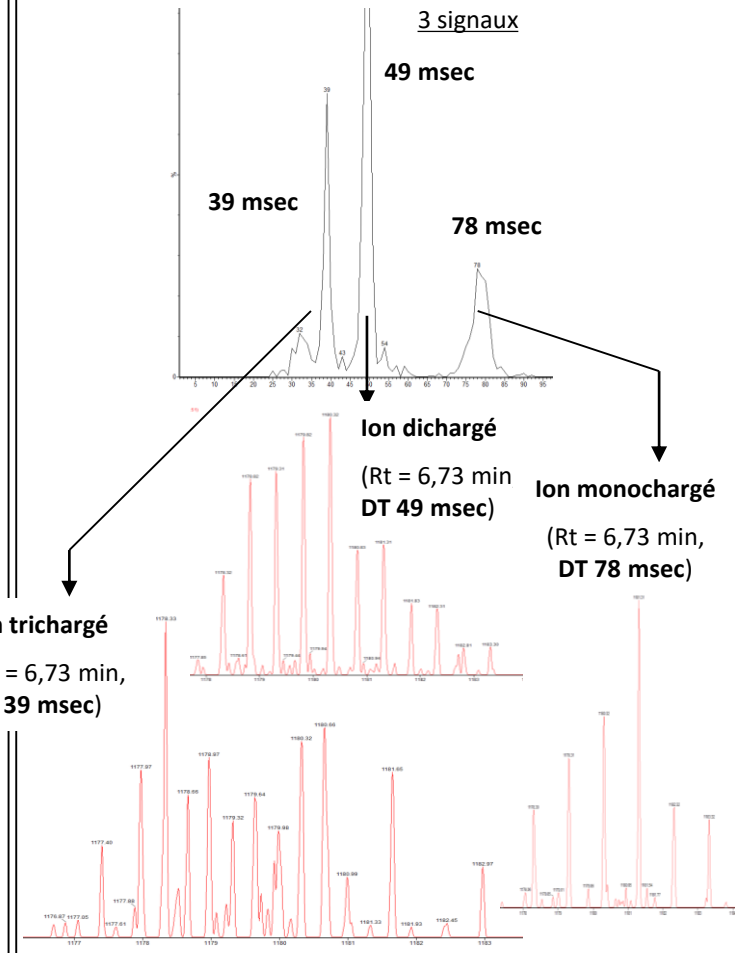
Ion dichargé

(Rt = 6,73 min DT 49 msec)

Ion monochargé (Rt = 6,73 min, DT 78 msec)

Ion trichargé

(Rt = 6,73 min, DT 39 msec)



❖ Contrôle Qualité de protéines : Folding ?

Standard Hepcidine commerciale : Aliquot de 100 ug dissous dans 400ul (ACN/H₂O, 20/80)

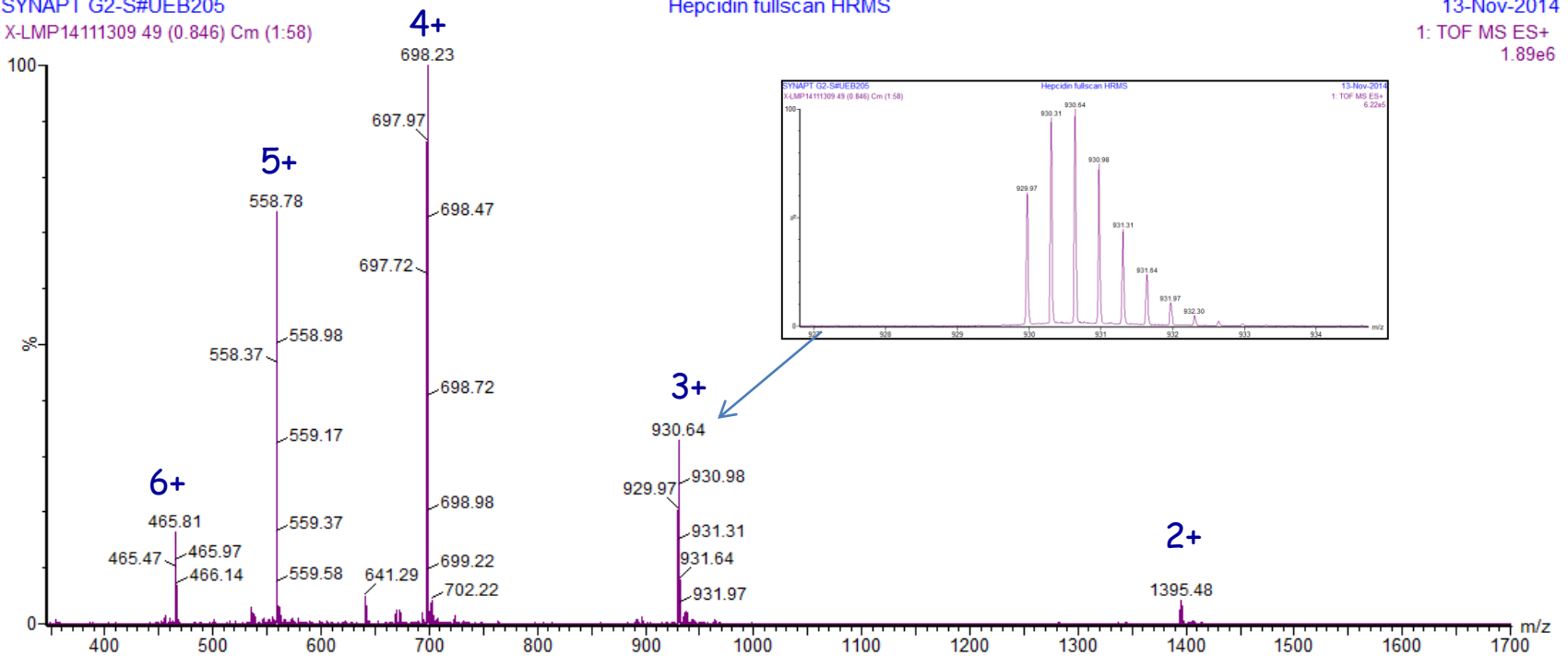
- Infusion à 5ul/min

Full scan :

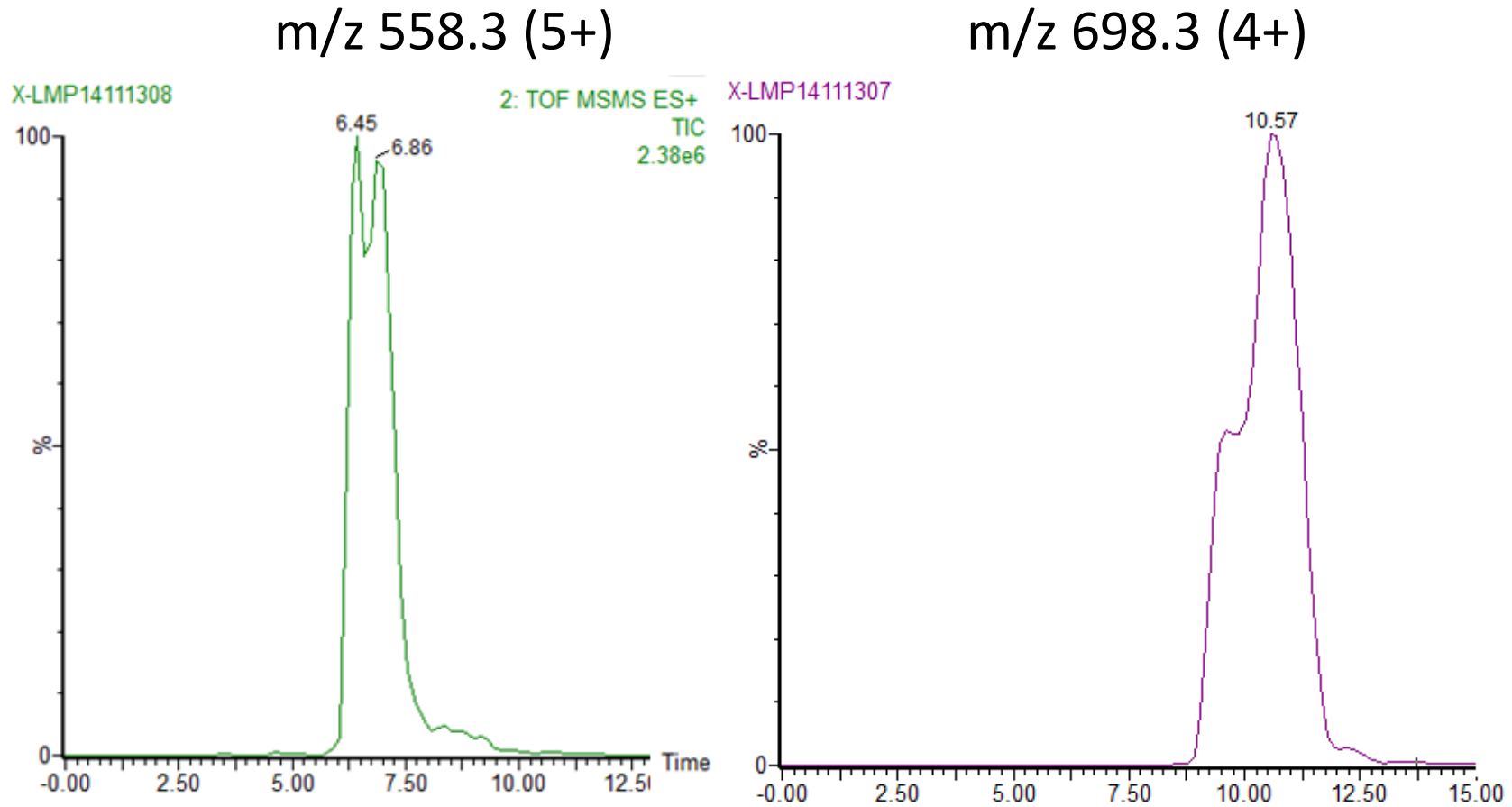
SYNAPT G2-S#UEB205
X-LMP14111309 49 (0.846) Cm (1:58)

Hepcidin fullscan HRMS

13-Nov-2014
1: TOF MS ES+
1.89e6



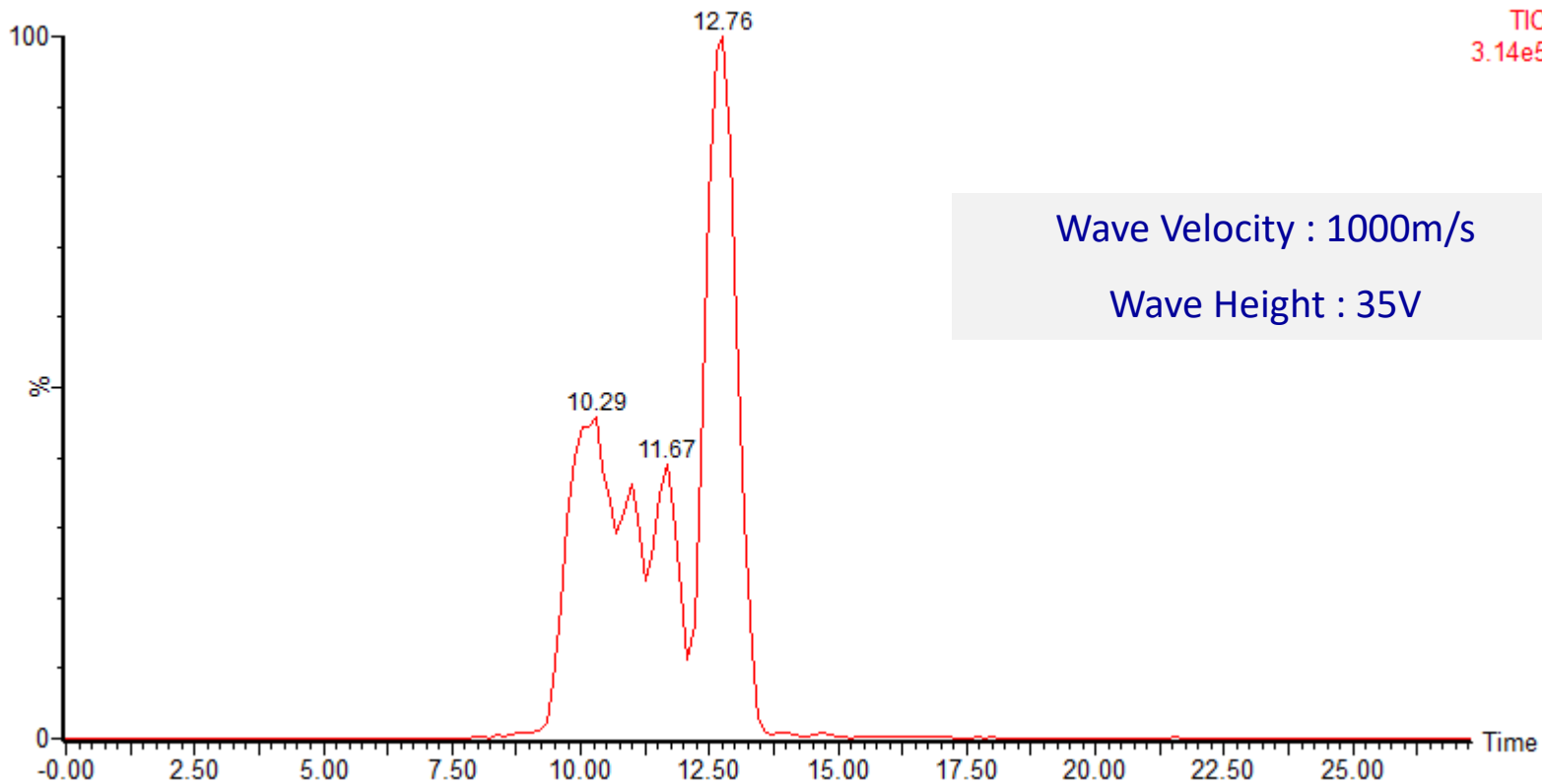
- Sélection des ions à différents états de charges (Q)
- Séparation en mobilité ionique → mobilogrammes



➤ 930.5 (3+) :

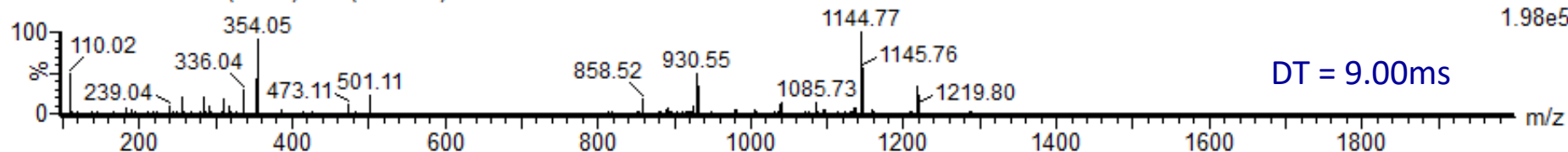
X-LMP14111306

2: TOF MSMS ES+
TIC
3.14e5

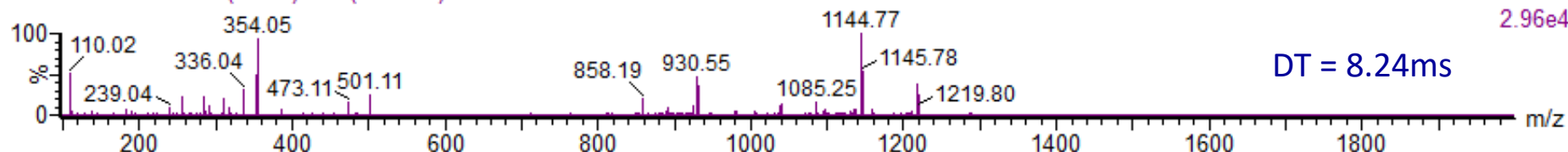


Tentative de fragmentation de cet ion après la cellule de mobilité ionique (CID en transfer) de façon à obtenir les spectres MS/MS de chacun des isomères

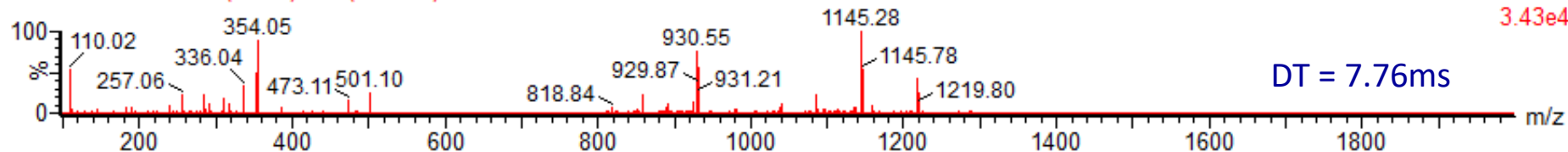
X-LMP14111310 131 (9.002) Cm (129:133)

2: TOF MSMS 930.50ES+
1.98e5

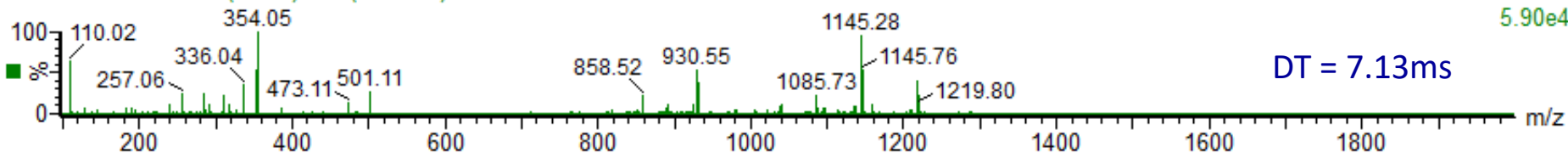
X-LMP14111310 120 (8.241) Cm (119:120)

2: TOF MSMS 930.50ES+
2.96e4

X-LMP14111310 113 (7.756) Cm (111:113)

2: TOF MSMS 930.50ES+
3.43e4

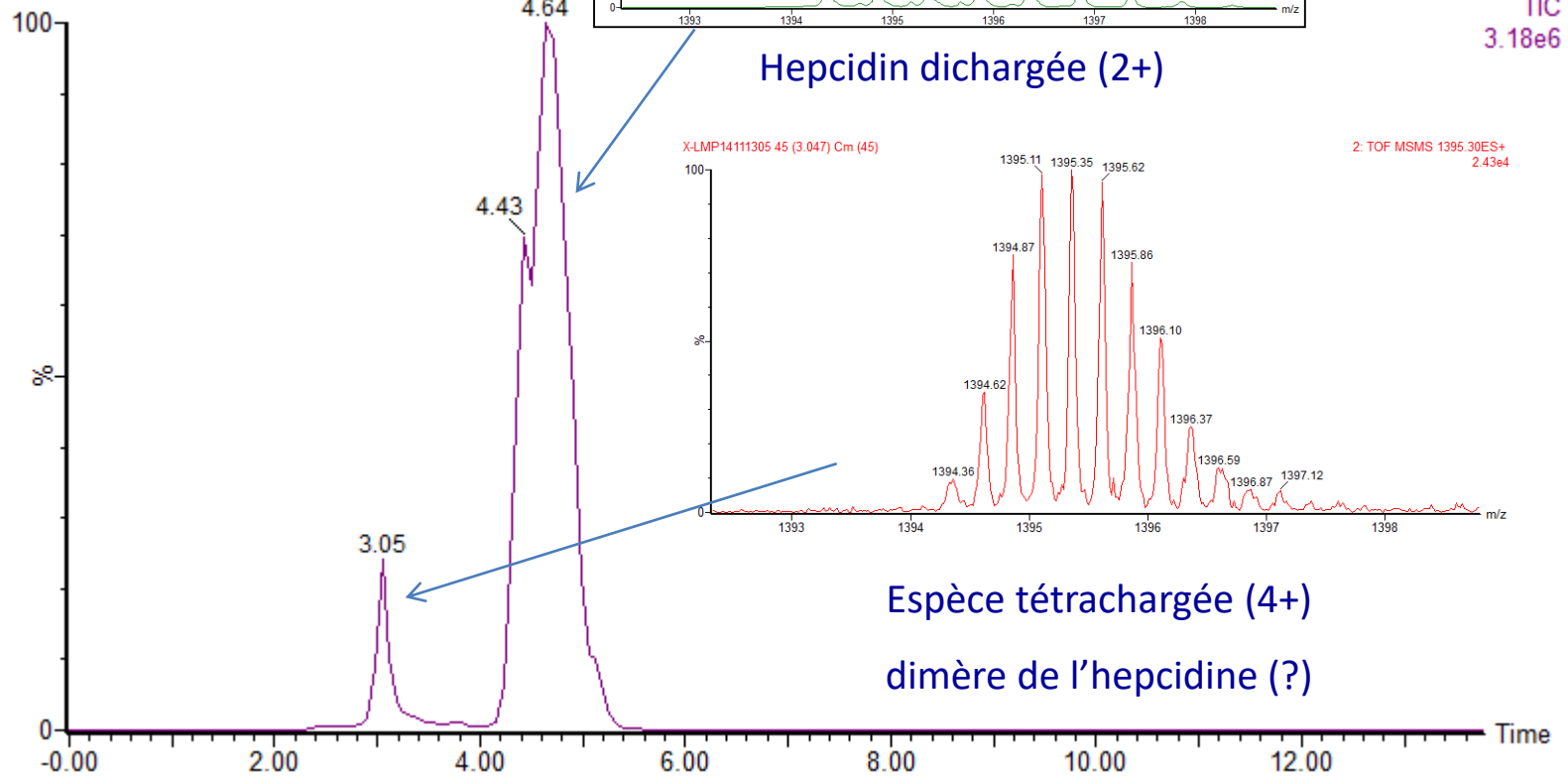
X-LMP14111310 104 (7.133) Cm (102:105)

2: TOF MSMS 930.50ES+
5.90e4

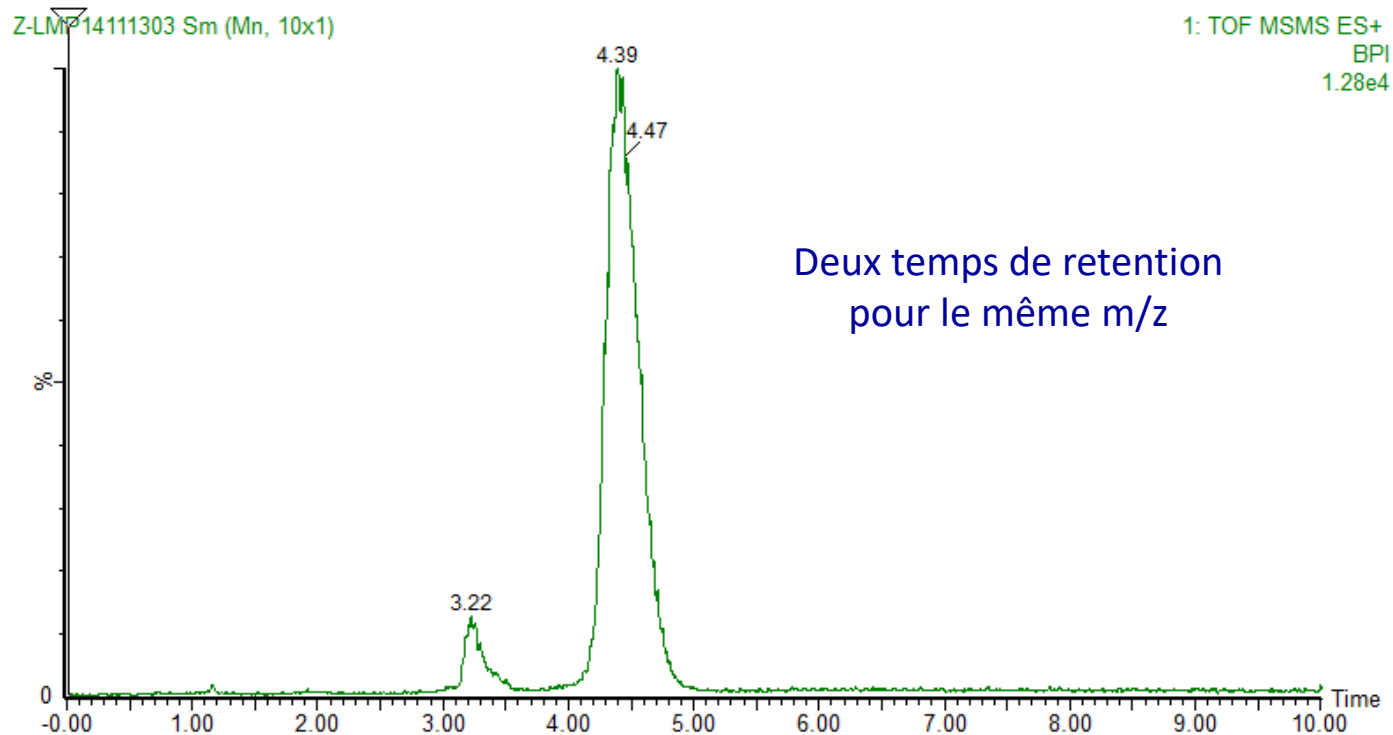
Aucune différence de fragmentation pour les quatre ions (Ecoll = 45eV)

➤ 1395.3 (2+) :

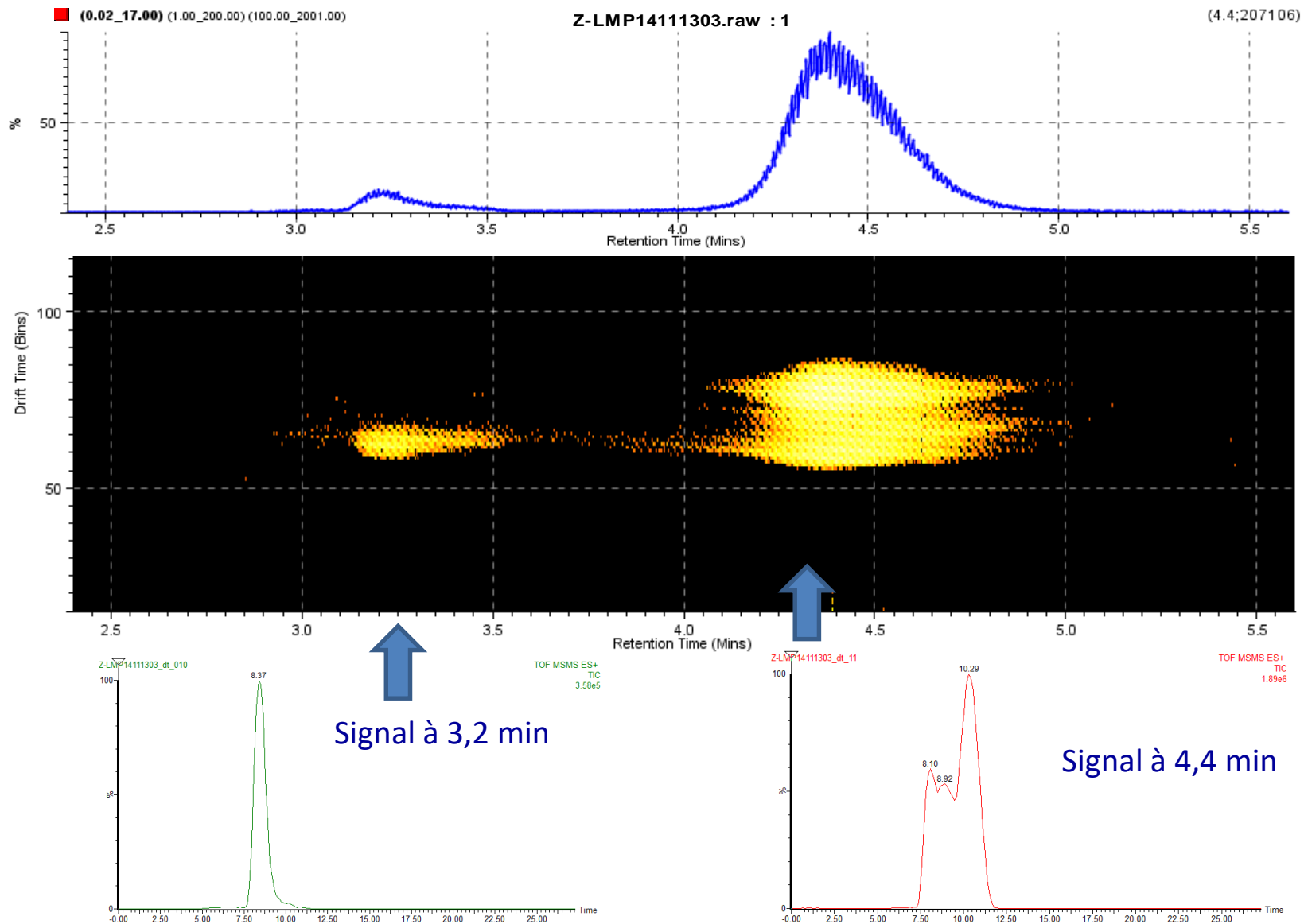
X-LMP14111305



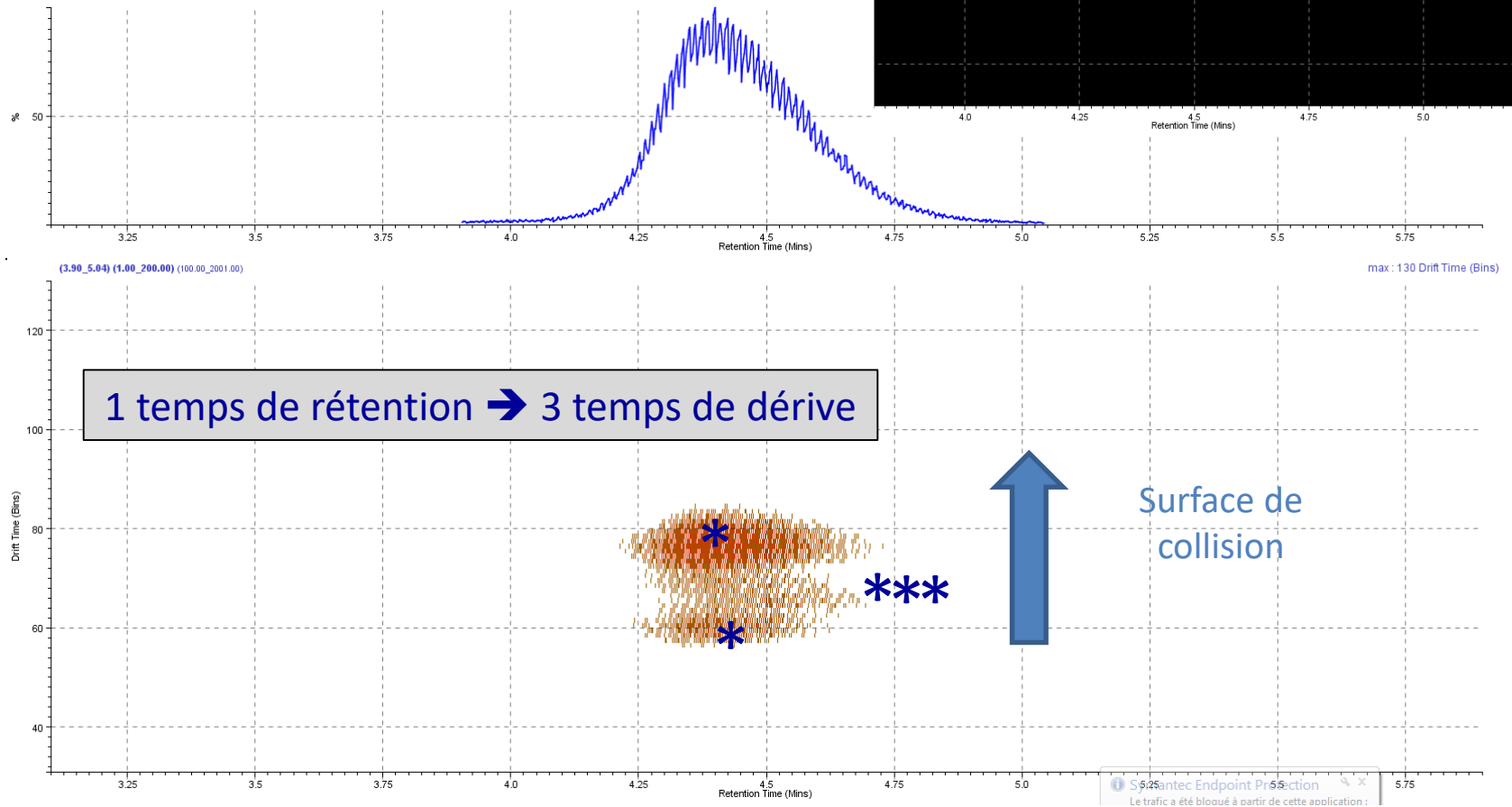
- Passage en **LC-IM-MS** avec colonne Eclipse plus C18 RRHD 1.8 μ m, 2.1x150mm
- A : H₂O+0.01% acide formique, B : ACN + 0.01% acide formique
- Gradient de 17 à 30% de B en 10 min
- Débit 0.4ml/min
- Volume injection 1 μ l
- Quadripôle en filtre sur l'ion trichargé: 930.5 Da
- Séparation en mobilité ionique avec les paramètres définis lors de l'infusion



Séparation en mobilité ionique aux différents temps de rétention



Signal à 4,4 min

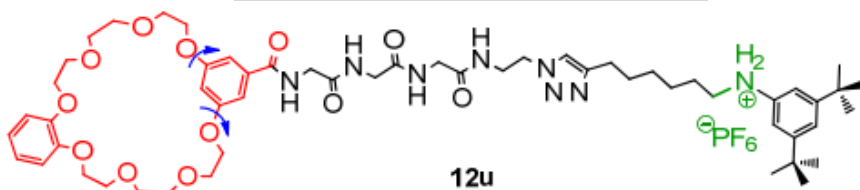


Mesure des CCS (collisional cross section) après étalonnage
de la cellule de mobilité ionique

Machine supramoléculaire

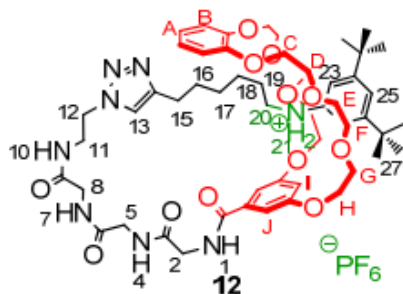
Collaboration F. Coutrot/IBMM, Université de Montpellier, Synapt G2S Waters

Molécule forme étendue

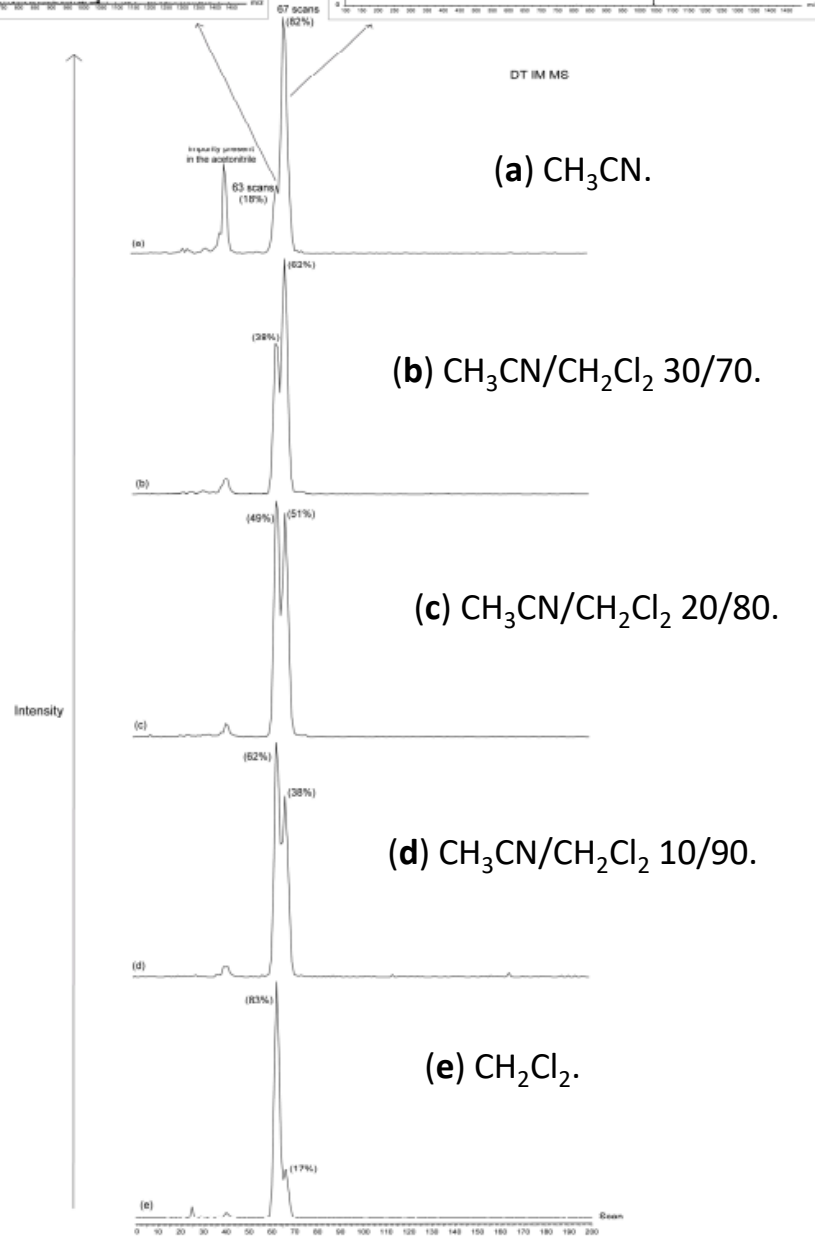
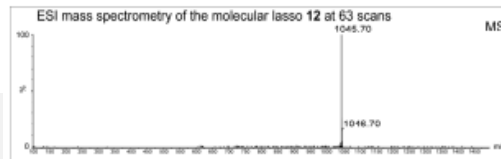


Self-entanglement
via bonds rotation

slow on the NMR time scale
 $12/12u$ ratio depending on solvent and concentration



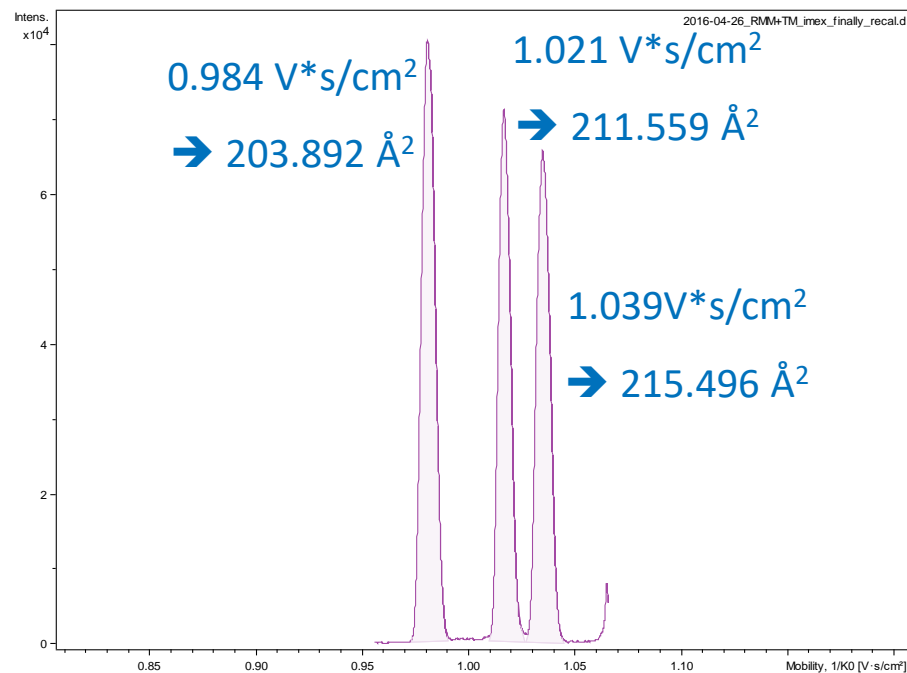
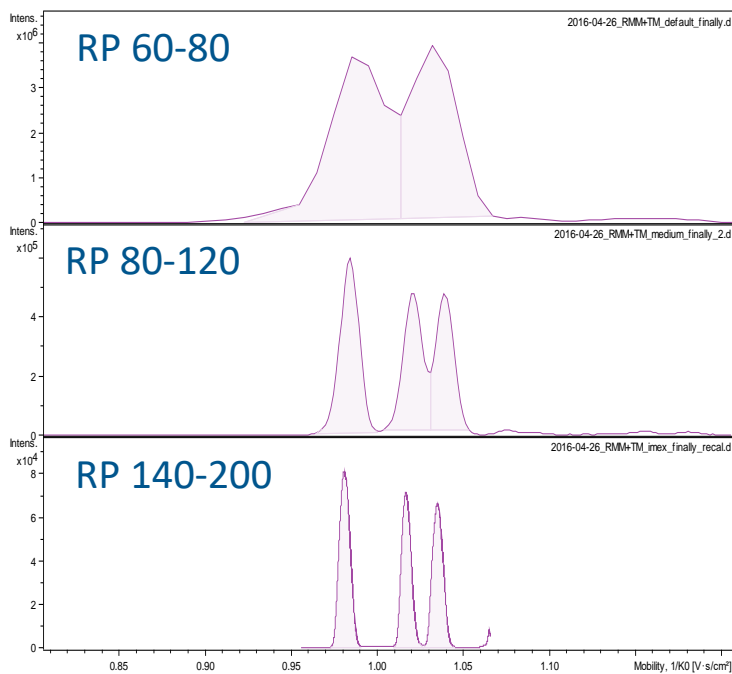
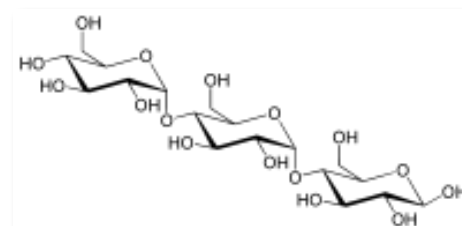
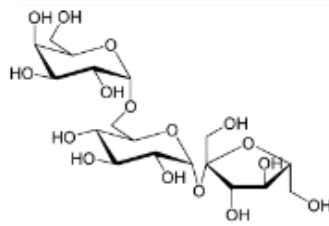
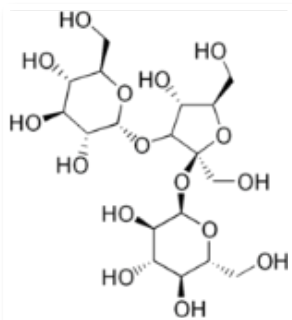
Molécule forme repliée



❖ Analyse de carbohydrates

D'après Y. Hébert, Bruker, **timsTOF**

Séparation de 3 carbohydrates: Melezitose, Raffinose & Maltotriose

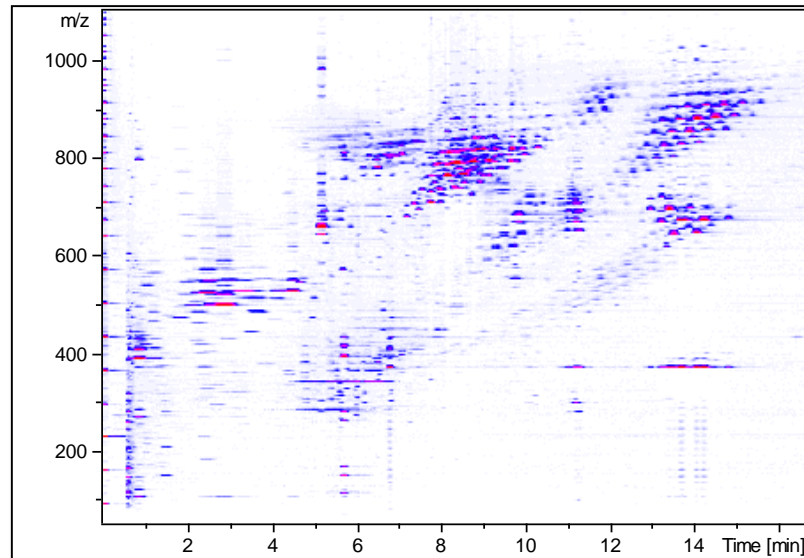
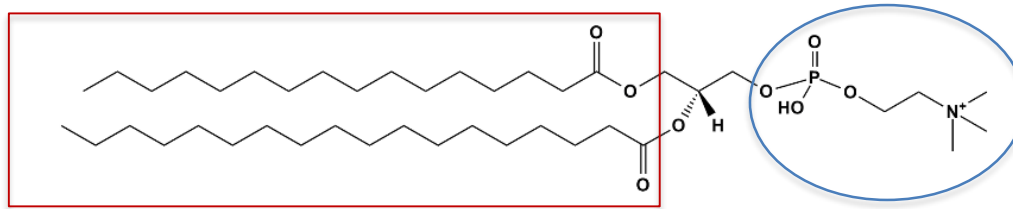


Résolution ajustable

CCS déterminées avec une grande reproductibilité
(< 0.5 % RSD)

❖ Analyse de lipides

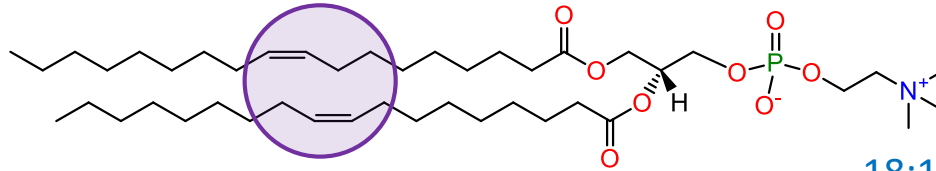
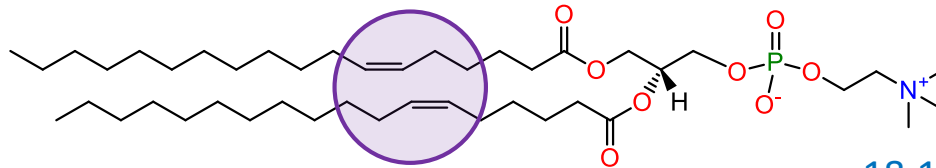
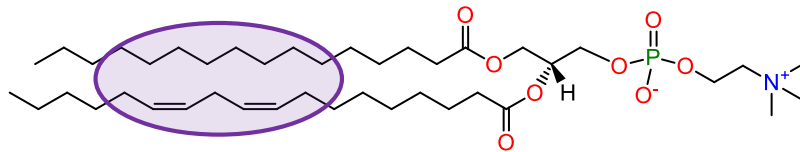
Phospholipides : **Tête polaire** et **chaînes aliphatiques** → Grande diversité moléculaire



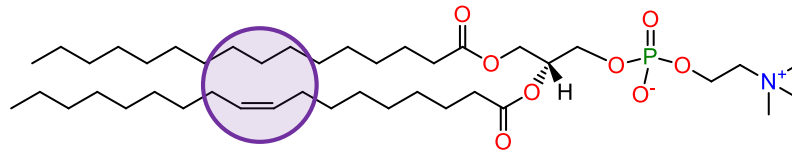
Analyse complexe → Spectres MS/MS non chimériques

❖ Analyse de lipides

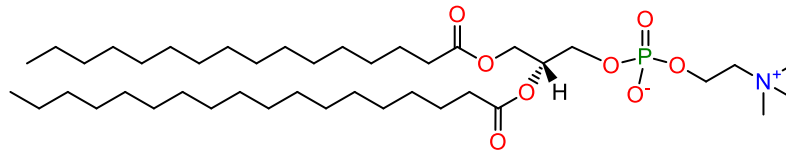
PC = Phosphatidylcholine

18:1 ($\Delta 9$ -cis) PC18:1 ($\Delta 6$ -cis) PC

16:0-18:2 PC



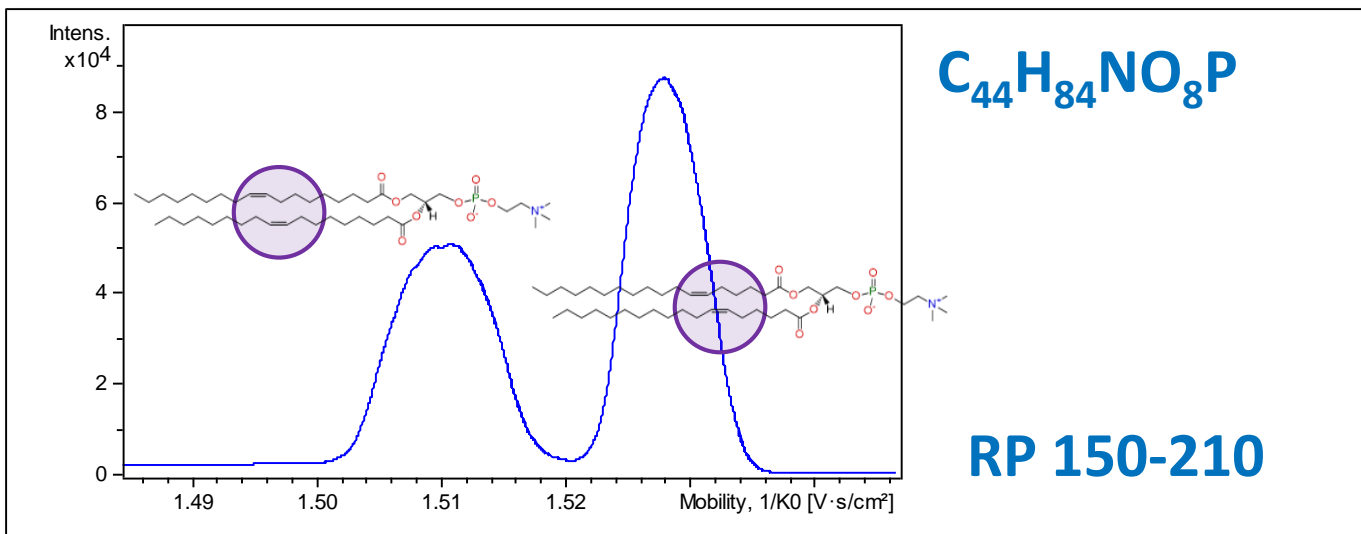
16:0-18:1 PC



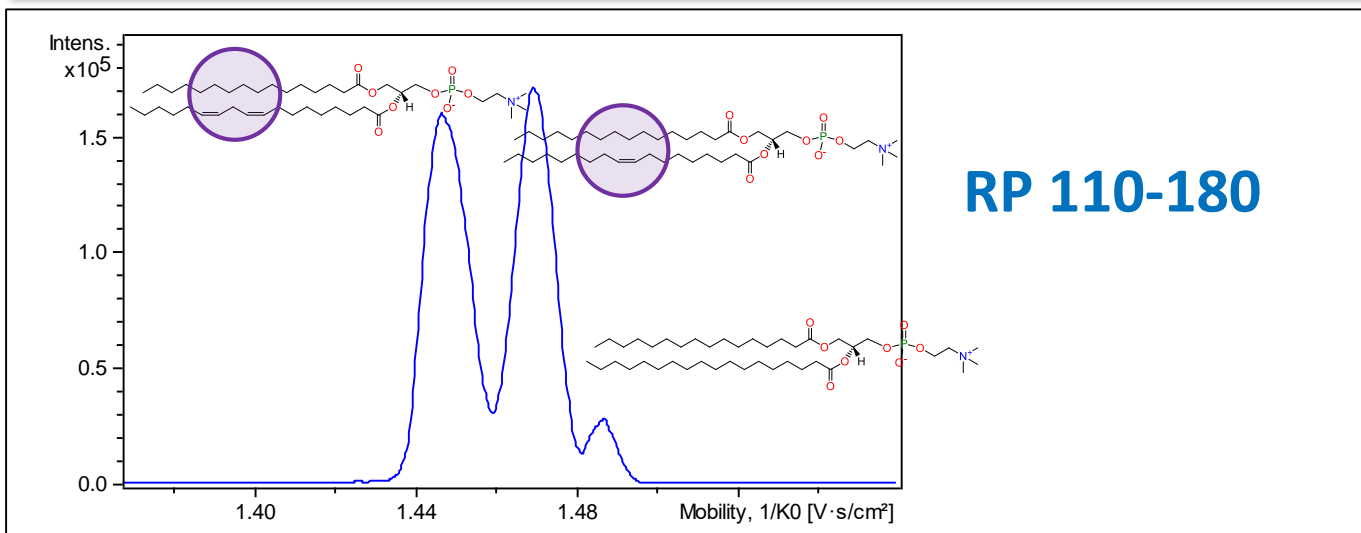
16:0-18:0 PC

Lipides
IsomèresMassifs
isotopiques en
superpositions
partielles

❖ Analyse de lipides

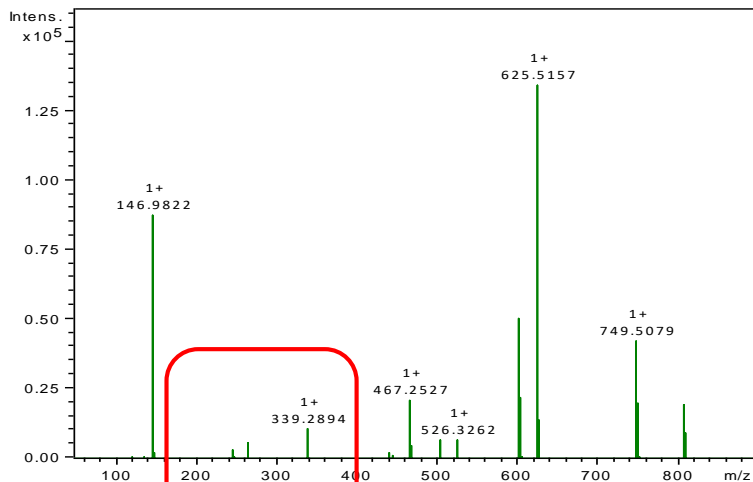


Lipides
Isomères



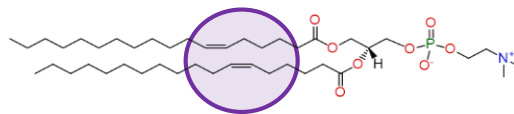
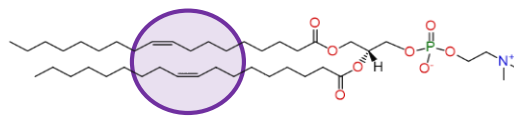
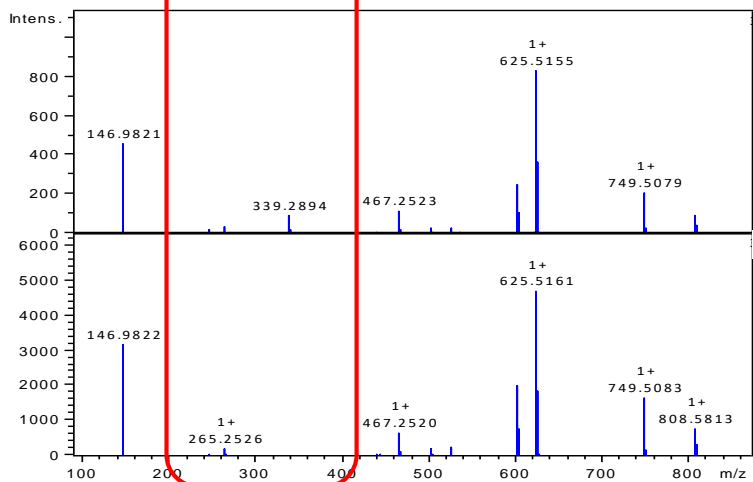
Massifs
isotopiques en
superpositions
partielles

❖ Analyse de lipides



2 Lipides
isomères

Spectre MS/MS



Spectres MS/MS
après
séparation IM

Remerciements

IBMM, Equipe F12 Sciences Analytiques

Groupe de spectrométrie de masse

Thésards

Sonia Cantel
Sébastien Dutertre
Christine Enjalbal
Pierre Sanchez

Delphine Maux (1999-2002)
Laetitia Mouls (2002-2005)
Nawar Shenar (2005-2008)
Mathieu Dupré (2009-2012)
Emmanuelle Cordeau (2013-2016)
Maxime Rossato (2013-2016)
Julien Giribaldi (2016-2019)
Rosanna Mary (2016-2019)



Plateforme d'analyse et de Caractérisation (PAC)

Nacelle de Spectrométrie de masse

Gilles Valette et Guillaume Cazals



Collaborations

CEA Marcoule – Jean Armengaud & Bernard Fernandez

CHU de Montpellier, St Eloi – Jérôme Vialaret, Christophe Hirtz & Sylvain Lehmann

IBMM – Gilles Subra

