

TABLE DES MATIÈRES

ABBREVIATIONS.....	1
PUBLICATIONS.....	2
COMMUNICATIONS.....	3
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	5
 CHAPITRE I: APPORT DE LA MOBILITÉ IONIQUE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE POUR DANS ANALYSES MÉTABOLOMIQUES...	9
Introduction du Chapitre I.....	11
<i>Different ion mobility-mass spectrometry coupling techniques to promote metabolomics.</i>	12
1. Introduction.....	12
2. An overview of metabolomics including commonly used analytical techniques.....	13
3. IM-MS instrumentation for metabolomics.....	16
4. Coupling ion mobility spectrometry with different MS based methods.....	23
5. Factors influencing the ion mobility selectivity.....	30
6. Data mining and metabolite identification.....	34
7. Conclusion and perspectives.....	42
Conclusion du Chapitre I.....	44
 CHAPITRE II : SÉPARATION DE MÉTABOLITES ISOMÈRES ET ANALYSE EN MATRICES COMPLEXES.....	45
Introduction du Chapitre II.....	47
<u>II-1. Analyse d'isomères d'oestrogènes dans l'urine humaine.....</u>	<u>50</u>
<i>An emerging powerful technique for distinguishing isomers: trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of estrogen isomers.....</i>	<i>51</i>
1. Introduction.....	51
2. Experimental.....	54
3. Results and discussion.....	56
4. Conclusion.....	64
<i>Supporting Information.....</i>	<i>66</i>

<u>II-2. Analyse des HMOs dans le lait maternel</u>	72
II-2A. Etude préliminaire sur quatre couples d'isomères.....	75
<i>Trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for high throughput and high resolution characterization of human milk oligosaccharide isomers</i>	75
1. Introduction.....	76
2. Experimental section.....	79
3. Results and discussion.....	82
4. Conclusion.....	94
<i>Supporting Information</i>	95
II-2B. Etude étendue des HMOs communément présents dans le lait maternel.....	108
Conclusion du Chapitre II.....	126
 CHAPITRE III : CRÉATION D'UNE BASE DE DONNÉES DE VALEURS CCS DE MÉTABOLITES STANDARDS	127
Introduction du Chapitre III.....	129
<i>Creation of a Collisional Cross Section database to support metabolomics analyses and identification using trapped ion mobility-mass spectrometry</i>	130
1. Introduction.....	130
2. Materials and methods.....	133
3. Results and discussion.....	135
4. Conclusion.....	143
<i>Supporting Information</i>	145
Conclusion du Chapitre III.....	150
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	153
RÉFÉRENCES	156
ANNEXE : Principe de fonctionnement de la cellule TIMS (Trapped Ion Mobility Spectrometry)	167

ABBREVIATIONS

ACN: Acetonitrile
CCS: Collisional Cross Section
CID: Collision-Induced Dissociation
DIMS: Direct Injection Mass Spectrometry
DTIMS: Drift Tube Ion Mobility Spectrometry
ESI: ElectroSpray Ionization
FAIMS: Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry
FIA: Flow Injection Analysis
FTICR: Fourier Transform Ion Cyclotronic Resonance
GC: Gas Chromatography
HMO: Human Milk Oligosaccharide
HPLC: High Pressure Liquid Chromatography
HRMS: High Resolution Mass Spectrometry
ICC: Ion Charge Control
IMS: Ion Mobility Spectrometry
IM-MS: Ion Mobility-Mass Spectrometry
LC: Liquid Chromatography
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MeOH: Methanol
MS: Mass Spectrometry
MS/MS: tandem Mass Spectrometry
NMR: Nuclear Magnetic Resonance
RSD: Relative Standard Deviation
RT: Retention Time
TIMS: Trapped Ion Mobility Spectrometry
TOF: Time Of Flight
TWIMS: Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry

PUBLICATIONS

A. Delvaux, E. Rathahao-Paris, S. Alves. An emerging powerful technique for distinguishing isomers: Trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of estrogen isomers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (2020) 34:e8928. doi:10.1002/rcm.8928

Autorship contributions: **A. Delvaux**, Conceptualization and original draft; **E. Rathahao-Paris & S. Alves**, Conceptualization, supervision and review and editing.

A. Delvaux, E. Rathahao-Paris, S. Alves. Different ion mobility - mass spectrometry coupling techniques to promote metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* (2021), 1-27. doi:10.1002/mas.21685

Autorship contributions: **A. Delvaux**, Conceptualization, experimentation, data treatment and original draft; **E. Rathahao-Paris & S. Alves**, Conceptualization, supervision and review and editing.

A. Delvaux, E. Rathahao-Paris, B. Guillon, S. Cholet, K. Adel-Patient, F. Fenaille, C. Junot, S. Alves. Trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for high throughput and high resolution characterization of human milk oligosaccharide isomers. *Analytica Chimica Acta* (2021), 338878. doi:10.1016/j.aca.2021.338878

Autorship contributions: **A. Delvaux**, Conceptualization, experimentation, data treatment and original draft; **E. Rathahao-Paris & S. Alves**, Conceptualization, supervision and review and editing; **B. Guillon & S. Cholet**, Sample preparation; **K. Adel-Patient, F. Fenaille & C. Junot**, Review and editing.

A. Delvaux, E. Rathahao-Paris, S. Alves. Creation of a collisional cross section database to support metabolomics analyses and identification using trapped ion-mobility mass spectrometry. *To be submitted*

Autorship contributions: **A. Delvaux**, Conceptualization, experimentation, data treatment and original draft; **E. Rathahao-Paris & S. Alves**, Conceptualization, supervision and review and editing.

COMMUNICATIONS

A. Delvaux, E. Rathahao-Paris, S. Alves. Development method based on ion mobility spectrometry – mass spectrometry for high throughput and large scale metabolomic analyses. XXIV^{èmes} Réunions du Club Jeune de Spectrométrie de Masse, Quiberon, 18-22 mars 2019.

A. Delvaux, E. Rathahao-Paris, S. Alves. Development method based on ion mobility spectrometry – mass spectrometry for high throughput and large scale metabolomic analyses. 12^{èmes} journées scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Clermont-Ferrand, 21-23 mai 2019.

A. Delvaux, E. Rathahao-Paris, S. Alves. Analyse des oligosaccharides du lait maternel par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse. Séminaire invité auprès du Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, CEA Saclay, 01octobre 2020.

A. Delvaux, E. Rathahao-Paris, S. Alves. Evaluation of the Ion Mobility Spectrometry - Mass Spectrometry (IM-MS) approach for high throughput and large scale metabolomic analyses. 20^{ème} journées de l'école doctorale 406, Sorbonne-Université, 16-17 juin 2021.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La spectrométrie par mobilité ionique (Ion Mobility Spectrometry, IMS) est une technique de séparation des composés gazeux sous formes chargés qui analyse leur mobilité électrophorétique dans un gaz vecteur sous l'influence d'un faible champ électrique (Eiceman et al., 2013). Cette approche s'est énormément développée depuis les années 1960 pour l'analyse de gaz contenant des agents chimiques (Mäkinen et al., 2010) ou encore des explosifs (Ewing et al., 2001). Cet appareillage permet, en effet, une détection rapide (en quelques minutes) des composés d'intérêt et ce même à l'état de traces grâce à la grande sensibilité de la mobilité ionique (Eiceman, 2002). Des instruments portatifs avec des interfaces simplifiés et des composés de calibrations inclus dans l'appareillage ont ainsi été développés permettant leurs utilisations par des personnels non scientifiques et continuent aujourd'hui encore d'être utilisés dans les aéroports, lors d'événements scientifiques ou même sur des zones de combats. Depuis cette époque, le développement des méthodes d'ionisation dites douces telles que les sources ESI (Electrospray ionization) et MALDI (Matrix assisted laser desorption ionization) ont permis d'étendre les applications de cette technique non plus uniquement à des composés gazeux et volatils mais également à des échantillons plus ou moins complexes à l'état liquide ou solide contenant des composés polaires de hautes masses moléculaires. L'analyse par mobilité ionique a ainsi pu s'ouvrir à d'autres domaines tels que l'étude des systèmes biologiques, le diagnostic clinique ou encore les sciences environnementales (Eiceman et al., 2013).

Le développement de la mobilité ionique a également été rendu plus attractif en intégrant les cellules de mobilité avec des spectromètres de masse (ion mobility-mass spectrometry, IM-MS), où la cellule est implémentée après la source d'ionisation. En effet, la séparation par mobilité ionique s'effectue sur l'échelle de la milliseconde, tandis qu'une séparation par spectrométrie de masse prend quelques microsecondes, rendant le couplage de ces deux techniques idéal. Bien que le principe de séparation de ces deux approches est similaire vu qu'elles utilisent chacune des champs électriques, en spectrométrie de masse elle s'effectue avec des conditions de vide poussé pour éviter tout frottements tandis qu'un gaz vecteur participe à la séparation par mobilité ionique dans des conditions de plus haute pression. Ainsi, ces deux techniques analytiques bien que similaires restent complémentaires, la spectrométrie de masse séparant les espèces chargées selon le rapport masse sur charge tandis que la mobilité ionique selon la charge, la taille et la forme des ions (Eiceman et al., 2013). L'équipe de (Clemmer et al., 1995) a été la première à démontrer le potentiel du couplage IM-MS via

l'analyse de conformères de protéines et depuis ces travaux précurseurs, de nombreux instruments commerciaux sont apparus ces dernières années, accélérant encore le développement de cette technique. Il est à noter que chacun de ces instruments IM-MS inclut un type de cellule de mobilité donné i.e. une géométrie de cellule permettant d'obtenir des avantages/inconvénients spécifiques (Dodds and Baker, 2019), points qui seront discutés dans le **Chapitre I**.

Par ailleurs, la séparation par chromatographie liquide (LC, liquid chromatography) s'effectuant en quelques secondes, l'instrumentation IM-MS est fréquemment couplée avec (couplage LC/IM-MS) afin d'effectuer une analyse avec trois types de séparation complémentaires pour un temps d'analyse équivalent à une approche LC/MS classique (Purves, 2018). Ainsi, l'ajout d'une cellule de mobilité ionique, peut se révéler intéressant car les composés co-élus dans la colonne LC (notamment les composés isomères) peuvent être caractérisés, par mobilité ionique (Wu et al., 2020).

En outre, l'ensemble des développements technologiques et notamment au niveau des capacités de séparation des cellules de mobilité ionique, ont augmenté l'intérêt de cette technique vers les sciences omiques telles que la protéomique (Zhong et al., 2012), lipidomique (Harris et al., 2019) ou métabolomique (Delvaux et al., 2021a).

Mon projet de thèse s'inscrit dans le domaine de la métabolomique qui est l'étude des composés biologiques de petites tailles ($<1\text{kDa}$) produits par les cellules ainsi que l'étude des voies métaboliques associées (Patti et al., 2012). Cette étude permet de s'approcher au plus près de l'expression phénotypique car les changements au niveau métabolique peuvent être reliés à des changements physiologiques ou pathologiques. Ainsi, les études métabolomiques se sont énormément développées au cours de ces dernières années. Elles sont de deux types, les analyses non-ciblées (Alonso et al., 2015) permettent d'étudier l'ensemble des métabolites, le métabolome, d'un échantillon donné tandis que les études ciblées permettent de suivre l'évolution d'un ou plusieurs métabolites d'intérêt. A l'heure actuelle, la spectrométrie de masse (MS) est la technique analytique la plus employée avec la Résonnance Magnétique Nucléaire (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) (Smolinska et al., 2012), de par sa très bonne sensibilité qui permet de détecter les métabolites même en faibles concentrations dans des matrices complexes ainsi que de par la possibilité d'études structurales via l'application d'expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Dans ces études, la MS est, généralement, couplée à une technique de séparation de type chromatographique (LC ou GC, gas chromatography) (Haggarty and Burgess, 2017) afin d'améliorer la caractérisation des

composés de mélanes complexes ainsi que pour obtenir un deuxième paramètre d'identification : le temps de rétention, en plus du rapport masse sur charge. Dans ce contexte, l'utilisation d'une approche directe IM-MS est potentiellement intéressante pour des analyses métabolomiques à haut débit, de par son temps beaucoup plus court par rapport à une analyse conventionnelle LC/MS, ce qui peut être crucial dans le cas d'analyse de cohortes d'échantillons.

Bien qu'en plein essor, la métabolomique rencontre à l'heure actuelle deux freins majeurs : la caractérisation des composés isomères et l'identification des métabolites. En effet, le métabolome est en grande partie constitué de composés isomères qu'il faut séparer et identifier afin d'évaluer le rôle de chacun. Ces composés sont généralement co-élus en conditions chromatographiques et leurs spectres de fragmentations sont souvent très similaires rendant leur identification très complexe. Or, la mobilité ionique a été montrée comme présentant des capacités de séparation accrue des isomères (Wu et al., 2020) vis-à-vis d'autres méthodes séparatives, et cela fait partie des motivations à son utilisation dans les études métabolomiques. Enfin, l'étape d'identification reste ardue à l'heure actuelle (Viant et al., 2017), notamment à cause d'un manque de composés standards mais également à cause de la justesse et de la reproductibilité des paramètres d'identification utilisés tels que le temps de rétention qui peut présenter des dérives selon les conditions expérimentales appliquées. La spectrométrie par mobilité ionique se révèle une nouvelle fois ici prometteuse, car elle permet de fournir un paramètre d'identification, le CCS (Collisional Cross Section), propriété spécifique d'un composé donné (ou plutôt de sa forme chargée), et dont les mesures expérimentales se sont démontrées comme robustes face aux changements de conditions expérimentales (Paglia et al., 2014).

Dans mon projet de thèse, nous avons voulu évaluer le potentiel du couplage IM-MS avec une cellule de mobilité de nouvelle génération, le TIMS (voir le principe de l'appareil TIMS-TOF détaillé en **Annexe 1**) dans le contexte des approches métabolomiques. Pour ce faire, nous avons développé des méthodes permettant à la fois des analyses de type non-ciblé pour réaliser une empreinte du métabolome par une analyse IM-MS directe ainsi que des méthodes plus spécifiques dédiées à une identification accrue des métabolites et notamment des composés isomères.

Ce manuscrit se présente en trois chapitres :

Un état de l'art de l'utilisation de la mobilité ionique pour les analyses métabolomiques est présenté dans le **Chapitre I**.

L'évaluation de la potentialité de l'instrument TIMS-TOF vis-à-vis de sa capacité à séparer des métabolites isomères est ensuite discutée dans le **Chapitre II**. Deux familles de composés isomères : dérivées d'estradiols et oligosaccharides du lait maternel, ont été étudiées en tant que mélange de standards puis dans des matrices complexes, à savoir des échantillons d'urine humaine et de lait maternel, respectivement.

Enfin, la construction d'une base de données de valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ de plus de 400 métabolites est présentée dans le **Chapitre III**.

Il faut souligner que ce manuscrit se présente sous forme de thèse sur articles scientifiques. Ces derniers sont présentés non pas dans leur format publié mais plutôt sous un format classique de manuscrit, afin de faciliter leur lecture. Les informations supplémentaires de chaque article se situent à la suite de l'article en question. Enfin, dans un effort d'harmonisation, les références de l'ensemble de ce manuscrit, ainsi que des différents articles sont regroupées en fin de manuscrit.

**CHAPITRE I : APPORT DE LA MOBILITÉ
IONIQUE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE
DE MASSE POUR DES ANALYSES
MÉTABOLOMIQUES**

Introduction du Chapitre I

Dans ce premier chapitre, une synthèse bibliographique sur le potentiel de la spectrométrie par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse pour des analyses métabolomiques, est présentée. Cette technique a été récemment explorée pour ses capacités avancées de séparation des métabolites isomères (Wu et al., 2020) tout en conservant un temps d'analyse court. En effet, la mobilité ionique est une technique de séparation des composés à l'état gazeux (après ionisation) qui peut s'effectuer avant détection par spectrométrie de masse (Dodds and Baker, 2019).

Cette synthèse est présentée ci-dessous, sous la forme d'une revue intitulée «*Different ion mobility-mass spectrometry coupling techniques to promote metabolomics* » publiée dans **Mass Spectrometry Reviews** en 2021 (doi : 10.1002/mas.21685).

Les différentes approches métabolomiques ainsi que les méthodes analytiques couramment employées dans ce domaine de recherches sont tout d'abord décrites. Le principe général de fonctionnement et les différentes technologies de mobilité ionique ainsi que leurs couplages avec la spectrométrie de masse sont ensuite expliqués. Un ensemble de techniques analytiques en couplage avec la mobilité ionique proposées pour des études métabolomiques sont ensuite présentées. A la suite, une discussion des paramètres instrumentaux et méthodologiques influençant la capacité de séparation par mobilité ionique est également abordée. Enfin, la revue présente les enjeux inhérents au traitement des données spectrales complexes produites par couplage IM-MS incluant l'étape cruciale d'identification structurale des métabolites, nécessitant la création de bases de données de valeurs CCS.

Different ion mobility - mass spectrometry coupling techniques to promote metabolomics

Aurélie Delvaux¹, Estelle Rathahao-Paris¹⁻², Sandra Alves¹

¹ Sorbonne Université, Faculté des Sciences et de l'Ingénierie, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), F-75005 Paris, France

² Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Abstract

Metabolomics has become increasingly popular in recent years for many applications ranging from clinical diagnosis, human health to biotechnological questioning. Despite technological advances, metabolomic studies are still currently limited by the difficulty of identifying all metabolites, a class of compounds with great chemical diversity. Although lengthy chromatographic analyses are often used to obtain comprehensive data, many isobar and isomer metabolites still remain unresolved, which is a critical point for the compound identification. Currently, ion mobility spectrometry is being explored in metabolomics as a way to improve metabolome coverage, analysis throughput and isomer separation. In this review, all the steps of a typical workflow for untargeted metabolomics are discussed considering the use of an ion mobility instrument. An overview of metabolomics is first presented followed by a brief description of ion mobility instrumentation. The ion mobility potential for complex mixture analysis is discussed regarding its coupling with a mass spectrometer alone, providing gas-phase separation before mass analysis as well as its combination with different separation platforms (conventional hyphenation but also multidimensional ion mobility couplings), offering multidimensional separation. Various instrumental and analytical conditions for improving the ion mobility separation are also described. Finally, data mining, including software packages and visualization approaches, as well as the construction of ion mobility databases for the metabolite identification are examined.

Keywords

hyphenated method, ion mobility-mass spectrometry, metabolomics, multidimensional data

1. Introduction

The integration of ion mobility spectrometry with mass spectrometry (as IM-MS hybrid instrument) has been extensively studied over the past decades in various fields such as forensics, environmental sciences, pharmaceuticals, medical applications, detection of chemical warfare agents and explosives (Eiceman et al., 2013). Thanks to the separation of the gas phase ions according to their mobility (K) through a buffer gas under an electric field, such an IM-MS coupling improves the selectivity of MS detection without increasing the analysis time. Various molecular families were therefore analysed, ranging from small size molecules

(Lapthorn et al., 2013b) to high mass biomolecules (Zhong et al., 2012) with the separation of isomer and isobar compounds (Wu et al., 2020).

Interestingly, IM-MS can also be hyphenated with front-end separation techniques, such as liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC), providing multidimensional separation and improving peak capacity and separation efficiency; this favors its application for complex mixture analysis (Morrison and Clowers, 2019; Zheng et al., 2017b). Ion mobility is increasingly used in the field of large-scale omics, such as proteomics, lipidomics or metabolomics (Burnum-Johnson et al., 2019; Chouinard et al., 2019; Harris et al., 2019; Hinz et al., 2018; Levy et al., 2019; Luo et al., 2020; Mairinger et al., 2018; Metz et al., 2017; Zandkarimi and Brown, 2019; Zhang et al., 2018; Zhong et al., 2012). IM-MS approaches hold great promise for metabolomics thanks to its ability to distinguish unsolved isomers, which provides greater confidence in identifying metabolites (Wu et al., 2020). Indeed, the collisional cross section (CCS) is a physicochemical parameter produced by ion mobility which can be used as a valuable criterion to characterize an ion structure as it is related to the structure, size and charge of a charged species (Eiceman et al., 2013).

This review focuses on the benefits of ion mobility for metabolomic studies. First, an overview of metabolomics is presented. Then, the principles of IM-MS instrumentation and different separation techniques that can be coupled with ion mobility spectrometry are described. Factors improving the ion mobility selectivity are also provided. Finally, data mining tools, multidimensional representation and metabolite identification criteria are discussed in the context of using IM-MS based approaches.

2. An overview of metabolomics including commonly used analytical techniques

Metabolomics is the large-scale study of metabolites, that is, low-molecular weight molecules (<1500 Da) involved in cell functions and various regulatory pathways. It is a way to link the biochemistry activity and the state of an organism considering the metabolome as the closest representation of the phenotype (Patti et al., 2012). Small changes in metabolic pathways can be detected by metabolomic approaches thanks to their high sensitivity capable of revealing the impact of external (e.g., environmental) or internal (e.g., genetics and age) factors.

Two main types of metabolomic approaches can be performed. They are primarily driven by the objectives of the study. The untargeted analysis aims to reveal perturbations in a system and/or to discover new potential biomarkers. This approach is hypothesis-generating, as the comprehensive analysis of the whole metabolome is performed without a priori. The goal is to detect and identify as many metabolites as possible (Alonso et al., 2015). The challenges are

many: (i) simultaneous detection of all metabolites belonging to different compound classes with a large range of concentrations is difficult, (ii) a front-end separation step is generally implemented to increase the metabolome coverage, lengthening the analysis time and finally, (iii) despite numerous metabolomic studies, many metabolites remain unidentified, in particular, the compound stereochemistry is rarely determined. A multistep workflow is typically followed for untargeted studies (see **Figure 1**; (Alonso et al., 2015)). It consists first of all of specimen collection, sample preparation, and analyses that can be carried out by different types of analytical platforms (see Sections 3 and 4). Data mining is then achieved, including spectral processing to extract a list of features, corresponding to the metabolites present in the sample, as well as statistical or chemometrics analyses to detect putative biomarkers, which are further annotated or identified (see Section 6 for more details). Finally, biological interpretation is achieved through metabolic pathway analysis.

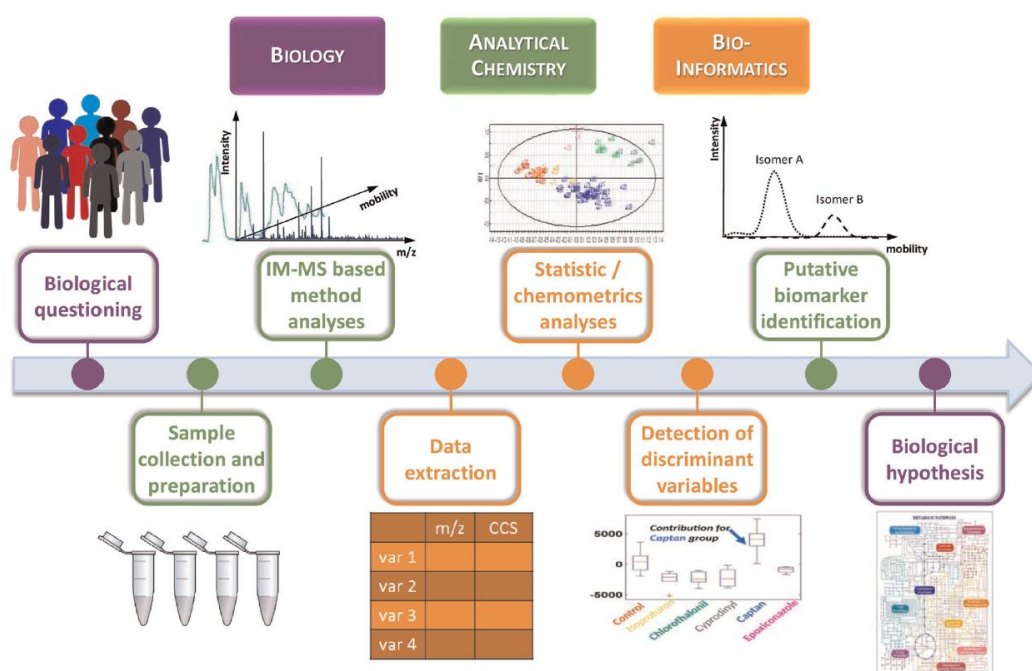


Figure 1. Metabolomic workflow for untargeted analysis. CCS, collisional cross section; IM-MS, ion mobility spectrometry with mass spectrometry

Another objective of metabolomic studies is to confirm a specific biological issue or to study a (or some) specific metabolic pathway(s). Therefore, a targeted analysis, which is hypothesis-driven, should provide the highest level of sensitivity, specificity and selectivity. In this case, only a limited set of metabolites is tracked. Authentic standard compounds are needed to develop dedicated analytical methods for the specific detection and quantification of target

species. Note that the targeted method can be used to monitor putative biomarkers previously identified in an untargeted analysis (Patti et al., 2012).

Many analytical techniques are currently used in metabolomic studies. They include nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Smolinska et al., 2012), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) (Santos et al., 2018) and MS, in particular, hyphenated instruments combining MS with: capillary zone electrophoresis (CZE) (Ramautar et al., 2017), LC (Haggarty and Burgess, 2017), GC (Haggarty and Burgess, 2017) or supercritical fluid chromatography (SFC) (Shulaev and Isaac, 2018) as well as direct injection mass spectrometry (DIMS) (Habchi et al., 2016). Multidimensional separation techniques such as GC×GC/MS or LC×LC/MS have also been applied for the comprehensive analysis of the metabolome (Haggarty and Burgess, 2017; Higgins Keppler et al., 2018; Lv et al., 2019). Nowadays, NMR spectroscopy and MS are the two most used analytical platforms, both having their respective advantages and drawbacks.

NMR spectroscopy provides reproducible measures and structural elucidation with a high level of confidence (Smolinska et al., 2012). It also allows the accurate quantification of the detected compounds. But NMR spectroscopy suffers from low sensitivity limiting the detection to the most abundant metabolites.

On the contrary, MS is characterized by a high sensitivity allowing the simultaneous detection of numerous metabolites in complex biological matrices. In addition, accurate mass measurements can be obtained using high resolution MS (HRMS) as well as fragmentation patterns through tandem mass spectrometry (MS/MS). A hyphenated technique is usually employed to further increase the detection sensitivity and the metabolome coverage. LC/MS is the most widely used in metabolomics because the metabolome is mainly constituted of nonvolatile compounds (Haggarty and Burgess, 2017). Two separation conditions are mainly employed: Reverse Phase LC (RPLC) for the separation of hydrophobic metabolites and Hydrophilic Interaction LC (HILIC) dedicated to the most polar species (Xiao et al., 2012). Although high performance LC (HPLC) drastically lengthens analysis time and provides rather low peak resolution, analytical advances offer faster and more resolute separation. Ultra high performance LC (UHPLC) using sub-2 µm particles (Guillarme et al., 2010) as well as capillary monolithic chromatography (Saunders et al., 2009) have been successfully applied to metabolomics. Nevertheless, the isomer distinction often cannot be obtained by LC/MS while accurate structural elucidation is essential in metabolomics since some isomer metabolites may display a specific role or activity. Otherwise, metabolomic studies using DIMS as a high throughput approach and rapid diagnostic tool have also been reported (Habchi et al., 2016).

These direct methods require the use of high resolution MS (HRMS) instruments, such as Fourier transform ion cyclotron (FTICR), to compensate for the lack of chromatographic separation by increasing the peak resolution and the dynamic range of detection (Habchi et al., 2018; Xian et al., 2012). However, matrix effects have a strong impact on spectral profiles and no isomer separation could be obtained (Habchi et al., 2018, 2016). IM-MS could therefore be an attractive hyphenated approach, allowing high throughput metabolome fingerprinting with isomer resolution (Burnum-Johnson et al., 2019; Chouinard et al., 2019; Harris et al., 2019; Hinz et al., 2018; Levy et al., 2019; Luo et al., 2020; Mairinger et al., 2018; Metz et al., 2017; Zandkarimi and Brown, 2019; Zhang et al., 2018; Zhong et al., 2012). Nevertheless, the advantages of IM-MS analysis over other analytical platforms depend on the ionization source, ion mobility, and the chosen MS instrumentation.

3. IM-MS instrumentation for metabolomics

3.1. Ion mobility instrumentation

Ion mobility spectrometry is a gas phase separation technique of ionic species under the application of an electric field in the presence of a gas, called buffer gas (Dodds and Baker, 2019; Eiceman et al., 2013; Gabelica and Marklund, 2018). The mobility of a given ion (K) is a specific parameter correlated with its velocity (v_d) as it moves through the buffer gas under the influence of an electric field (E). The mobility K can be expressed as **Equation (1)**:

$$K = \frac{v_d}{E} \quad (1)$$

CCS is a specific parameter derived from mobility (K) via the Mason-Schamp equation (Mason and Schamp Jr, 1958) (see **Equation (2)**). This parameter represents the area in which collisions between the ion and the buffer gas occur. It does not depend on the instrument but changes depending on the two particles in collision. Thus, CCS depends on the buffer gas used. It gives insight into the ion's conformation through the mobility cell.

$$CCS = \frac{3ze}{16N} \left(\frac{2\pi}{\mu k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{1}{K} \quad (2)$$

where z is the ion charge, e is the elementary charge, N is the density number of the drift gas, μ is the reduced mass of the ion–neutral drift gas pair, k_B is the Boltzmann constant, and T is the gas temperature.

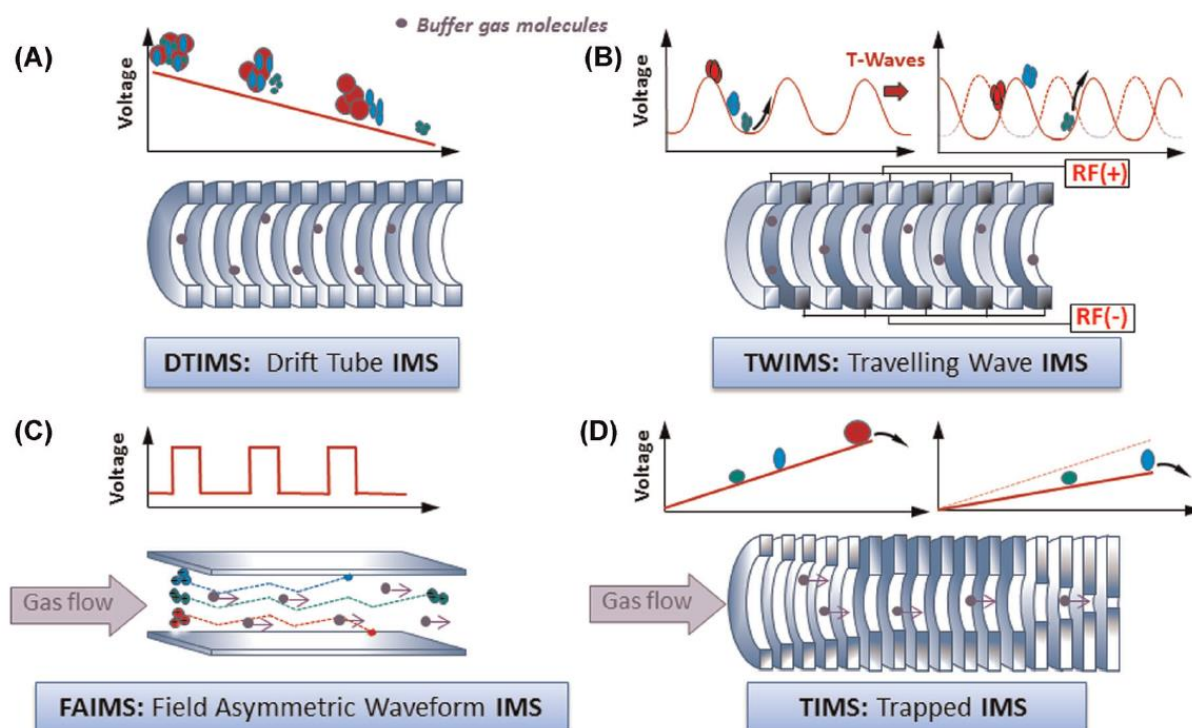


Figure 2. Four main types of ion mobility instruments. IMS, ion mobility spectrometry; RF, radio frequency

Today, there are different commercial ion mobility instrumentations coupled to MS. Their configuration differs depending on how the electric field and the buffer gas are implemented in the ion mobility device. Here, four major techniques are briefly described and compared (see **Figure 2** and **Table 1**), including their main advantages and drawbacks.

- Drift time ion mobility spectrometry (DTIMS; see **Figure 2A**): DTIMS separates ions in a pressured chamber under a weak and uniform electrical field. It measures the time, called drift time that an ion needs to migrate through the buffer gas as the electrical field drops. DTIMS is the only instrument from which CCS is calculated as the mobility (K) is directly linked to the drift time (Odenkirk and Baker, 2020). Note that DTIMS experiments can also be conducted in a CCS calibrated mode, called single-field method, as opposed to the multiple-field method usually employed. This mode is used to incorporate DTIMS into the chromatographic timescale (Odenkirk and Baker, 2020).
- Traveling wave ion mobility spectrometry (TWIMS; see **Figure 2B**): TWIMS introduced by Waters Corporation, is similar to the DTIMS principle in that the electric field disperses ions with different velocities through the buffer gas. But unlike the uniform field DTIMS, TWIMS is based on superposing repeating direct current (DC) voltage pulses with an ion confinement radiofrequency (RF), creating “traveling waves,” on which ion species are propelled along the gas-filled cell (Pringle et al.,

2007). The ion mobility separation is based on how each ion experiences the waves differently. Indeed, low mobility ions keep up with traveling waves more frequently than high mobility ions which results in shorter transit times. Ions are detected according to their arrival times (Campuzano and Giles, 2019) and CCS are determined through a calibration step (Bush et al., 2012).

The DTIMS and TWIMS principle is sometimes considered analogous to that of a Time-of-Flight (TOF) MS as both techniques measure ion time, such as ion drift time (based on CCS) for the ion mobility instrument and arrival time (based on m/z [mass-to-charge]) of ions pulsed into a field-free region for the TOF analyzer.

- Field asymmetric ion mobility spectrometry (FAIMS; see **Figure 2C**): FAIMS discriminates ions in a way comparable to a quadrupole, this technique works as an ion filter enabling the transmission of targeted ions under certain applied parameters. A time-dependent electric field is applied between two electrodes perpendicular to the ion trajectory through a buffer gas, as a result, ions oscillate up and down between the two electrodes. The field asymmetric waveform applied is composed of high-field portions of short duration and low-field portions of longer time. When applying the high-field portion, ions follow a wider sinusoidal path than during the low-field portion. As a result, ions move towards one of the electrodes as they pass through the chamber. A variable compensation voltage (CV) is applied during the experiment. For ions at a given K value, a given CV value permits them to keep a straight-lined trajectory and exit the chamber to the mass analyzer. The ions are therefore detected according to their corresponding CV values (Kolakowski and Mester, 2007). CCS is not available with this instrument. The FAIMS instrument can be implemented on any type of mass analyzer (see Section 3.2) and can be used in two ways: (i) by scanning a range of CVs for fingerprinting in global analyses or (ii) by selecting the CVs related to the analytes of interest for targeted analysis.
- Trapped ion mobility spectrometry (TIMS; see **Figure 2D**): TIMS is a recent original concept commercialized by Bruker Daltonics in 2017. In this instrument, ions are pushed by the drift gas and held stationary in the ion mobility cell under an electric field. An elution voltage is subsequently applied and the electric field is slowly decreased, allowing the ions to move separately to the mass analyzer (from the biggest CCS to the smallest CCS) (Ridgeway et al., 2018).

Over the last decade, ion mobility instrumentation has continued to advance through technical developments, mainly to improve separation capacity (May and McLean, 2015).

Typically, dispersive methods like DTIMS and TWIMS are limited by the path length of their cell, which constitutes a straight way to enhance their resolving power. Cyclic ion mobility configuration enabling the use of multiple passes can, then, be a way for ions to experience very long drift regions. (Merenbloom et al., 2009) first developed a cyclic DTIMS consisting of four curved drift regions and four ion funnels for longer mobility separation with a varying drift field along the drift tube. Using this cyclic DTIMS instrumentation with an additional ion coupling system to accumulate multiple pulses of ions in the cyclic drift tube, a resolving power greater than 1000 was reached through 100 cycles for model peptides, substance P, angiotensin II, and bradykinin (Glaskin et al., 2013). Nevertheless, this instrumentation suffers from sensitivity limitations. Alternatively, a cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry instrument was commercialized in 2019 by Waters in which a closed-loop traveling wave cell placed orthogonally to the ion optic axis replaces a conventional TWIM cell (Giles et al., 2019). Resolution up to 750 for 100 passes has been reported using this cyclic ion mobility device (Giles et al., 2019).

Another noteworthy innovation is structures for lossless ion manipulation (SLIM) which is an ion guide composed of arrays of radiofrequency ring electrodes and direct current guard electrodes (Tolmachev et al., 2014). SLIM devices based on printed circuit boards can be assembled in complex arrangements to obtain various gas phase ion manipulations with negligible losses. Above all, longer path lengths are obtained, which improves the ion mobility separation capacity (Tolmachev et al., 2014). Interestingly, the implementation of the SLIM serpentine ultra-long path with an extended routing (SLIM-SUPER) device on TWIMS instrument enabling multiple passes, showed lossless ion transmission over a path length of 1.1 km. An ion mobility resolution up to 340 for 40 passes (path length 540 m) was reported for analysis of tuning mix standards (Deng et al., 2017). However, the mobility range is limited because lower mobility ions have fewer passes and are therefore overtaken (or hidden) by higher mobility ions. To circumvent this issue, a multilevel SLIM consisting of four stacked serpentine paths has been recently developed, offering ultrahigh resolution separations over wider mobility range and extending its application to the separation of complex mixtures with high sensitivity (Hollerbach et al., 2020). SLIM technology is now commercially available through MOBILion Systems Inc.

In accordance with the different operating principles and geometries of ion mobility, these systems display variable characteristics that are compared in **Table 1** (Dodds and Baker, 2019;

Eiceman et al., 2013; Lanucara et al., 2014; Laphorn et al., 2013b; Purves, 2018; Silveira et al., 2017; Swearingen and Moritz, 2012). The first parameter is the resolving power which is typically calculated as **Equation (3)**, where x is the ion's measurand of the corresponding instrument and Δx the full peak width measured at half height.

$$R_p = \frac{x}{\Delta x} \quad (3)$$

The ion mobility resolving power generally ranges from a few tens to a couple hundred depending on the configuration used (see Table 1). Note that (Dodds et al., 2017) proposed a resolving power criterion based on CCS ($CCS/\Delta CCS$) since TWIMS, for example, showed higher separation capacities than suggested by the calculated resolving power. (Laphorn et al., 2013b) proposed a comparison of the ion mobility resolving power with the number of theoretical plates in chromatography. They reported that an ion mobility resolving power of 60, 120, 150, 200, and 400 corresponds to 20,000; 80,000; 125,000; 222,000; and 887,000 theoretical plates, respectively.

Table 1. Comparison of four types of IM-MS instruments

Ion mobility configuration	DTIMS	TWIMS	FAIMS	TIMS
Commercial devices	6560 Ion Mobility Q-TOF LC-MS (Agilent)	SYNAPT G2-Si (Waters Corporation)	SelexION (Sciex)	timsTOF (Bruker Daltonics)
Measurand	Drift time	Arrival time	Compensation voltage	Elution voltage
CCS measurements	Calculation	Need calibration	Not available	Need calibration
Resolving Power ^a	up to 80	about 40	Up to 40 ^b	up to 200
Duty cycle	~1% to ~50%	~15% to ~90%	Up to 100% in selective mode	up to 100%
Selectivity	Good	Good	Good (scanning mode) High (selective mode)	Good (fingerprint mode) High (selective mode)
Advantages	- Wide mobility range in a single analysis - Direct measure of experimental CCS	- Wide mobility range in a single analysis - Low voltage requirements due to constant wave height and no significant loss of ions - Development of recent cyclic TWIMS with long separation	- Adaptable to any type of mass analyzer - Two scanning modes: continuous (one CV selected) or noncontinuous (CVs scanned to monitor a mobility range) - Increased S/N ratio (elimination of interfering ions) and low LOD - Separation orthogonal to the m/z axis	- Tunable resolving power: Enhanced separation by increasing the ramp time and narrowing the mobility range - Wide range of mobility measurements or well resolved targeted separation, depending on the scan rate
Drawbacks	- Low ion transmission (99% of the sample discarded) - Difficult coupling to a mass analyzer other than TOF	- Difficult coupling to a mass analyzer other than TOF. - Possible change in the conformation of the gas phase ions by gas heating	- Appropriate parameters required to transmit ions of interest - Clustering/declustering mechanisms → difficult to assign structural properties	- Difficult coupling to a mass analyzer other than TOF - Experimental parameters adapted to see all ions - Space charge effects

Abbreviations: CV, compensation voltage; DTIMS, drift time ion mobility spectrometry; FAIMS, field asymmetric ion mobility spectrometry; LOD, limit of detection; ToF, time-of-flight; TIMS, trapped ion mobility spectrometry; TWIMS, traveling wave ion mobility spectrometry.

^aResolving powers values are obtained from supplier documentations and from (Shvartsburg et al., 2006)

^bUp to 500 with the inclusion of light gases such as He or H₂ in the carrier gas N₂ (Shvartsburg et al., 2013)

The sensitivity and selectivity are also key parameters to evaluate different ion mobility technologies (see **Table 1**). The sensitivity of an IM-MS instrument is related to its capability to transmit all the ions produced in the ionization source through different parts of the instrument. The duty cycle (expressed in %) represents that part of the sample actually analyzed.

Then, high duty cycle correlates with high sensitivity. Both DTIMS and TWIMS systems use pulsed ion injection and therefore face low duty cycle issues, resulting in poor sensitivity of these systems (Hughes et al., 2013). Nevertheless, ion accumulation systems and multiplexed schemes were developed to enhance the duty cycle (May et al., 2020; Pringle et al., 2007). Otherwise, TIMS device provides a high duty cycle by accumulating and analyzing ions in parallel (Silveira et al., 2017). For FAIMS, good transmission of target species is obtained by continuous ion beam in selective mode, whereas a wide range of CVs is acquired in global analysis (scanning mode), which greatly decrease the duty cycle (Swearingen and Moritz, 2012). Finally, selectivity corresponds to the capacity of an instrument to transmit ions with a specific mobility.

DTIMS and TWIMS are widely used for untargeted metabolomics to produce metabolomic fingerprints with more information as they provide a wide mobility range in a single experiment. In addition, the characterization of the species detected by both their CCS and their m/z values increases the confidence of their identification. Conversely, FAIMS analyses can take a long time when all CV values are scanned to generate a global profile. Therefore, such a technique is not really suitable for untargeted studies. Nevertheless, the use of FAIMS for untargeted lipidomics has been reported by (Lintonen et al., 2014) showing the possibility of predicting CVs of different lipids classes (by avoiding scanning the entire range of CVs). Otherwise, FAIMS is mostly used in targeted metabolomics as it improves signal-to-noise ratios by removing interfering cluster ions induced by the ionization step (Guddat et al., 2009). As a mass filter, this technique targets the compound of interest with an enhanced limit of detection and quantification. Finally, the fairly recent TIMS technique has not yet been extensively investigated in metabolomics, but it seems to have a high potential in the large-scale omics field thanks to its great capacity for isomer separation (Ridgeway et al., 2018). This instrument is well suited for both targeted and untargeted analyses because the resolving power can be tuned through the elution scan rate.

3.2. Coupling ion mobility with MS

Ion mobility separates gas phase ions generated by various ionization techniques. Many types of ionization sources, commonly used in MS, have been coupled with ion mobility instruments, making this technique suitable for a wide range of analytes (Eiceman et al., 2013). For metabolomic applications, electrospray ionization (ESI) (Whitehouse et al., 1985; Yamashita and Fenn, 1984) is the most widely employed ionization source as this versatile source enables ionization of nonvolatile species of different chemical classes, typically present in biological

matrixes. Hence, ESI is suitable for ionization of the majority of metabolome constituents despite some limitations such as ionization competition (see Section 4.1) (Eiceman et al., 2013). For IM-MS based metabolomic imaging, matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) is the most widely used source but ESI-derived ambient ionization techniques such as desorption ESI (DESI) or laser ablation ESI (LAESI) can also be employed for solid sample analysis (see Section 4.6) (Eiceman et al., 2013).

The difficulty of coupling an ion mobility device to a mass analyzer therefore relies on the efficiency of the ion cloud transmission from the ionization source to the mass analyzer (i.e., duty cycle) but also on the compatibility of the scanning rates of both ion mobility and MS instrument. Indeed, ion mobility spectrometry acts as a fast scanning instrument with a millisecond rate. Thus, TOF is the mass analyzer of choice for hyphenation with ion mobility thanks to its microsecond acquisition time scale, allowing the recording of several mass spectra per mobility scan. In addition, IM-TOF instruments, offering high mass resolving power, are well suited for metabolomic analyses. To increase the metabolome coverage, high MS performances in terms of dynamic range, mass resolving power and mass accuracy, such as Fourier transform mass spectrometry (FTMS) analyzers (i.e., Orbitrap-based or FTICR instruments), are required.

FAIMS device was first coupled with LTQ-Orbitrap (Saba et al., 2009) and FTICR instruments (Robinson et al., 2006) thanks to its easy coupling to any mass analyzer. Hyphenation of other ion mobility systems with Orbitrap-based or FTICR instruments is less straightforward due to the time scale difference between the rapid ion mobility separation and the slow FTMS acquisition rate (up to 1s for FTICR). To circumvent this limitation, various technical strategies have been developed but the overall idea is to virtually “slow” down the ion mobility separation speed to make it suitable for the FTMS scan rate. For example, DTIMS was coupled with an Orbitrap based instrument using a dual gate approach (Ibrahim et al., 2016). This approach involves ion trapping before and after ion mobility separation to divide the mobility range in narrow ranges, allowing the acquisition of different mass spectra for a single mobility range. More recently, some papers have focused on combining TIMS with an FTICR analyzer as a hybrid instrument offering both the highest mobility and mass resolving powers (Tose et al., 2018). First, Gated TIMS was combined with FTICR (Ridgeway et al., 2016), similarly to the dual-gate DTIMS coupling with Orbitrap mentioned above. (Benigni et al., 2015) showed the efficient coupling of TIMS to a FTICR instrument using selective accumulation-TIMS (SA-TIMS), Oversampling selective accumulation TIMS (OSA-TIMS) (Benigni and Fernandez-Lima, 2016), and nonlinear mobility scan functions (Benigni et al., 2018). The coupling of

TIMS with FTICR is very promising for metabolomics (Tose et al., 2018) in particular for complex matrix analysis (Benigni et al., 2017). Nevertheless, the ion mobility coupling with FTMS, with the exception for FAIMS, remains complicated and TOF-based IM-MS instruments are currently commercially available (see **Table 1**).

4. Coupling ion mobility spectrometry with different MS based methods

A great advantage of ion mobility relies on its role as an intermediate postionization separation space added to classical hyphenated MS-based methods. This multidimensional separation provides improved peak capacity and therefore wider metabolome coverage (D'Atri et al., 2018; Morrison and Clowers, 2019; Zheng et al., 2017b). Another benefit is the incorporation of a complementary data feature, that is, CCS supporting the identification step (in addition to retention time RT and m/z values acquired in conventional LC/MS analysis), while keeping the time scale of hyphenated method. Different front-end separation techniques can be hyphenated with IM-MS instrumentation, they are described and discussed in the next section.

4.1. Use of IM-MS versus DIMS

DIMS represents the straight analytical tool for high throughput metabolomics studies (Habchi et al., 2018, 2016). Almost all DIMS studies reported the use of high resolution mass spectrometry to compensate (at least partially) for the loss of separation dimension through accurate mass measurements (Xian et al., 2012). But these direct approaches suffer from dramatic drawbacks such as strong matrix effects on the ionization response and no separation of isomeric and eventually of isobaric compounds (with limited mass resolving powers) (Habchi et al., 2018). Matrix effects result from ionization competition between analytes and matrix components in complex mixtures, leading to either increased peak intensity or ion suppression phenomenon. Such unexpected spectral variations make difficult their interpretation within a biological context. The use of IM-MS, enabling two-dimensional (2D) measurements, provides more information while maintaining fast analysis throughput. Although matrix effects still occur during the ionization process, isomers and isobars can be distinguished through the gas-phase ion mobility separation (Wu et al., 2020). Hence, an increased number of detected charged species can be obtained with CCS values in addition to their m/z ratios. A fivefold increase in the number of ions detected was observed by (Paglia et al., 2015) in IM-MS analysis of lipid extracts from porcine brain samples. Similar results were obtained by (Ruotolo et al., 2002), who evaluated the peak capacity of a DTIMS-MS instrument by analyzing peptide and protein models. They concluded that the peak capacity of an IM-MS

experiment ranges from one to five times higher compared to a DIMS analysis, considering resolutions of 60 in mobility and 400 in mass. Note that the peak capacity of a technique is the number of signals detected in the separation space (i.e., only m/z values for DIMS and the $[m/z, CCS]$ data couples for IM-MS).

4.2. Use of IM-MS versus conventional LC/MS

Although LC/MS has become the start-of-art approach employed in metabolomics (Haggarty and Burgess, 2017), IM-MS could emerge as an original alternative hyphenated method. First of all, IM-MS analysis time is considerably shortened compared to that of LC/MS while keeping the advantage of a separation dimension (contrary to DIMS). The analysis throughput is crucial for untargeted studies, especially for cohort analysis, where unavoidable technical shifts occur during a long sequence batch. In addition, (Beach and Gabryelski, 2011) reported the LC/MS analysis of a urinary sample 400 times more concentrated than in the IM-MS analysis, suggesting an enhanced sensibility of the latter method.

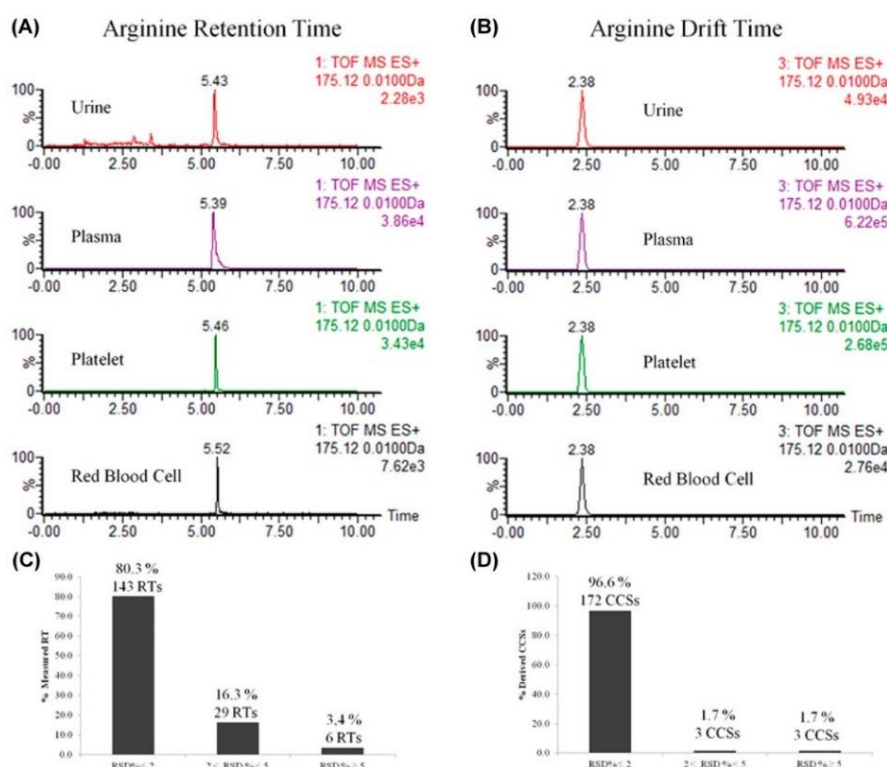


Figure 3. Matrix effects on the (A) RT compared to (B) CCS values of arginine from LC/IM-MS analysis of biological matrixes (plasma, red blood cells, platelets, and urine). Reprinted with permission from (Paglia et al., 2014). ©American Chemical Society. CCS, collisional cross section; IM-MS, ion mobility spectrometry with mass spectrometry; LC, liquid chromatography; MS, mass spectrometry; RT, retention time

Interestingly, both hyphenated methods provide an additional data feature, that is, RT and CCS for LC/MS and IM-MS, respectively, but higher confidence in the compound identification is obtained for IM-MS thanks to the high reproducibility of CCS measurements. Indeed, Paglia et al. reported a mean relative SD (RSD) < 2% for 97% of the experimental CCS values and only for 80% of the RT values from the analysis of 94 standard metabolites (see **Figure 3**) (Paglia et al., 2014). The RT shifts arose from different factors such as column degradation, small changes in room and/or column temperature, in mobile phase pH, or sample carryovers. The same authors showed that the CCS values were not affected by biological matrixes (e.g., urine, plasma, platelets, and red blood cells) compared to the RT measurements (see **Figure 3**). Moreover, ion mobility separation before MS typically improves the spectral data quality. (Beach and Gabryelski, 2011) demonstrated the ability of the FAIMS device to remove chemical background noise and interference to produce high quality MS/MS data for the identification of low abundance unknown species in complex mixtures such as urine.

4.3. Multidimensional LC separation combination with IM-MS platform

Nevertheless, the most promising analytical approach would be the incorporation of front-end separation techniques such as LC into the IM-MS instrumentation for a comprehensive analysis through multidimensional (2D or more) separation. The separation mechanisms of ion mobility and LC techniques are orthogonal, which strongly improve the peak capacity (Causon and Hann, 2015; Rainville et al., 2017). Indeed, the detection of more features is expected through the resolute separation of co-eluting compounds, isobaric components, as well as eventual ion-source fragments, with noise reduction using ion mobility. (Pacini et al., 2015) reported an improvement of 15% in peak capacity by adding an ion mobility device to their LC/MS-based method and also showed the distinction of five co-eluted isobars. Importantly, applying rapid LC gradient improves the throughput of LC/IM-MS analysis while maintaining the separation power, compared to long LC/MS experiments (Rainville et al., 2017). For example, rapid microbore metabolic profiling (RAMMP method) (Gray et al., 2016) coupled with IMS (King et al., 2019) has been proposed for untargeted studies.

Multidimensional chromatography has also been explored for a more comprehensive characterization of the metabolome (Haggarty and Burgess, 2017; Lv et al., 2019). (Baglai et al., 2017) compared two multidimensional separation platforms, that is, 2D LC coupled to MS (LC×LC/MS) and LC coupled to IM-MS (LC/IM-MS) for lipid mapping of human plasma. The LC×LC/MS method combining two columns with complementary separation selectivity (i.e., HILIC and RPLC), enabled the detection of 1 100 features from which 100 lipids were

identified while LC/IM-MS approach provided 800 features and 55 of them were identified as lipids. Despite detecting fewer features using LC/IM-MS, this latter technique offers better structural identification as well as better analysis throughput (190 and 20 min analysis time for LC× LC/MS and LC/IM-MS, respectively). (Stephan et al., 2016b) also developed a three-dimensional (3D) separation method using a 2D-LC combining a CN column with a C18 column coupled to a DTIMS-qTOF instrument for the analysis of complex matrices such as plant extracts, coffee or waste water. Despite the great separation performances of such a high multidimensional approach allowing the detection and identification of 53 compounds in waste water against 22 compounds when using LC/IM-MS, the analysis time was very long, almost 2 h.

4.4. Other front-end separation couplings with IM-MS

Other separation techniques have been proposed to be coupled with IM-MS for metabolomic studies but at a less extent even if they deserve to be developed, in the future.

GC has been extensively coupled with ion mobility spectrometry. For example, (Tian et al., 2020) used GC-ion mobility spectrometry coupling to produce fingerprints of volatile organic compounds (VOCs) from feces and urine of Alzheimer's disease-model mice. They demonstrated the successful classification of sample groups from both GC-ion mobility and GC/MS data using multivariate statistical analysis (PLS-DA). More interestingly, a better predictive accuracy of the model established was obtained from GC-ion mobility data. Otherwise, GC/MS allowed the identification of the metabolites. Indeed, such technique is known for its highly reproducible measurements for the separation and detection of small volatile and thermostable molecules, as a complementary way to LC/MS experiments (Haggarty and Burgess, 2017). Nevertheless, GC is rarely coupled with IM-MS instrument. We can cite, (Crawford et al., 2011) who performed the fingerprinting of lavender and peppermint oils using GC/IM-MS using secondary electrospray ionization. More recently, (Lipok et al., 2018) developed a 3D separation by coupling 2D GC to IM-MS (GC+ GC/IM-MS) to analyze the *Calendula officinalis* plant extract. Thanks to the ion mobility dimension isobaric compounds not separated by GC+ GC/MS analysis could be resolved.

Alternatively, CZE presents similarities with ion mobility spectrometry as the separation occurs under an applied electric field in both techniques, the main difference being that the CZE analysis is conducted in liquid buffer while the ion mobility experiment in gas buffer. Ion mobility spectrometry could then be qualified as a gaseous CZE. CZE/MS have been employed in metabolomics due to its high separation efficiency and high sensitivity detection (Ramautar

et al., 2017). This technique is best suited for polar and ionic metabolites. However, coupling of CZE with ion mobility or IM-MS remains really rare, certainly due to their similar separation patterns. In 2015, Zhong et al. reported the use of CZE/TWIMS-MS to resolve glycan isomers (Zhong et al., 2015). Recently, (Delvaux et al., 2020b) demonstrated a better separation ability of CZE-MS for isomer peptide distinction compared to that of IM-MS, certainly due to the limited resolution of the TWIMS cell. Interestingly, they found similar migration behaviors between solution and gas phase separations, suggesting no change in the compound conformations through the ESI desolvation processes. It is worth mentioning that the acquisition time is 40 min for the CZE-MS analysis and only a few minutes for the IM-MS experiment.

SFC is another separation technique which can be coupled to ion mobility spectrometry. It combines some characteristics of LC, providing separation similar to a normal phase chromatography and those of GC, as this technique is suited for the analysis of labile and low to moderate weight metabolites. It also seems to provide good separation of chiral molecules (Shulaev and Isaac, 2018) with a relative low cost. It can, nevertheless, induce some compound decomposition. With new developments in instrumentation, SFC is gaining interest, particularly in metabolomics where more and more studies are exploring this technique (Shulaev and Isaac, 2018). Some preliminary works coupling SFC to ion mobility were conducted in the 1980s (Eatherton et al., 1986; Rokushika et al., 1987) but to the best of our knowledge, only (Beucher et al., 2017) recently reported the coupling of SFC and TWIMS device to detect and quantify four nonsteroidal androgen receptor modulators from bovine urine samples.

Alternatively, despite front end separation techniques, sample preparation is crucial to ensure the quality of the produced data. Solid phase extraction (SPE) coupled with IM-MS could be a really promising alternative to conventional IM-MS, reducing the matrix effects by removing interfering components present in the biological sample. SPE-ion mobility spectrometry experiments were performed on different complex matrices such as water or urine (Lu et al., 2009). More recently, a dedicated automated SPE-IM-MS platform was developed by (Zhang et al., 2016) for simultaneous targeted and untargeted measurements of metabolites in complex human biofluids. Such a platform allows highly reproducible analyses (CV (CCS) < 3%), with LODs in the ppm range and an analysis time below 1min even when using up to three cartridges.

4.5. Multidimensional ion mobility couplings

Multidimensional gas phase separations using multiple ion mobility cells can be performed before MS analysis using either hyphenation of FAIMS device with conventional ion mobility

geometry or by combining ion mobility cells of the same geometry. For example, the FAIMS-DTIMS-MS coupling has been reported to reduce the S/N ratio thanks to the FAIMS part while the CCS values are directly measured by the DTIMS system (Zhang et al., 2015). Such orthogonal separation greatly increases the separation power in a comparable way to that provided by high-quality LC separation but within limited sensitivity. Another powerful separation tool is the combination of the same geometry ion mobility cells such as DTIMS-DTIMS-MS (Koeniger et al., 2006) as well as TIMS-TIMS-MS (Liu et al., 2018). Interestingly, such multidimensional gas phase separation can be helpful for structural study. MS/MS experiments were performed for protein models in which, precursor ions with a specific mobility were selected in the first mobility cell before collisional activation, then species with possible conformational changes (e.g., large biomolecule unfolding) and/or fragment ions were further separated in the second cell before MS analysis (Koeniger et al., 2006; Liu et al., 2018). Tandem ion mobility separation allows low intensity features to be detected (Liu et al., 2018). The peak capacity of ion mobility and tandem ion mobility spectrometry was evaluated for tryptic peptide ions and was found to range from 60 to 80 and from 480 to 1360, for ion mobility and tandem ion mobility spectrometry, respectively (Merenbloom et al., 2007). Although collisional activation should not induce large changes in the structure of small molecules, tandem ion mobility coupled with MS, combining the collisional activation of a mobility-selected precursor and the mobility-separation of product ions should promote the analysis of complex mixtures, especially in metabolomics, providing powerful separation and insights into the structural characterization of metabolites.

4.6. Alternative multidimensional data acquisition using ion mobility-based methods

Unconventional ways to generate multidimensional data using IM-MS instrumentation were also proposed. First, a key part of the metabolomic workflow is the identification of the metabolite structure in complex mixtures. To do so, MS/MS fragmentation patterns are widely employed for structural characterization and can be performed in an automated fashion way using hyphenated methods. A data independent acquisition mode called MSE was developed in 2006 by (Plumb et al., 2006), this approach alternates low and high collision energies to obtain information on precursor ions and on all species (precursor and product ions, including neutral loss), respectively, in a single analytical run. Classical LC/MS^E experiments produce complex fragmentation mass spectra, mainly resulting from coeluting compounds. Coupling ion mobility before the collision cell allows to separate the coeluted precursor ions and to produce clearer mass spectra. MS^E analyses are of great interest for metabolomic studies as they

provide additional identification parameter without increasing the analysis time. (Paglia et al., 2016), for example, used LC/IM-MSE for metabolomic and lipidomic analyses of frontal cortex samples from Alzheimer's disease patients (Paglia et al., 2016). MSE data were used to semi-quantify biomarkers of specific biochemical pathways after statistical analyses. This approach can combine untargeted and targeted analysis in a single run and maximize the metabolite identification.

Alternatively, MS imaging enables the spatial analysis of metabolites in tissue sections and is gaining interest in metabolomics, in particular for the biomarker detection and the elucidation of disease mechanisms (Miura et al., 2012). Coupling ion mobility to a classical MS imaging platform improves analytical performances (Sans et al., 2018). Indeed, the additional ion mobility dimension can separate isobaric compounds and enhance the detection of low abundant ions. Hence, better sensitivity and metabolome coverage is expected with the spatial localization of metabolites. The coupling of a FAIMS instrument to a classical DESI-MS imaging platform has been used for the analysis of biological tissues such as marine algae and mouse brain tissues (Bennett et al., 2014). It allowed a 10-fold increase in the S/N ratio by separating the interfering ions from the analytes, which improved the image contrast and quality (see **Figure 4**). IM-MS imaging platform was, also, used for metabolomics analyses. Potential biomarkers of Alzheimer's disease were, for example, detected on brain tissue samples using LAESI-TWIMS-MS (Paglia et al., 2016).

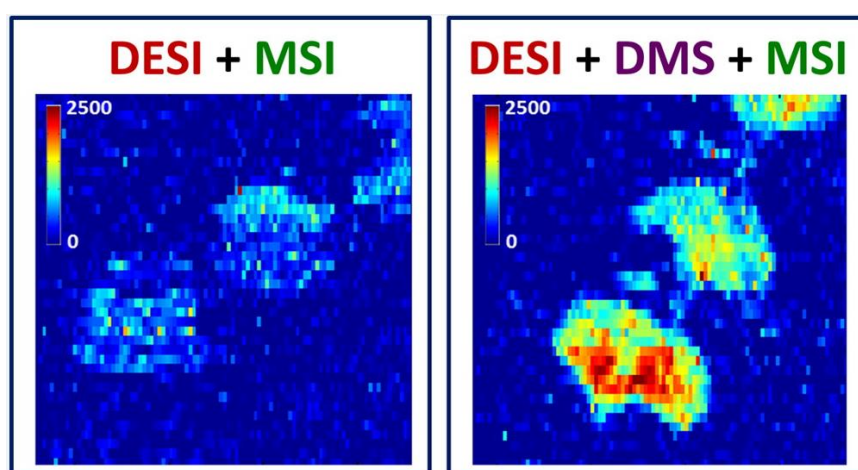


Figure 4. MS imaging of 4-hydroxybenzoic acid on the surface of sea algae samples using a DESI-MS instrument with and without the coupling of a FAIMS (also called DMS) device. The use of DMS filtering strongly improves the image quality thanks to better signal-to-noise ratios. Reprinted with permission from (Bennett et al., 2014). ©American Chemical Society. DESI, desorption electrospray ionization; DMS, differential mobility spectrometry; FAIMS, field asymmetric ion mobility spectrometry; MSI, mass spectrometry imaging

In conclusion, the versatility of the ion mobility has been demonstrated thanks to its capacity to be hyphenated with most separation techniques, introducing an additional separation dimension without increasing the analysis time. Such multidimensional couplings should strongly enhance the metabolome coverage, which is of great interest when conducting untargeted metabolomic studies. Nevertheless, the coupling of ion mobility with other separation techniques generates large and complex multidimensional data sets, which require dedicated data mining tools (see Section 6).

5. **Factors influencing the ion mobility selectivity**

Although the IM-MS equipment offers an additional separation dimension with a resolving power of up to 100 (see **Table 1**), the separation of structurally close molecules such as isomers or stereoisomers is often unresolved due to their very close CCS values. Isomers are ubiquitous in biological processes and their characterization is essential for the interpretation of metabolic pathways (Gourmel et al., 2013). Approximately 30% of the 500 metabolite standards in the Mass Spectrometry Metabolite Standard Library (MSMLS) are isomer compounds, and an instrumental resolving power of 70 can only resolve about half of them, that is, those with CCS difference higher than 2.0% (ΔCCS) (Nichols et al., 2018). Higher resolving power is required to characterize other isomer pairs (ca. 140 for $\Delta\text{CCS} \sim 1.0\text{--}2.0\%$ and ca. >300 for $\Delta\text{CCS} \sim 0.5\%$). In addition to changes in instrumental parameters (see Section 5.1), numerous analytical solutions have been proposed to improve the ion mobility selectivity, typically by modifying the electrostatic interactions between the ions and the buffer gas. Hence, modifying the ion's type (see Section 5.2) or the buffer gas nature (see Section 5.3) constitutes a way to improve the compound separation.

5.1. **Instrumental parameters**

A straight way to improve the ion mobility separation is to increase the resolving power. It can be done by optimizing the operating parameters of a given ion mobility cell geometry. For example, increasing the electric field, buffer gas pressure or drift length has been shown to improve the resolving power of both DTIMS (up to 200) (Eiceman et al., 2013; Odenkirk and Baker, 2020) and TWIMS (Campuzano and Giles, 2019) instruments. Higher amplitude and speed of waves also greatly enhance the TWIMS selectivity (Campuzano and Giles, 2019). Recent ion mobility instrumentations, such as TIMS, SLIM, or cyclic TWIMS cells, present greater resolving power. Interestingly, the TIMS analyzer offers the possibility to tune the mobility separation resolution by changing the elution scan rate (the separation power is

improved by increasing the ramp time and narrowing the scan voltage) (Ridgeway et al., 2018). Nevertheless, it should be noted that recent technical solutions for improving ion mobility resolution mostly result in lower sensitivity (e.g., cyclic configuration) and/or narrow mobility range detection (e.g., TIMS device).

5.2. Influence of buffer gas

The buffer gas composition can greatly influence the ion mobility selectivity (Asbury and Hill, 2000). Indeed, ion mobilities result from ion–neutral interactions within the drift gas, thus gas properties such as mass and polarizability (Naylor et al., 2020) affect the ion motion in the ion mobility cell, and therefore the experimental CCS values. Fundamental research have stated that the impact of gas polarizability is composed of short and/or long range ion–dipole interactions in addition to ion-neutral collisions (Naylor et al., 2020). Nevertheless, the gas polarizability does not affect all ions equally. Indeed, (Lalli et al., 2013) showed that the separation of isomers with a significant difference in surface charge distributions could be improved by using a more polarizable drift gas, while (Kurulugama et al., 2015) reported that the increased drift gas polarizability did not help elucidate the pesticide isomers likely having a similar localization of the surface charge. Hence, the change in separation according to the drift gas appears to depend on the molecule type and, a possible reversal of the mobility order may occur (see **Figure 5**) (Asbury and Hill, 2000). Note that ion mobility also depends on the analysis conditions, for example, temperature and pressure (gas density) in the drift cell (Berant et al., 1989). Several works have focused on the use of various buffer gases, including nitrogen (N₂), air, helium (He), argon, carbon dioxide, and sulfur hexafluoride as well as the use of binary gas mixtures (Asbury and Hill, 2000; Dwivedi et al., 2008; Kaszycki et al., 2019; Kurulugama et al., 2015; Lalli et al., 2013) as a straight way to influence the ion mobility ability to separate a wide range of small molecules. Nitrogen and carbon dioxide were employed in a metabolomic study for fingerprinting *Escherichia coli* providing different separation patterns in the 2D IM-MS plot allowing the distinction of some metabolites (Dwivedi et al., 2008).

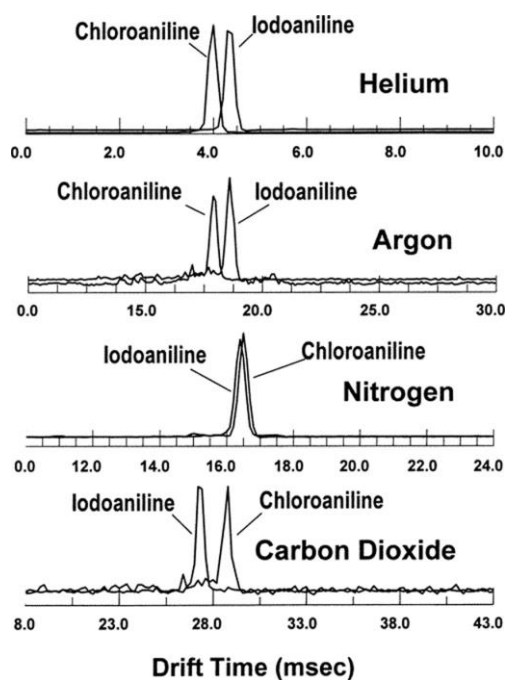


Figure 5. Ion mobility spectra of chloroaniline and iodoaniline using four different drift gases, showing an increase in drift times with the gas polarizability. Note that a mobility inversion is observed in carbon dioxide. Reprinted with permission from (Asbury and Hill, 2000). ©American Chemical Society

Alternatively, the addition of gas modifiers generates selective ion mobility separation through ion-molecule clustering reactions (Fernández-Maestre et al., 2012). It has been successfully applied to increase the ion mobility selectivity (Waraksa et al., 2016). The chemical modifiers used are often polar solvents such as methanol, ethanol and acetonitrile, added in small proportions (0.5%–5%) to the drift gas (Waraksa et al., 2016). Their use facilitates the ion mobility separation of isobars (unresolved by MS alone), isomer molecules (Porta et al., 2013) but also of chiral compounds (see discussion below) (Dwivedi et al., 2006). Overall, chemical modifiers are often used in FAIMS experiments as a way to amplify differences in mobility. Porta et al., for example, used different gas modifiers (acetonitrile, acetone, and methanol) in nitrogen drift gas to resolve different drugs of abuse and their metabolites in post-mortem tissue samples (Porta et al., 2013). However, (Schneider et al., 2010) underlined the decrease in signal intensity up to fivefold when adding gas modifiers.

5.3. Influence of gas phase ion structure

One of the most common ways to improve ion mobility separation is to change the charge carrier. Cation addition is known to influence conformations of ions in the gas phase, which may provide better results in terms of enhanced MS sensitivity, more informative MS/MS data as well as better selectivity of IM-MS analyses. Indeed, the ΔCCS value of two closely related

compounds, for example, isomers, has been reported to be dependent on the ions considered. The addition of metal cation has been described as a way to improve the separation of metabolites such as carbohydrates (Huang and Dodds, 2015, 2013), glycans (Zheng et al., 2017c) or steroids (Rister et al., 2019a) but also drugs (Zietek et al., 2018). Cesium cationization was, for example, applied directly to tissue sections by (Jackson et al., 2008). The use of cesium allowed to identify 37 phospholipids instead of 19 compounds without (Jackson et al., 2008). Efforts have been made to rationalize the effect of the charge carrier but if an increase in CCS values is expected with the metal radii (Zietek et al., 2018), no trendline is found between Δ CCS and metal properties (Rister et al., 2019a).

The formation of noncovalent complex ions modifies the gas phase conformation and therefore changes the CCS value. Typically, an increased CCS difference between isomers is often obtained for dimer adducts compared to that for monomer species, as reported by (Rister et al., 2019a), who obtained the distinction of positional steroid isomers and also of epimers as dimer forms. Alternatively, the formation of noncovalent complex ions using a shift agent was also used to enhance the ion mobility selectivity. (Chouinard et al., 2018) showed successful separation of some bile acid isomers through cyclodextrin adduct (host–guest) formation using SLIM.

Finally, covalent derivatization can provide better isomer separation and was successfully applied to carbohydrates (Li et al., 2018) and steroids (Ahonen et al., 2013). (Li et al., 2018) reported multisite covalent derivatization with boronic acid to improve separation of isomeric carbohydrate compounds.

5.4. Chiral ion mobility spectrometry

Chirality is an important concept in biology, most of biological molecules (like the amino acids that proteins are made of) are chiral, and stereoisomers may have specific functions. However, chiral analysis without using chiral chromatography is very challenging (Yu and Yao, 2017), requiring the optimization of time-consuming and compound-dependent analytical techniques. In addition, it does not provide sufficient selectivity and often lacks sensitivity when applied to mixtures. Ion mobility separation of chiral compounds typically involves chiral recognition within the formation of noncovalent diastereomer multimer ions using a pure chiral reference compound. These noncovalently linked diastereomers can be formed by complexation during ionization processes or by introducing chiral gas modifiers. The distinction of eight pairs of enantiomeric monosaccharides was, for example, obtained through the formation of diastereomer complexes by addition of pure peptide or amino acid enantiomers (Gaye et al.,

2016). Noncovalent diastereomer multimer ions were, also, used for IM-MS analysis of amino acid enantiomers (Domalain et al., 2014). Interestingly, (Domalain et al., 2014) used resolved signals for the relative quantification of enantiomeric excess using a high throughput IM-MS approach. Finally, the addition of (S)-(+)-2-butanol as a chiral modifier to nitrogen drift gas was also shown to separate enantiomers of pharmaceutical compounds, amino acids and carbohydrates (Dwivedi et al., 2006). However, it should be noted that the latter chiral IM-MS experiment has never been replicated since.

In conclusion, various analytical solutions have been proposed to improve the ion mobility selectivity to separate biologically relevant compounds, often isomers, such as metabolites, carbohydrates, lipids, and drugs. However, several conformers of the same compound exist, that is, various ion structures (with the charge at different locations), leading to broadening of the ion mobility peak or to multiple mobility peaks, which can complicate the IM-MS data interpretation (Gabelica and Marklund, 2018).

6. Data mining and metabolite identification

Data mining is a crucial step in the metabolomic workflow. It involves extracting a list of data features from complex data sets, followed by statistical analyses to detect significant variables, which could correspond to potential biomarkers (see Section 2). Finally, these variables are annotated based on the available data (m/z , RT or MS/MS experiment). Adding an ion mobility instrument to the data acquisition step creates new challenges in data processing and metabolite identification.

6.1. Data preprocessing and feature extraction

Data preprocessing commonly produced by LC/MS or GC/MS experiments involves: (i) data alignment (RT alignment) between all analyses, (ii) peak picking to extract features (i.e., RT, m/z ratios, peak intensity), and (iii) data filtering to reduce data size by removing non-interesting and redundant signals. The introduction of an additional ion mobility separation dimension generates additional feature such as CCS or K values, making data preprocessing more challenging.

Until now, IM-MS or LC/IMMS data has been mainly processed using constructor software packages, such as Progenesis QI Informatics (Waters Corporation) and Metaboscape (Bruker Daltonics), which integrate CCS values into peak picking. Lack of public tools available to date hinders the extensive and common use of ion mobility-based platforms. XCMS is a commonly used data mining tool for processing hyphenated data (Smith et al., 2006), it has been shown to

successfully process IM-MS data (Martínez-Lozano et al., 2013). For LC/IM-MS data, feature extraction is more challenging because multiple features for a given signal must be considered. (Malkar et al., 2013) first processed LC/IM-MS data as a LC/MS data without taking into account the ion mobility dimension, and the CCS values were used to identify unknown biomarkers, in a second step. (Crowell et al., 2013) developed one of the first freely available software to extract features from LC/IM-MS data sets. This software called LC/IM-MS Feature Finder, has been used in proteomic studies (May et al., 2018) but also in metabolite investigation such as the work of (Kyle et al., 2017), who studied the degradation of lipids and polar metabolites from 15-year old serum and dried blood samples.

6.2. Multidimensional representation for compound identification

Multidimensional representation of IM-MS and hyphenated IM-MS (e.g., LC/IM-MS) data is complex but can be useful for obtaining complementary information about the sample. Typically, isomers or isobar species are distinguished through a 2D plot of m/z versus mobility (drift time or arrival time distribution) range (Dwivedi et al., 2010). For multidimensional data generated by LC/IM-MS or other front-end technique coupled to IM-MS, a 2D plot of mobility versus m/z ratio is generally generated from a specific retention time range to reveal co-eluted isomer species (see **Figure 6**) (Stephan et al., 2016a).

More importantly, the correlation between m/z and ion mobility values represented by trendlines called mobility-mass correlation curves (MMCCs), was found to be specific to biochemical classes, for example, peptides, lipids, oligonucleotides, and small molecules (Paglia et al., 2015; Zheng et al., 2017a). The distribution of different charge states in different areas of the mobility-mass plot is helpful to extract relevant information from complex mixtures. Zang et al., for example, reported a distinct region separated from others (doubly charged compounds or unidentified compounds), consisting of single charged ions putatively identified as polar metabolites from serum extracts analysis (Zang et al., 2018). Mobility mass correlations for different chemical classes can be used to classify unknown compounds based on their location in the mobility-mass plot, thus improving their identity assignment. As demonstrated by (Munisamy et al., 2012) through IM-MS analysis of biomass samples, a compound detected at m/z 246.8, previously assumed to be a pentose-HSO₄ adduct, was in fact identified as an inorganic compound (contaminant from sample treatment) thanks to the MMCC of inorganic salt ions.

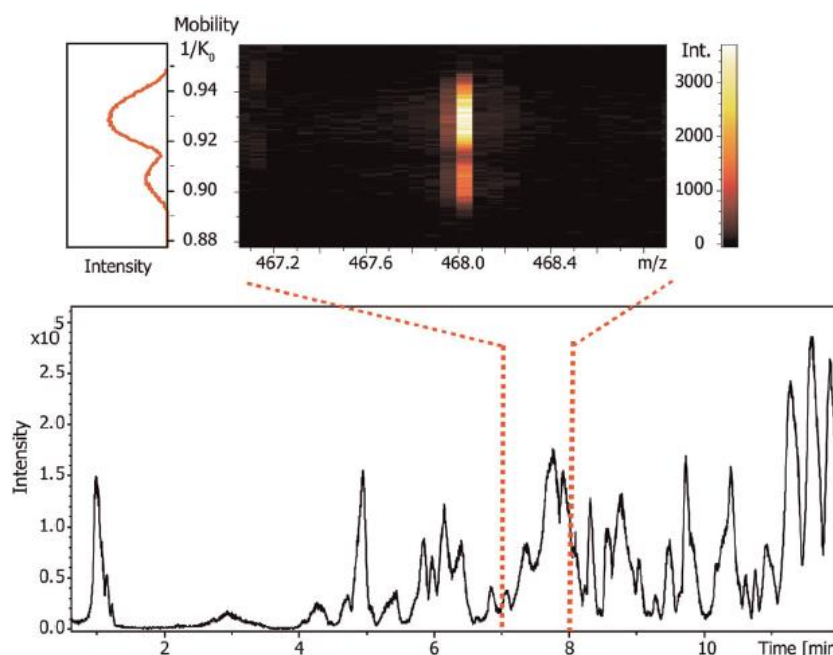


Figure 6. Two-dimensional representation of mobility versus m/z from the LC/IM-MS analysis of urine from rat exposed to vinclozolin within a 7.0–8.0 min RT range. From the base peak chromatogram, an overall mobility versus m/z plot is created. It is zoomed on species at m/z 468 which could correspond to isomeric glucuronide conjugates of vinclozolin metabolites. Two distinct mobility peaks can be distinguished. (Delvaux, Rathahao-Paris, and Alves, unpublished results). LC, liquid chromatography; IM-MS, ion mobility spectrometry – mass spectrometry

Nevertheless, broad trendlines were observed for small metabolites certainly due to their high structural heterogeneities. For more than 500 small molecules, including metabolites and xenobiotics, analyzed in negative and positive ionization using DTIMS, the distribution of CCS values for primary metabolites was found to be larger than for secondary metabolites or for xenobiotics (Zheng et al., 2017a). Different CCS trendlines have been shown to depend on the metabolite classes, such as amino acids, fatty acids, lipid mediators, nucleotides, steroids, and sugars, which can be useful for unknown compound identification.

In fact, MMCCs have been widely used in shotgun lipidomics. Lipids are separated from other biomolecular classes on the mass-mobility plot, making linear MMCCs within each lipid class an efficient tool for lipid mapping (see **Figure 7A**) (Leaprot et al., 2019; Paglia et al., 2015). Indeed, within each individual lipid class, the trendlines are mainly oriented by the acyl tail length and the degree of unsaturation (see **Figure 7B**) (Leaprot et al., 2019; Paglia et al., 2015). Hence, the use of MMCCs facilitates the characterization of lipids in complex biological samples.

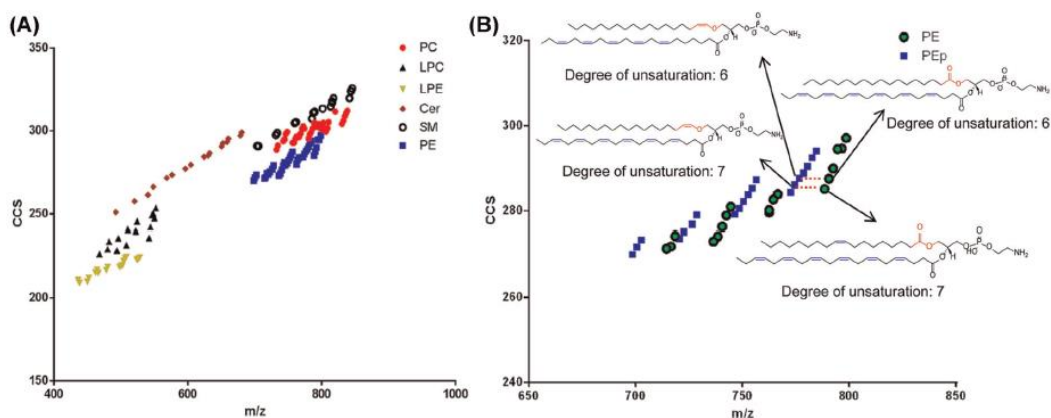


Figure 7. Mass-mobility plots, that is, experimental TWCCSN2 versus m/z ratios (A) for different lipid classes (B) for PE and Pep families. When the number of carbons in the acid tail increases the m/z increases and when the degree of unsaturation increases CCS decreases, generating specific trendlines within each lipid class. Reprinted with permission from (Paglia et al., 2015). ©American Chemical Society. CCS, collisional cross section; PE, phosphatidylethanolamine; Pep, plasmalogen PE

6.3. CCS as a complementary criterion for metabolite identification

According to the Metabolomics Standards Initiative (MSI) (Sumner et al., 2007), four different confidence levels for the metabolite identification are defined, including identified metabolites (level 1) requiring matching data (at least two orthogonal features) to authentic chemical standards analyzed under identical experimental conditions, putatively annotated metabolites (level 2) based on spectral similarities with libraries (without chemical reference standards), putatively characterized compound classes (level 3) based on compound class data, and unknown compounds (level 4). CCS has been proposed as one of the orthogonal descriptors of molecules required for the compound identification with the main advantage of high reproducibility (see Section 6.3.1), making it a good parameter for the creation of metabolite databases (see Section 6.3.2).

6.3.1. Reliable CCS values

High identification confidence can be achieved thanks to the robustness and repeatability of CCS measurements. A relative standard deviation for CCS values less than 2% was generally cited as an accepted experimental error for the database query (Paglia and Astarita, 2017; Paglia et al., 2015). But this tolerance value could be limiting for the compound identification, especially for isomers with very close CCS values. Many studies have showed high accuracy in CCS measurements, typically replicated (intra-platform) measures have an RSD < 0.5% (see **Figure 3**) (Paglia et al., 2015; Sinclair et al., 2018). Very good inter-day repeatability was also demonstrated for large-scale CCS measurements ($n = 297$) over 4 months with errors of less

than 0.9% (Hernández-Mesa et al., 2019). As well, both IM-MS and LC/IM-MS have been shown to provide comparable CCS values, confirming the repeatability of the CCS measurements using both analytical approaches (Nye et al., 2019). A critical issue is inter-laboratory repeatability, which is essential for sharing and querying freely available CCS database. Almost all inter-laboratory studies were conducted using the same ion mobility cell geometry. For example, a low RSD ($< 0.3\%$) and an average bias of less than 0.5% were obtained for CCS measurements of more than 120 charged species on four DTIMS instruments from different laboratories, demonstrating good reproducibility of the CCS values measured with this instrumentation (Stow et al., 2017). Another inter-site study showed the robustness of CCS measurements on different TWIMS systems: the CCS values obtained for more than 450 metabolites on two different TWIMS instruments (i.e., Synapt G2-S and G2-Si versions) differed by less than 1% with a maximum difference of 2% from the external CCS data acquired on an older generation TWIMS instrument (Synapt HDMS Q-TOF) (Nye et al., 2019). More importantly, CCS measurements on different ion mobility instruments were also compared (Hinnenkamp et al., 2018; Oranzi et al., 2019). A bias of less than 1% was obtained for CCSs of vitamin D and its epimer measured on four different ion mobility platforms such as a low pressure DTIMS, an atmospheric pressure DTIMS, a TWIMS, and a TIMS (Oranzi et al., 2019). Similarly, CCS deviations of about 1% were found for the protonated and sodiated ions of most of the 124 molecules analyzed on the TWIMS and DTIMS instruments (Hinnenkamp et al., 2018). As already mentioned (see Section 4.2), weak matrix effects were observed for the CCS determination from the IM-MS (Kaplan et al., 2009) and LC/IM-MS (Paglia et al., 2014) analysis of biological matrices.

6.3.2. CCS databases

Incorporating the CCS criterion into the compound identification process is expected to reduce the number of false positives compared to using accurate mass matching alone (Paglia et al., 2015), allowing greater confidence in the compound identity assignment. Nevertheless, the number of compound hits with the CCS database depends mainly on the chosen CCS tolerance (see discussion below) (Paglia et al., 2015; Paglia and Astarita, 2017). Note that some authors have pointed out that mass and mobility are two somewhat related parameters (see MMCCs Section 6.2) and therefore not completely orthogonal. Hence, the combination of CCS values with MS/MS spectra and/or retention times (LC/IM-MS method) has been proposed as a way to achieve ultimate identification confidence.

Table 2. List of recently established experimental CCS databases of metabolites, lipids and xenobiotics (for $n > 100$)

Compound type	CCS	Number of compounds (number of CCS)	Instrument/method	References
metabolites	$^{DT}CCS_{N_2}$	400 metabolites	DTIM-MS: Agilent 6560 Ion Mobility–Q-TOF MS (Agilent Technologies Inc.)	Zhou et al. (2016)
	$^{DT}CCS_{N_2}$	more than 500 metabolites and xenobiotics	DTIM-MS: Agilent 6560 Ion Mobility–Q-TOF MS (Agilent Technologies Inc.) using nanoESI, APCI and APPI sources	Zheng, Aly, et al. (2017)
	$^{DT}CCS_{N_2}$	417 metabolites (1246 CCS (701+/545–))	DTIM-MS: Agilent 6560 Ion Mobility–Q-TOF MS (Agilent Technologies Inc.)	Nichols et al. (2018)
	$^{TW}CCS_{N_2}$	125 metabolites (209 CCS: 96+/113–)	TWIM-MS: Synapt G2 HDMS (Waters Corp.) from 3 independent laboratories	Paglia et al. (2014)
	$^{TW}CCS_{N_2}$	510 metabolites (942 CCS: 463+/479–)	TWIM-MS: two Synapt G2 S and Synapt G2 Si versions (Waters Corp.)	Nye et al. (2019)
lipids	$^{DT}CCS_{N_2}$	130 lipids	DTIM-MS: ToFwerk IMS-TOF	Groessl et al. (2015)
	$^{DT}CCS_{N_2}$	380 lipids (458 CCS: 329+/129–)	DTIM-MS: Agilent 6560 Ion Mobility–Q-TOF MS (Agilent Technologies Inc.)	Zhou et al. (2017)
	$^{DT}CCS_{N_2}$	429 lipids (4 lipid classes)	UPLC DTIM-MS analysis of bovine milk samples: Agilent 6560 Ion Mobility–Q-TOF MS (Agilent Technologies Inc.)	Blaženović et al. (2018)
	$^{DT}CCS_{N_2}$	217 lipids, 7 lipid classes (456 CCS)	DTIM-MS: Agilent 6560 Ion Mobility–Q-TOF MS (Agilent Technologies Inc.)	Leaptrot et al. (2019)
	$^{TW}CCS_{N_2}$	244 lipids, 13 lipid classes (244 CCS: 101+/143–)	TWIM-MS: different Synapt G2 HDMS (Waters Corp.)	Paglia et al. (2015)
	$^{TW}CCS_{N_2}$	Lipids, 12 lipid classes (250 CCS: 165+/93–)	UPLC-TWIM-MS: Synapt G2-Si HDMS (Waters Corp.)	Hines, Herron, et al. (2017)
	$^{DT}CCS_{N_2}$	92 peptides, 125 carbohydrates, 314 lipids, 63 tetraalkyl-ammonium salts and derivatives. (594 CCS+)	DTIM-MS: Agilent 6550 Ion Mobility–Q-TOF MS (Agilent Technologies Inc.)	May et al. (2014)
	$^{DT}CCS_{N_2}$	124 xenobiotics (64 pesticides and 25 of their metabolites, 35 pharmaceuticals)	DTIM-MS: Agilent 6560 Ion Mobility–Q-TOF MS (Agilent Technologies Inc.)	Hinnenkamp et al. (2018)
Other specific compound classes	$^{DT}CCS_{N_2}$	Natural products, drugs and 275 pesticides in different drift gases	DTIM-MS: Agilent 6560 Ion Mobility–Q-TOF MS (Agilent Technologies Inc.)	Kurulugama et al. (2015)
	$^{DT}CCS_{N_2}$	About 500 compounds found in wastewater	DTIM-MS: Agilent 6560 Ion Mobility–Q-TOF MS (Agilent Technologies Inc.)	Stephan, Hippler, et al. (2016)
	$^{DT}CCS_{N_2}$ and $^{TW}CCS_{N_2}$	2000 drugs and drug-like compounds tested (1425 CCS+)	TWIM-MS: Vion IM–Q-TOF-MS (Waters Corp.) TWIM-MS: Synapt G2-Si HDMS (Waters Corp.)	Hines, Ross, et al. (2017)
	$^{TW}CCS_{N_2}$	300 endogenous steroids metabolites(phase I, phase II and exogenous synthetic compounds) (1080 CCS)	TWIM-MS: Synapt G2-S HDMS (Waters Corp.)	Hernández-Mesa et al. (2018)
	$^{TW}CCS_{N_2}$	364 xenobiotics, pharmaceuticals, drugs of abuse, and their metabolites (357 CCS+)	UHPLC/TWIM-MS: VION IMS QTOF (Waters Corp.)	Møllerup et al. (2018)
	$^{TIMS}CCS_{N_2}$	146 authentic plant natural products (343 CCS –)	UHPLC-TIMS-QTOF-MS TimsTOF Pro. (Bruker Daltonics)	Schroeder et al. (2019)

Note: Almost all of the studies were conducted in both positive and negative ESI ion modes. CCS values were generally reported for different types of ions (protonated/deprotonated, adduct and fragment ions). Number of CCS values reported in the positive and negative ionization modes are reported as number + and number –, respectively. Abbreviations: APCI, atmospheric pressure chemical ionization; APPI, atmospheric pressure photoionization; CCS, collisional cross section; DTIM, drift time ion mobility spectrometry; TIMS, trapped ion mobility spectrometry; TWIMS: travelling wave ion mobility spectrometry, MS, mass spectrometry.

More and more CCS databases are being created to assist the effort for compound annotation in untargeted metabolomic studies (see **Table 2**). However, their construction poses some challenges. Unlike conventional chromatography techniques, ion mobility, and therefore the measured CCS values depend on the ion source conditions, on the type of ionic species considered but also on the interactions between the ionic species and the buffer gas (see Sections 5.2 and 5.3). Hence, the nature of the ions (e.g., $[M + H]^+$ or $[M + Na]^+$) as well as the instrument and buffer gas used should be provided (Gabelica et al., 2019; May et al., 2017). For example,

^{DT}CCS_{N₂} refers to CCS measured on a DTIMS instrument using N₂ as the drift gas. It is also recommended to report primary results obtained from IM-MS experiments (i.e., drift time, reduced mobility, etc.). Afterwards, even if CCS is not an instrument dependent parameter, the CCS determination accuracy depends on the calibration procedure. Indeed, CCS can only be calculated directly from the drift time measured on a DTIMS instrument (multiple field step mode, see Section 3) whereas a calibration procedure using calibrants with known CCS values must be performed for dynamic field devices such as TWIMS, TIMS or single-step mode DTIMS. Therefore, the calibrants chosen have a direct impact on the accuracy of CCS measurements, and they must be well-defined and reported. The use of inappropriate calibrant ions can induce systematic errors as indicated by (Hines et al., 2016). A mixture of polyalanine standards is typically employed for CCS calibration but their use resulted in an error of up to 6% for the lipid CCS determination (Hines et al., 2016). Among the different types of calibrants tested, standard compounds with structural similarities to the analytes provide the most accurate calibration. Indeed, the use of the phosphatidylethanolamine lipid family as calibrants allowed CCS measurements for phosphatidylcholine lipids with an error less than 2%. Choosing the right calibrants is therefore essential for building CCS databases, even if a consensual procedure has not yet been proposed. Alternatively, the creation of cross-laboratory databases has been proposed to reduce CCS deviations by integrating the mean CCS values measured on different instruments (Zhang et al., 2018). Recently, a comparison between a single-laboratory database (142 ions analyzed in triplicate on a TWIMS instrument) and a cross-laboratory database (142 ions analyzed in triplicate on four TWIMS) was performed for steroid metabolites (Hernández-Mesa et al., 2020). To evaluate the inter-laboratory database, 20 steroid metabolites were analyzed on the four TWIMS instruments. A 1.5% difference compared to the reference values was obtained for 90% and 84.4% of the values from the cross-laboratory database and the single-laboratory database, respectively.

Finally, various CCS databases are currently under construction. Typically, the experimental CCS values were obtained from direct IM-MS analysis of authentic compound standards without prior chromatographic separation (or more rarely using LC/IM-MS experiments). The majority of current experimental metabolomic and lipidomic CCS databases were produced using a DTIMS or TWIMS instrument with N₂ as buffer gas (May et al., 2017). To the best of our knowledge, the only database built with a TIMS device was produced by (Schroeder et al., 2019) for 146 plant metabolites with an average relative standard deviation of about 0.1%. Finally, hundreds of CCS values from metabolites, lipids, and xenobiotics have been characterized in recent years and it is expected to increase in the future (the main contributions

are listed in **Table 2**). Nevertheless, the metabolomic CCS database coverage is still limited compared to the total number of existing metabolites and lipids due to the lack of standard compounds and also technical bottlenecks such as poor ion mobility resolving power. Additionally, detection of metabolites with m/z below 150 has been reported to be difficult by (Nye et al., 2019).

A way to improve metabolite identification is the creation of computationally modeled CCS databases (Paglia et al., 2014) based on theoretical calculations (Prell, 2019). For this, 3D structure of the studied ions should first be optimized by the density functional theory which creates a set of geometries and associated partial atomic charges. These optimized structures are further used to compute the theoretical CCSs using dedicated software such as MOBCAL (Boschmans et al., 2016; Gabelica and Marklund, 2018). This software offers three different algorithms for the CCS determination: Projection Approximation (PA), Exact Hard Sphere Scattering (EHSS) and Trajectory Method (TM). However, the calculated CCSs display relatively high errors between 3% and 30%, depending on the structure optimization (Laphorn et al., 2013a) as well on the modeling method chosen (Campuzano et al., 2012). Theoretical calculations are computationally intensive, which limits the development of large-scale theoretical CCS databases. Nevertheless, a CCS calculator tool called Collidoscope, based on the TM significantly reduces the computation time compared to MOBCAL TM calculations thanks to parallelized computing and optimized sampling of trajectory parameters (Ewing et al., 2017). In addition, a recent *in silico* chemical library engine ISiCLE (*in silico* chemical library engine) has been proposed to provide 3D molecular conformers and geometry optimization from which theoretical CCS calculations can be done using a new version of MOBCAL called MOBCAL-SHM (shared memory) (Colby et al., 2019).

An alternative solution has emerged recently, combining experimental CCS measurements and machine-learning methods (i.e., predicted CCS database). It consists in using experimental CCS values (training data set), to define a prediction model capable of rapidly predicting the CCS of structurally similar compounds (using their molecular descriptors such as size, shape, charge, polarity, etc.). (Zhou et al., 2016) created a large-scale, freely available CCS prediction database called MetCCS, based on an initial CCS training set of 400 metabolite standards. Nowadays, the MetCCS database contains information on 35,203 metabolites within a 3% error (Zhou et al., 2016). A CCS prediction database for lipids, LipidCCS, containing 15,646 compounds, was also developed (Zhou et al., 2017). (Plante et al., 2019) proposed an alternative CCS prediction algorithm called DeepCCS, requiring only information on the compound's simplified molecular-input line-entry systems (SMILES) notation and the ion type as input. Recently,

(Zhou et al., 2020) introduced AllCCS, an atlas of ~12 million predicted CCS values for >1.6 million small molecules using a largescale training set from 14 experimental data sets (Hines et al., 2017a, 2017b; Nichols et al., 2018; Zheng et al., 2017a; Zhou et al., 2017, 2016).

Despite great promise, CCS databases still need to be used with caution. Indeed, (Hinnenkamp et al., 2018) reported a high correlation between CCS measured by DTIMS and TWIMS devices for the majority of analytes but also observed some exceptions with CCS variations up to 6.2%. Hence, some uncertainties remain associated with CCS measurements, a major issue being the calibration procedure, which justifies the proposal of a 2% threshold for the CCS database query (Paglia et al., 2015; Paglia and Astarita, 2017). However, tolerances below 1% could strongly improve the compound annotation matching and identification confidence. This must be achieved for internal CCS databases (using the same IM-MS instrumentation, operating conditions and above all the same calibration procedure). Otherwise, the observed CCS shifts in inter-laboratory studies may be caused by the use of different ion-source conditions (Nye et al., 2019). Finally, identifying a compound with an high degree of confidence based on CCS values will benefit from the improved ion mobility resolution of a recent ion mobility device such as TIMS or cyclic IMS cells, as suggested by (Kaufmann et al., 2020).

7. Conclusion and perspectives

Nowadays, different types of ion mobility devices exist and can be hyphenated to another separation technique allowing multidimensional separation. Its coupling with a mass spectrometer is very promising for the detection and characterization of gas phase species in complex biological matrices. Indeed, such an additional orthogonal separation increases the peak capacity. In particular, isomeric or isobaric compounds not resolved by MS alone could be distinguished (Dwivedi et al., 2010). Ion mobility is now increasingly used to analyze biological materials in proteomics and metabolomics. Importantly, as the number of analytes detected increases without increasing the analysis time, IM-MS emerges as a promising technique for high throughput metabolic phenotyping in large-scale analyses (Dwivedi et al., 2010; Zang et al., 2018). Its compatibility with various separation techniques, such as a chromatographic system or other ion mobility devices, provides multidimensional separation, which extends the metabolome coverage (Rainville et al., 2017). Interestingly, the CCS values provided by ion mobility have great utility in assisting in the metabolite identification (Paglia et al., 2015; Paglia and Astarita, 2017). However, the systematic use of ion mobility will be limited without addressing the challenges encountered in metabolomics. Most important is the

development of software tools capable of processing complex multidimensional data generated from ion mobility based methods (including multidimensional separation) as well as the construction of CCS databases to support the interpretation of metabolomic data. Further technical advancements, including improved ion mobility resolving power to enhance isomer separation and greater compatibility with high performance instruments other than TOF platforms (e.g. FTMS or imaging MS instrument) would promote a more widespread use of IM-MS in metabolomics.

Acknowledgment

We thank the MetaboHUB infrastructure (ANR-11-INBS-0010 grant) for the funding.

Conclusion du Chapitre I

Dans ce chapitre, nous avons montré l'intérêt du couplage IM-MS pour des applications métabolomiques. Cette technique permet, en effet, de produire des données métabolomiques avec des temps d'acquisition relativement court, ce qui peut être cruciale pour des études de cohortes d'échantillons, tout en fournissant deux critères d'identification des composés détectés : les mesures de CCS et m/z (ainsi que la possibilité d'acquérir en parallèle, des spectres MS/MS). Ce couplage combine, ainsi, l'avantage du très haut débit des méthodes DI-MS et des capacités de détection et d'identification des approches multidimensionnelles telles que la LC/MS ou la GC/MS. Par sa capacité à séparer les composés isomères, l'IM-MS est très prometteuse pour une couverture plus complète du métabolome. De nombreuses avancées technologiques réalisées ou encore en cours permettent d'envisager encore plus d'améliorations des capacités d'analyse du couplage IM-MS. Enfin, le CCS s'est révélé être un facteur d'identification très robuste encourageant la création de bases de données CCS en métabolomique.

**CHAPITRE II : SÉPARATION DE
MÉTABOLITES ISOMÈRES ET ANALYSE EN
MATRICES COMPLEXES**

Introduction du Chapitre II

Dans ce chapitre, la capacité de l'instrumentation TIMS à analyser et à séparer des métabolites isomères présents en solution de standards purs ou dans des matrices biologiques, a été évaluée. De technologie récente, le principe du TIMS (voir description en **Annexe 1**) se démarque des instruments de mobilité ionique classiques tels que DTIMS et TWIMS (voir **Chapitre I**). Cet instrument piège, en effet, les ions par mobilité décroissante avant de les éluer progressivement afin de les séparer. La résolution en mobilité peut, ainsi, être augmentée mais au détriment de la gamme de détection en mobilité (mode IM-MS global *versus* ciblé). Il faut, également, contrôler le nombre d'ions piégés dans la cellule pour éviter des effets de charge d'espace.

L'instrument TIMS-TOF a été acquis dans notre laboratoire en 2017. Mes travaux de recherches ont débuté par une étude préliminaire menée à partir de l'analyse de composés modèles : l'adénosine monophosphate (AMP) en mode d'ionisation négative et la désoxycorticosterone en mode d'ionisation positive, afin de déterminer les conditions optimales de séparation par mobilité ionique de ces composés de faibles masses moléculaires. Les effets de la concentration (voir **Figure II.1**) et de la gamme de détection de mobilités réduites (voir **Figure II.3**) sur la résolution ont notamment été testés. Nous avons, ainsi pu observer que lorsque la concentration augmente, l'intensité du pic mobilogramme augmente (voir **Figure II.2**) mais qu'en parallèle la résolution en mobilité diminue (voir **Figure II.1**). Cette observation démontre l'importance de contrôler le nombre d'ions et donc les potentiels effets de charge d'espace pour obtenir une analyse TIMS optimale. Il est à noter que des mobilogrammes exploitables ont pu être obtenus selon les composés étudiés à partir de concentrations de $1 \text{ à } 5 \cdot 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Une diminution de l'intensité a pu être constatée en mode ciblé (mode Ultra de la **Figure II.2**). Ainsi, afin d'obtenir des mobilogrammes optimaux, de faibles concentrations sont recommandées, ce qui constitue un avantage certain pour les analyses métabolomiques en matrice complexe où les métabolites sont généralement présents à faibles concentrations.

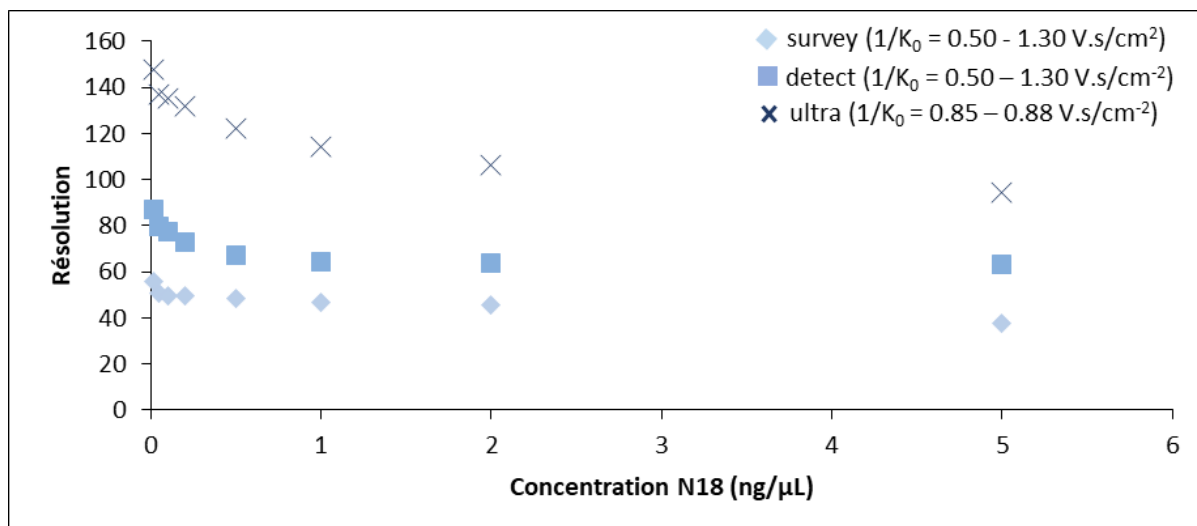


Figure II.1. Evolution de la résolution du pic de mobilité en fonction de la concentration du composé analysé dans les différents modes de mobilité (survey, detect, ultra, voir description en **Annexe 1**). Il faut souligner que les mesures d'intensité ont été effectuées à partir du spectre de mobilité extrait pour une espèce donnée, ici, le $[M+H]^+$ de la désoxycorticostérone mesuré à m/z 331. La désoxycorticostérone a été analysée à des concentrations comprises entre $0.02 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ et $5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$.

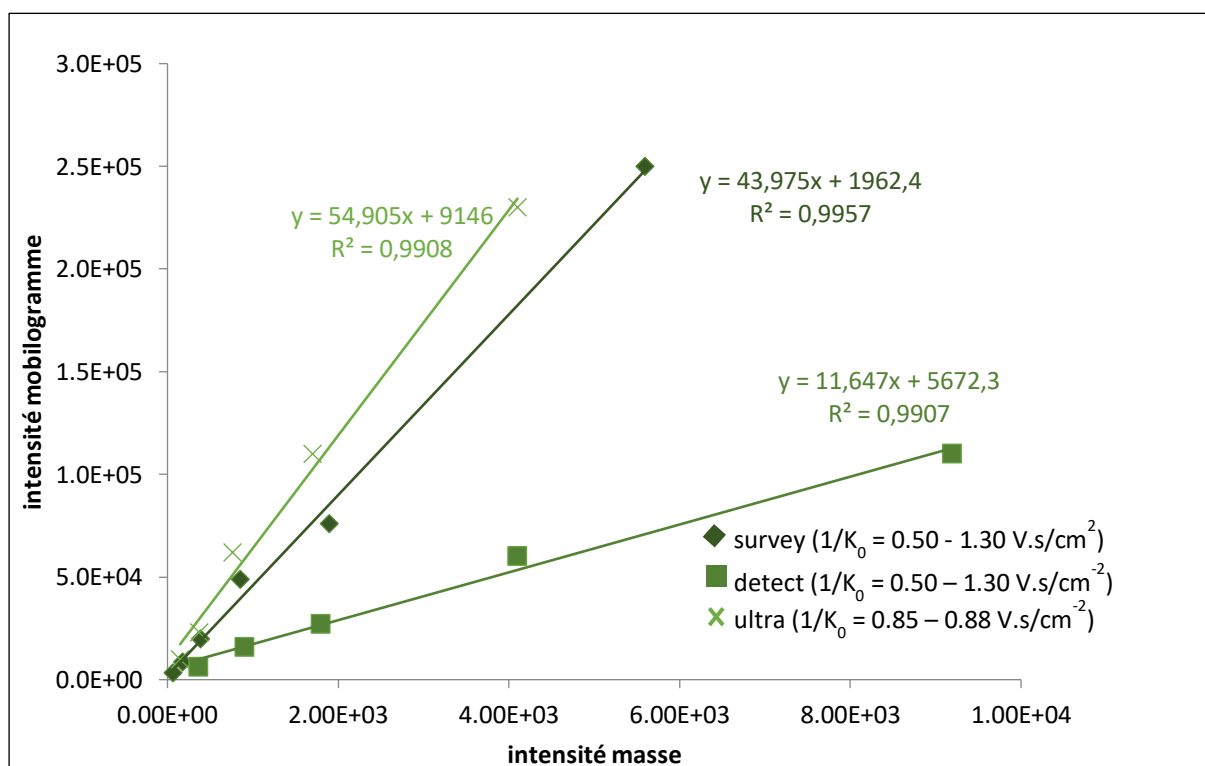


Figure II.2. Evolution des intensités (en unités arbitraires) du pic du mobilogramme en fonction de celle du pic du spectre de masse dans les différents modes de mobilité (survey, detect et ultra, voir **Annexe 1**). Ici, pour le pic de mobilité extrait à m/z 346 pour l'ion $[M-H]^-$ de l'AMP de concentration de 0.02 à $1 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ (chaque point correspond à une concentration différente).

Les effets de la largeur de la gamme (pour un mode de détection donné du TIMS) ont ensuite été étudiés. Il apparaît que plus la gamme de mobilité est large plus la résolution diminue (voir **Figure II.3**), et ce indépendamment de la vitesse de balayage. Ainsi, afin d'obtenir les meilleures conditions de séparation, la gamme de mobilité doit être optimisée, c'est-à-dire réduite au maximum (surtout en mode ultra).

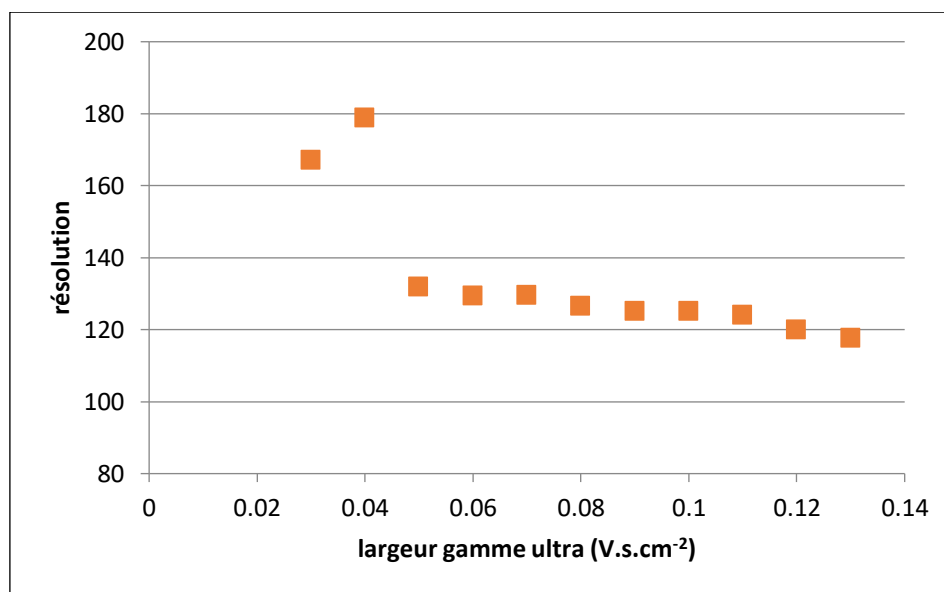


Figure II.3. Evolution de la résolution du pic de mobilité en fonction de la largeur de la gamme de mobilité en mode ultra (voir **Annexe 1**). Ici, pic de mobilité extrait à m/z 331 pour l'ion $[M+H]^+$ de la désoxycorticosterone à la concentration $0.2 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$.

Une fois ces paramètres optimisés, des méthodes spécifiques ont été développés pour l'analyse de deux familles d'isomères. Trois couples d'isomères de dérivés d'estradiol ont, tout d'abord, été étudiés. Ils ont été sélectionnés en tant que métabolites isomères modèles au vu de leur relation d'isomérisation variable (régio- et stéréoisomères). L'analyse IM-MS des standards en solution puis surchargés dans l'urine a été réalisée. Les résultats de cette étude sont présentés dans la première partie de ce chapitre. Les oligosaccharides du lait maternels (HMOs) qui constituent une classe chimique très complexe à analyser de par sa grande diversité de composés isobares/isomères ont ensuite été étudiés. La deuxième partie de ce chapitre décrit les résultats obtenus pour leur caractérisation, et plus important pour leur identification dans un échantillon de lait maternel.

II-1. Analyse d'isomères d'oestrogènes dans l'urine humaine

Comme évoqué plus haut, la capacité du TIMS à séparer les métabolites isomères a d'abord été évaluée par l'étude de trois couples d'isomères de dérivés estradiols, (i) estradiol-17 β (E₂ β) et son épimère (E₂ α), (ii) estradiol-3-glucuronide (E₂ β -3G) et estradiol-17-glucuronide (E₂ β -17G), et (iii) 2-méthoxyestradiol (2-MeO-E₂ β) et 4-méthoxyestradiol (4-MeO-E₂ β). Ces composés ont été choisis en tant que métabolites isomères modèles car ils nous permettent d'étudier des régio- et stéréoisomères ainsi que pour leur intérêt biologique. En effet, les estradiols sont connus pour avoir un effet globalement positif sur le maintien de l'homéostasie (Ikeda et al., 2019) mais ils peuvent également être utilisés dans les traitements hormonaux de substitution (Lobo, 1995). Cependant, certains métabolites d'estradiol peuvent augmenter le risque de développement de cancer (Gonzalez et al., 2019; Rižner, 2013; Rodriguez et al., 2001). Il est, donc, important de pouvoir distinguer et discriminer ces métabolites. C'est pourquoi après évaluation des meilleures conditions analytiques pour la séparation des isomères de ces trois couples, les standards ont été ajoutés à une urine humaine pour évaluer la possibilité par notre approche directe IM-MS de les détecter dans une matrice biologique.

Les résultats obtenus dans ce travail ont fait l'objet d'un article intitulé « *An emerging powerful technique for distinguishing isomers : TIMS-TOF for a rapid characterization of estrogen isomers* » publié dans **Rapid Communications in Mass Spectrometry** en 2020 (doi : 10.1002/rcm.8928).

Dans cet article, nous présentons la possibilité de distinguer des estrogènes isomères par des analyses directes IM-MS en ionisation négative et positive. L'ajout de lithium a été proposé pour améliorer la séparation des isomères sous forme d'adduits monomères et/ou dimères non covalents cationisés par le lithium. Nous avons également testé l'ajout d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) mais cela n'a pas amélioré la séparation des isomères, ces résultats n'ont donc pas été inclus dans l'article et ne seront pas non plus décrits ici.

An emerging powerful technique for distinguishing isomers: Trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of estrogen isomers

Aurélie Delvaux¹, Estelle Rathahao-Paris¹⁻², Sandra Alves¹

¹ Sorbonne Université, Faculté des Sciences et de l'Ingénierie, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), F-75005 Paris, France

² Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Abstract

Rationale: Isomer metabolites are involved in metabolic pathways, and their characterization is essential but remains challenging even using high-performance analytical platforms. The addition of ion mobility prior to mass analysis can help to separate isomers. Here, the ability of a recently developed trapped ion mobility spectrometry system to separate metabolite isomers was examined.

Methods: Three pairs of estrogen isomers were studied as a model of isomeric metabolites under both negative and positive electrospray ionization (ESI) modes using a commercial trapped ion mobility spectrometry-TOF mass spectrometer. The standard metabolites were also spiked into human urine to evaluate the efficiency of trapped ion mobility spectrometry to separate isomers in complex mixtures.

Results: The estradiol glucuronide isomers (E₂β-3G and E₂β-17G) could be distinguished as deprotonated species, while the estradiol epimers (E₂β and E₂α) and the methoxyestradiol isomers (2-MeO-E₂β and 4-MeO-E₂β) were separated as lithiated adducts in positive ionization mode. When performing analyses in the urine matrix, no alteration in the ion mobility resolving power was observed and the measured collision cross section (CCS) values varied by less than 1.0%.

Conclusions: The trapped ion mobility spectrometry-TOF mass spectrometer enabled the separation of the metabolite isomers with very small differences in CCS values (ΔCCS% = 2%). It is shown to be an effective tool for the rapid characterization of isomers in complex matrices.

1. Introduction

Mass spectrometry (MS)-based analytical methods have experienced tremendous improvements. Indeed, advances in MS instrumentation (e.g., instrumental configurations and mass resolving power) and in hyphenated separation technologies (i.e., gas and liquid chromatography and their multidimensional analogues or capillary electrophoresis) offer the possibility to analyze multiple molecules in complex samples for applications in several domains such as forensic and environmental fields. Among analytical platforms used, hyphenated GC/MS and LC/MS methods (i.e., gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry) have been extensively employed (Rodriguez-Aller et al., 2013; Sahil et al., 2011).

Numerous metabolite isomers, including structural isomers and stereoisomers, are present in biological samples and the assignment of their identity is essential to understand their biological activities. Nevertheless, isomer characterization is challenging using hyphenated methods such as GC/MS or LC/MS; it requires optimization of chromatographic conditions for the separation of isomers and tandem mass spectrometry (MS/MS) for their annotation. Although MS/MS is a powerful tool for structural elucidation, the characterization of some isomers, and in particular stereoisomers, remains challenging due to their very similar fragmentation patterns.

Ion mobility spectrometry coupled to mass spectrometry (IM-MS) has emerged over the last decades as a complementary tool to address such problems. Ion mobility can separate gas-phase charged species based on their structure, i.e., their shape and charge. In addition to its ability to separate isomers, this technology is very promising for the characterization of complex mixtures thanks to an additional data feature which can be used as a supplementary criterion for compound identification: the collisional cross section (CCS). IM-MS as a stand-alone technique or as a hyphenated system, such as LC/IM-MS, has been used for isomer separation and mixture analysis. Different configurations of ion mobility instrumentations exist that can be coupled with mass spectrometry (Laphorn et al., 2013b).

Classical drift tube ion mobility spectrometry (DTIMS) and traveling wave ion mobility spectrometry (TWIMS) are usually employed for complex sample fingerprinting (Armenta et al., 2011; Campuzano and Giles, 2019), while field-asymmetric ion mobility spectrometry (FAIMS) is typically used as an ion filter to study a specific set of known compounds, thus allowing the mass spectrometric sensitivity to be increased (Guddat et al., 2009; Ray et al., 2015). Trapped ion mobility spectrometry (TIMS) is a technique that provides high analytical separation power, thus improving molecular characterization (Fernandez-Lima et al., 2011a, 2011b; Ridgeway et al., 2018). In particular, the TIMS device is the only instrument that allows the operator to tune the resolving power (see section 2) to reach high mobility resolution, up to 350 (Adams et al., 2016; Jeanne Dit Fouque et al., 2019). TIMS-TOF (Time-Of-Flight) mass spectrometry has been used to characterize different chemical classes including lipids (Jeanne Dit Fouque et al., 2019), peptides, carbohydrates, polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) (Adams et al., 2016), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Castellanos et al., 2014), or opioids (Adams et al., 2018). Other types of ion mobility design such as Structures for Lossless Ion Manipulations (Tolmachev et al., 2014) or Cyclic Ion Mobility (Giles et al., 2019) have been developed more recently, offering higher separation capacities, for example, in the distinction of pentasaccharide conformations but also of their anomers, which cannot be easily achieved with other IM-MS platforms (Deng et al., 2016; Ujma et al., 2019). These approaches

are of great interest for the characterization of small biomolecules, especially in metabolomics studies because most of the metabolites are isomers.

Ion mobility separation of various steroid derivatives, including isomers, has been reported using different IM-MS configurations, with or without chromatography coupling. For example, LC/FAIMSMS/MS has been implemented for steroid quantification (Guddat et al., 2009; Ray et al., 2015), and LC/TWIMS-MS was used for the creation of a CCS database of about 300 steroid derivatives, including sulfate and glucuronide conjugates (Hernández-Mesa et al., 2018, 2019). Direct introduction (DI)-IM-MS has also been tested for the distinction of steroid isomers and especially of epimers (i.e., differing by one chiral center), which remains difficult because of their very close CCS values (Ahonen et al., 2013; Chouinard et al., 2017a, 2017b; Reading et al., 2016; Rister et al., 2019a, 2019b; Rister and Dodds, 2019). Different methods have been proposed to enhance the ion mobility separation of isomers, such as chemical derivatization (Ahonen et al., 2013) or the formation of cation adducts (Chouinard et al., 2017a, 2017b; Rister et al., 2019a, 2019b; Rister and Dodds, 2019). For example, (Chouinard et al., 2017a, 2017b) succeeded in separating five pairs of steroid isomers in the form of sodiated dimer species while (Rister et al., 2019a, 2019b; Rister and Dodds, 2019) reported the use of metal adduction to improve the sensitivity and selectivity of isomer detection.

In this work, we investigated the potential of a TIMS-TOF device to distinguish metabolite isomers in a complex mixture by DI-IM-MS. Three pairs of estrogen isomers were chosen as model isomeric metabolites. Endogenous hormone estrogens are known to have a vital role in the development and maintenance of health (Ikeda et al., 2019). They are also used in hormone replacement therapy of postmenopausal women (Lobo, 1995) and may have adverse effects on human health, such as an increased risk of certain cancers (Gonzalez et al., 2019; Rižner et al., 2013; Rodriguez et al., 2001). The identification of their metabolites is the key step to providing biomarkers of metabolic disruptions since a given isomer can be associated with a specific pathological development. For example, 4-methoxyestradiol has been described as a potential biomarker of breast cancer while its isomer, 2-methoxyestradiol, may have a protective effect against estrogeninduced cancers (Wang et al., 2015).

Here, three pairs of regio- and stereoisomers of estradiol were studied: (i) estradiol-17 β (E₂ β) and its epimer (E₂ α), (ii) estradiol-3-glucuronide (E₂ β -3G) and estradiol-17-glucuronide (E₂ β -17G), and (iii) 2-methoxyestradiol (2-MeO-E₂ β) and 4-methoxyestradiol (4-MeO-E₂ β) (see **Figure 1A**). Good separation of the structural isomers of estradiol glucuronide was obtained in negative ion mode while estradiol and its epimer as well as methoxyestradiol isomers could be distinguished unambiguously in the form of metal adduct dimers in positive ion mode. In

addition, urine samples spiked with these estradiol derivatives were analyzed to evaluate the robustness of the ion mobility separation in complex mixtures. Importantly, the urine matrix did not show an extensive influence on the experimental $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values and did not alter the isomer separation.

2. Experimental

2.1. Chemicals and samples

Ultrapure water (specific resistance of $18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) was produced by a Select HP water purification system (Purite France Eau, Lormont, France). Methanol (UHPLC grade) was purchased from VWR Chemicals (Fontenay sous Bois, France). Estradiol, 1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol ($E_2\beta$), its epimer, 1,3,5(10)-estratriene-3,17 α -diol ($E_2\alpha$), estradiol 3-glucuronide ($E_2\beta$ -3G) and estradiol 17-glucuronide ($E_2\beta$ -17G) were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France). 2-methoxyestradiol (2-MeO- $E_2\beta$) and 4-methoxyestradiol (4-MeO- $E_2\beta$) were obtained from Steraloids Inc. (Newport, RI, USA). Lithium chloride (LiCl) was acquired from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). ESI-L Low Concentration Tuning Mix calibration solution (G1969-85000) was obtained from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

The working concentration was determined for each studied compound under the analytical conditions used to ensure a good MS response. The final concentrations in H₂O/MeOH solvent mixture (50:50, v/v) or in diluted human urine were in the range of 2 to 500 pg. μL^{-1} and are systematically reported in the figure captions. Lithium cationization was performed by adding LiCl, and the working concentration (1 or 5 ng. μL^{-1}) is reported in the captions. A urine sample was collected from a healthy volunteer and was stored at -20°C . Prior to IM-MS analysis, the urine was centrifuged and the supernatant was collected and diluted by a factor of 200 or 400 in H₂O/MeOH (50:50, v/v) and spiked with the standard compounds.

2.2. Ion mobility spectrometry-mass spectrometry

All DI-IM-MS experiments were performed through direct infusion electrospray ionization (ESI) on a trapped ion mobility quadrupole time-of-flight spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) at a flow rate of $3\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A detailed overview of the TIMS device and its principle of operation can be found elsewhere (Fernandez-Lima et al., 2011a, 2011b; Hernandez et al., 2014; Ridgeway et al., 2018). Briefly, the TIMS device measures characteristic reduced mobilities, K_0 , from which nitrogen $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values are then calculated, using a calibration step (see below). A special feature of the TIMS analyzer is the

possibility to change the mobility separation resolving power by modifying the elution scan rate (enhanced separation is obtained by increasing the ramp time and narrowing the scan voltage) (Hernandez et al., 2014). The resolving power in a TIMS instrument is calculated according to **Equation (1)**:

$$R = \frac{K_0}{\Delta K_0} = \frac{CCS}{\Delta CCS} \quad (1)$$

It should be noted that, despite resolving powers up to 350 being reported using TIMS devices (Adams et al., 2016; Jeanne Dit Fouque et al., 2019), the experimental resolving power is highly dependent on the species being studied. Indeed, the ion diffusion phenomenon and eventually the existence of different ion structures (various charge locations for polyfunctional compounds) lead to an increased ion mobility peak width (large ion population for one species) which results in a decrease in the detected ion mobility resolving power (Gabelica et al., 2019). In our study, isomer separations were achieved with a resolving power ranging from 80 to a maximum of 180, depending on the ion mobility mode used (see below) and the compounds studied.

The quality of an ion mobility separation is quite difficult to evaluate between instruments (different ion mobility configurations and principles) and laboratories (variable operating conditions such as gas pressure and voltage, but also calibration procedure). In addition, there is no consensus about a single criterion which could be used to evaluate the analytical selectivity among different ion mobility configurations. The use of the typical time-based resolving power and two-peak resolution has recently been questioned by (Dodds et al., 2017). They have shown, for example, that TWIMS operates at separation capabilities greater than the suggested time-based resolving power, and concluded that the comparison of the separation efficiency of different types of ion mobility instruments can be conducted through the differences in CCS. Therefore, in the present work, the quality of ion mobility separation is discussed in terms of the experimental CCS difference, i.e., $\Delta CCS\%$, see **Equation (2)**, and not with a two peak resolution or resolving power parameters.

$$\Delta CCS\% = \frac{CCS_B - CCS_A}{\text{average } CCS_{B,A}} \times 100 \quad (2)$$

Here, the DI-IM-MS experiments were conducted using TIMS-TOF separation with different mobility ranges available: (i) the survey mode for a broad mobility range, (ii) the detect mode for a medium range size, and (iii) the ultra mode for a very small mobility range providing the best resolving power. In section 3, the mobility range obtained using the detect mode is described as a “detect range” and, in the same manner when the ultra mode is applied, “ultra

range” is used to refer to the mobility range used. Depending on the ion mobility scanning mode employed and the mobility range chosen, the scan rates range from 3 to 6Hz.

The mass-to-charge (m/z) and reduced mobility ($1/K_0$) ratios were independently calibrated before every experiment (external calibration) using a solution of sodium acetate and formate (recommended by the manufacturer) with an enhanced quadratic mode (see **Table S1**, supporting information) and the ESI-L Low Concentration Tuning Mix solution (Agilent) with the linear calibration mode, respectively. In positive ion mode, the tuning mix calibrant ions at m/z 322.0481 ($C_6H_{19}N_3O_6P_3^+$), 622.0289 ($C_{12}H_{19}F_{12}N_3O_6P_3^+$) and 922.0098 ($C_{18}H_{19}F_{24}N_3O_6P_3^+$) are characterized by $1/K_0$ values of 0.736, 0.991 and 1.199 $V.s.cm^{-2}$, respectively. In negative ion mode, the tuning mix calibrant ions at m/z 301.9981 ($C_6HF_9N_3O^-$), 601.9790 ($C_{12}HF_{21}N_3O^-$) and 1033.9881 ($C_{20}H_{18}F_{27}N_3O_8P_3^-$) are detected at $1/K_0$ values of 0.669, 0.882 and 1.258 $V.s.cm^{-2}$, respectively. Note that the TIMS analyzer calibration is performed systematically for the specific settings of one experiment (scan rate, range and pressure), i.e., the detect and ultra scanning modes are calibrated independently.

All mass spectra were acquired in the m/z 50–1500 range and the mobility range was adapted to the mobility detected for each compound. The capillary temperature of the ion source was maintained at 200°C, the drying gas (N_2) flow rate was set at 3.0 $L.min^{-1}$, and the nebulizer gas (N_2) pressure at 0.3 bar. Nitrogen was used as the spray and drift gas. The end plate offset and the deflection delta potentials were 500 V and –70 V, respectively. The positive ion conditions were: electrospray voltage, –4500 V; Funnel 1 RF, 300 Vpp; and Funnel 2 RF, 300 Vpp. In negative ion mode, the following conditions were applied: electrospray voltage, +3500 V; Funnel 1 RF, 100 Vpp; and Funnel 2 RF, 200 Vpp. All the parameters are controlled through oTOF Control software (Bruker Daltonics) and the data are treated using DataAnalysis 5.0 (Bruker Daltonics).

3. Results and discussion

Three pairs of isomeric estradiol derivatives (i.e., $E_2\alpha/E_2\beta$, $E_2\beta$ -3G/ $E_2\beta$ -17G and 2-MeO- $E_2\beta$ /4-MeO- $E_2\beta$) were studied to evaluate the ability of the TIMS analyzer to distinguish isomers (see **Figure 1A**). Note that each average $^{TIMS}CCS_{N_2}$ measurement is obtained from repeated measurements ($n = 3-5$) using both ultra and detect modes (see section 2), with a relative standard deviation <0.5% (see standard deviation values reported in **Figures 1 and 2**). The effects of biological matrices on the isomer distinction were also investigated.

3.1. Detection of estrogens in negative ion mode

Estrogens, especially their conjugated derivatives, are usually analyzed in negative ion mode as this provides higher sensitivity than positive ion mode (Díaz-Cruz et al., 2003). Hence, each estrogen compound was first analyzed alone and in a mixture with its isomer in negative ion mode. The results obtained using the ultra mode of the TIMS analyzer (see section 2) are presented in **Figures 1B–1D**. The $[M - H]^-$ ions of the estradiol epimers, $E_2\alpha$ and $E_2\beta$, could not be separated (see **Figure 1B**) because they display a very small CCS difference ($\Delta\text{CCS}\% = 0.1\%$) between isomers. A greater CCS difference between isomers ($\Delta\text{CCS}\% = 0.5\%$) was obtained for the $[M - H]^-$ ions of the methoxyestradiol isomers, 2-MeO- $E_2\beta$ and 4-MeO- $E_2\beta$, but this was not sufficient to separate these isomers when they were in a mixture (see **Figure 1C**).

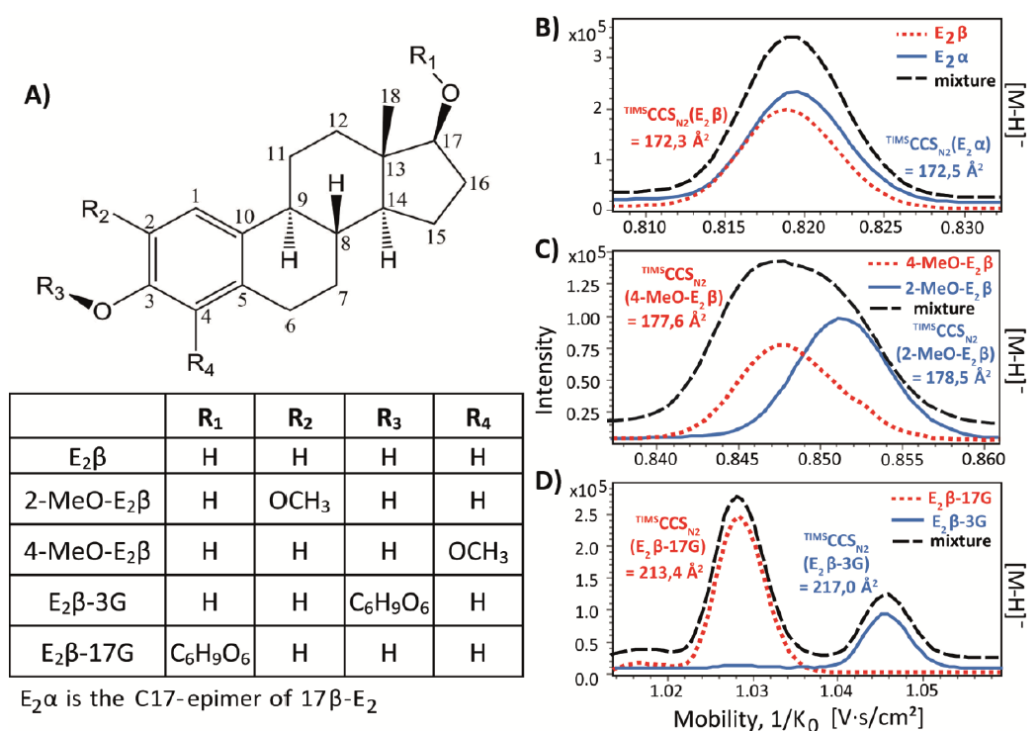


Figure 1. A) Structures of the estrogens studied. B–D) IM-MS analysis of each isomer and the mixtures of isomer pairs in negative ESI mode. Ion mobility spectra extracted at: B, m/z 271 for the $[M - H]^-$ ions of $E_2\alpha$ (50 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) and $E_2\beta$ (50 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) using ultra range ($1/K_0 = 0.79\text{--}0.87 \text{ V.s.cm}^{-2}$), C, m/z 301 for the $[M - H]^-$ ions of 2-MeO- $E_2\beta$ (25 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) and 4-MeO- $E_2\beta$ (50 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) using ultra range ($1/K_0 = 0.82\text{--}0.90 \text{ V.s.cm}^{-2}$), and D, m/z 447 for the $[M - H]^-$ ions of $E_2\beta$ -3G (10 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) and $E_2\beta$ -17G (25 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) using ultra range ($1/K_0 = 1.00\text{--}1.08 \text{ V.s.cm}^{-2}$).

On the other hand, a well-resolved baseline separation was obtained for the $[M - H]^-$ ions of the estradiol glucuronides, $E_2\beta$ -3G and $E_2\beta$ -17G, with $\Delta\text{CCS}\% = 1.6\%$. It is worth mentioning that these isomers were separated at a nearly baseline level in the detect mode (see **Figure S1**).

Both mobility scanning modes enable the ion mobility separation of the estradiol glucuronide isomers in the millisecond timeframe with more or less ion mobility resolving power: $R_{\text{detect}} = 110$ and $R_{\text{ultra}} = 170$ for the detect and ultra mode, respectively (see section 2). Hence, the versatility of the TIMS device is interesting because different types of analysis can be performed depending on the mobility scan mode: the detect mode can be used for a comprehensive and global fingerprint and the ultra mode for a targeted approach. These results demonstrate the ability of the TIMS instrument to separate compounds with very close CCS values. In comparison, (Hernández-Mesa et al., 2018, 2019) reported mobility spectrum peaks resolved for steroid ions with 4% as the smallest $\Delta\text{CCS}\%$ value using a TWIMS instrument. From these results, the negative ESI mode can only be used to distinguish the glucuronide derivatives. To separate other isomers, experiments were performed in positive ESI mode.

3.2. Positive ionization with lithium addition to improve estrogen detection

Protonated species of steroid derivatives are known to give MS signals with low sensitivity (Soldin and Soldin, 2009), but the use of alkali cations could enhance the MS response (Cui et al., 2001). In addition, cationization was recently reported by (Rister et al., 2019a, 2019b; Rister and Dodds, 2019) as a way to systematically improve the ion mobility separation of steroid derivatives. In our study, a really weak ESI response was observed for the protonated estradiol derivatives with low intensity signals in the ion mobility spectrum. Sodiated species were observed without the addition of a metal salt and their MS signals were slightly better than those of the $[\text{M} + \text{H}]^+$ ions (data not shown). In the present study, the lithium cation was chosen to increase the MS response and above all to evaluate the ion mobility separation of the estradiol derivatives.

Each standard compound was first analyzed alone, then in a mixture with its isomer, to investigate their ion mobility separation in the form of lithium adducts. The presence of lithium monomer adducts or of $[\text{2M} + \text{Li}]^+$ dimer species depends on the concentrations of the LiCl and the estradiol standards; higher concentrations of both are required to form dimers. The ion mobility spectra of the lithiated adducts of the monomer and the dimer are presented in **Figure 2**. The ion mobility separation of the $[\text{M} + \text{Li}]^+$ ions was first examined. For the estradiol glucuronides, $\text{E}_2\beta\text{-3G}$ and $\text{E}_2\beta\text{-17G}$, ion mobility separation could not be achieved, probably due to the presence of several ion structures creating a broad ion mobility spectrum (data not shown). Nevertheless, the differences in mobility for the $[\text{M} + \text{Li}]^+$ ions of these isomers seem to be smaller than for their deprotonated forms. This observation is consistent with the results obtained by (Reading et al., 2016) who reported that the $[\text{M} - \text{H}]^-$ ions of estradiol glucuronides,

$E_2\beta$ -3G and $E_2\beta$ -17G, produced higher $\Delta\text{CCS}\%$ values between isomers than the positively charged forms (i.e., $[M + H]^+$, $[M + \text{NH}_4]^+$, $[M + \text{Na}]^+$ ions). Note that a partial separation of these estradiol glucuronide isomers in the form of sodium dimer adducts was observed by (Rister and Dodds, 2019) but poor isomer distinction was obtained for the monomer species using either positive or negative ion mode.

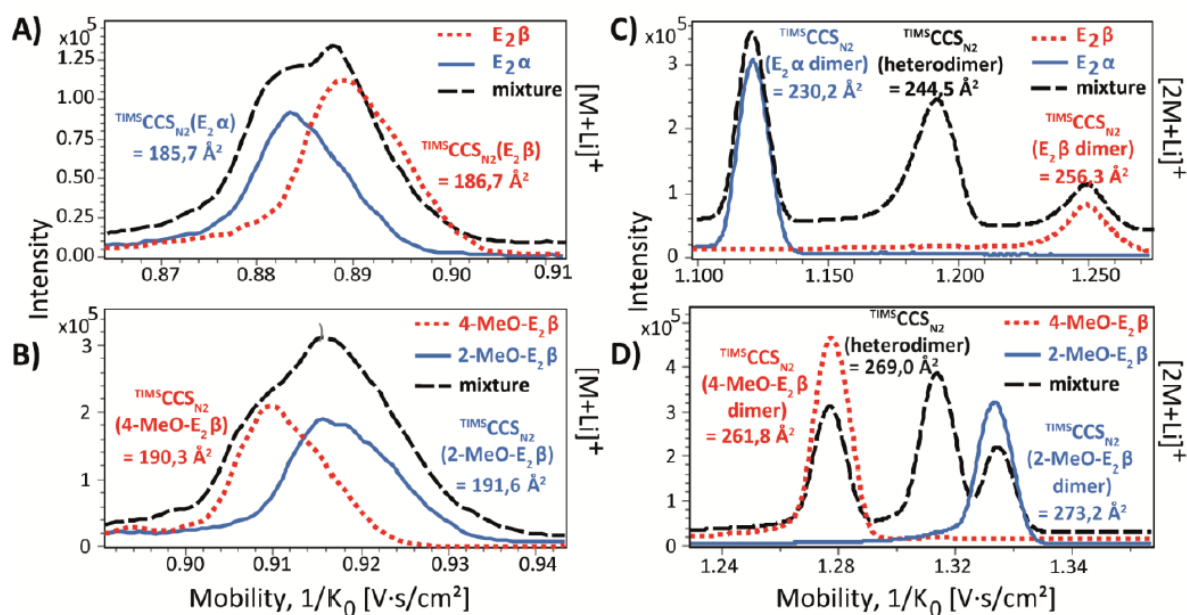


Figure 2. IM-MS analysis of each isomer and the mixtures of isomer pairs in positive ESI mode with addition of LiCl (1 ng.μL⁻¹ and 5 ng.μL⁻¹ for detection of monomer species and dimer adducts, respectively). Ion mobility spectra extracted at: A) m/z 279 for the $[M + \text{Li}]^+$ ions of $E_2\alpha$ (0.1 ng.μL⁻¹) and $E_2\beta$ (0.1 ng.μL⁻¹) using ultra range ($1/K_0$ = 0.86–0.94 V.s.cm⁻²), B) m/z 309 for the $[M + \text{Li}]^+$ ions of 2-MeO- $E_2\beta$ (0.1 ng.μL⁻¹) and 4-MeO- $E_2\beta$ (0.1 ng.μL⁻¹) using ultra range ($1/K_0$ = 0.84–0.96 V.s.cm⁻²), C) m/z 551 for the $[2M + \text{Li}]^+$ adducts of $E_2\alpha$ (0.5 ng.μL⁻¹) and $E_2\beta$ (0.5 ng.μL⁻¹) using detect range ($1/K_0$ = 0.80–1.30 V.s.cm⁻²), and D) m/z 611 for the $[2M + \text{Li}]^+$ ions of 2-MeO- $E_2\beta$ (0.25 ng.μL⁻¹) and 4-MeO- $E_2\beta$ (0.5 ng.μL⁻¹) using detect range ($1/K_0$ = 1.10–1.60 V.s.cm⁻²).

The lithiated monomer species of the estradiol isomers ($E_2\alpha$ and $E_2\beta$) gave a slightly better ion mobility separation with $\Delta\text{CCS}\%$ = 0.5% (see **Figure 2A**) than their deprotonated forms (see **Figure 1B**, $\Delta\text{CCS}\%$ = 0.1%). Similarly, for the methoxyestradiols, 2-MeO- $E_2\beta$ and 4-MeO- $E_2\beta$, the difference in mobility between isomers increased from $\Delta\text{CCS}\%$ of 0.5% to 0.7% for deprotonated forms and lithium adducts, respectively (see **Figures 1C and 2B**). However, no separation could be obtained for the mixture of these isomers. Nevertheless, the ion mobility spectra of the lithiated adducts from the isomer mixture analysis (see **Figures 2A and 2B** for estradiols, $E_2\alpha$ and $E_2\beta$, and methoxyestradiols, 2-MeO- $E_2\beta$ and 4-MeO- $E_2\beta$, respectively) were quite broad with the appearance of a shoulder reflecting the presence of the two isomers. Hence,

the identity of an isomer could be assigned based on the CCS value of an authentic isomer standard obtained under the same analytical conditions.

Dimer formation occurred at higher concentration (about five times more concentrated). Cationized dimers (with higher m/z values) were characterized by higher CCS values. More importantly, better ion mobility separation of the isomers was obtained as already reported (Chouinard et al., 2017a, 2017b; Rister et al., 2019a, 2019b; Rister and Dodds, 2019). The difference in mobility produced by the lithiated dimers of the estradiol stereoisomers, $E_2\alpha$ and $E_2\beta$, ($\Delta\text{CCS}\% = 10.7\%$, see **Figure 2C**) was higher than that obtained for the methoxyestradiol isomers, 2-MeO- $E_2\beta$ and 4-MeO- $E_2\beta$ ($\Delta\text{CCS}\% = 4.3\%$, see **Figure 2D**). Both homo- and heterodimer adducts were observed. The homodimer peak was similar to that detected in the analysis of a pure single isomer whereas the heterodimer appeared when analyzing an isomer pair; the peak intensity variation observed for this new peak when changing the concentration of one isomer confirms its identity (see **Figure S2**).

Interestingly, the formation of lithiated dimers allowed a full isomer separation, i.e., resolved mobility signals were detected for the homodimers as well as for the heterodimer adducts (see **Figures 2C and 2D** for estradiols, $E_2\alpha$ and $E_2\beta$, and methoxyestradiols, 2-MeO- $E_2\beta$ and 4-MeO- $E_2\beta$, respectively). To be precise, all the homo- and heterodimers of the $E_2\alpha/E_2\beta$ pair were completely separated using detect mode. A near baseline separation of the heterodimer [2-MeO- $E_2\beta$ + 4-MeO- $E_2\beta$ + Li]⁺ and homodimer [(2-MeO- $E_2\beta$)₂ + Li]⁺ ions was obtained using the detect mode with $\Delta\text{CCS}\% = 1.5\%$ ($R_{\text{detect}} = 100$) and baseline separation was achieved using the ultra mode ($R_{\text{ultra}} = 160$) (see **Figure S3**).

These results demonstrate the ability of the TIMS instrument to efficiently separate compounds with $\Delta\text{CCS}\%$ smaller than 2%. It has been reported that a full distinction of steroid isomers using TWIMS (Rister et al., 2019a, 2019b; Rister and Dodds, 2019) or DTIMS (Chouinard et al., 2017a, 2017b) instruments could be achieved for alkali dimer adducts with $\Delta\text{CCS}\%$ higher than 5%. For example, (Rister et al., 2019a) showed a partial separation for the estradiol isomers, $E_2\alpha$ and $E_2\beta$, in the form of potassium dimer adducts with a $\Delta\text{CCS}\%$ estimated at 3.3% but no separation of the lithium dimer adducts. Alternatively, these authors reported full isomer separation of steroids with $\Delta\text{CCS}\% > 5\%$, with other steroid epimers, such as androsterone and epiandrosterone, being fully separated as lithium dimer adducts. A decrease in ion mobility resolving power when analyzing isomer mixtures was reported by (Rister and Dodds, 2019; Rister et al., 2019b) who suggested that this was due to the formation of heterodimers. The non-detection of certain heterodimers may reflect the limited capability of the TWIMS instrument in terms of ion mobility resolving power. Nevertheless, in our work, heterodimer species were

well resolved thanks to the high separation capacity of the TIMS analyzer which enables the study of low steroid concentrations.

3.3. Collisional Cross Sections (CCS): A robust parameter for metabolite identification and isomer characterization

Tandem mass spectrometry (MS/MS) is often employed to characterize isomers. In our study, MS/MS experiments were performed in both negative and positive ion mode to induce dissociation of the $[M - H]^-$ (see **Figure S4**) and $[M + Li]^+$ ions of the three steroid pairs (see **Figure S5**).

For each isomer pair, the fragmentation patterns were quite similar, and only a few differences in the dissociation rate constants leading to variations in the relative intensity of some product ions could be observed. Identification of a given isomer is possible but typically needs the use of an authentic standard compound to generate a reference MS/MS spectrum under specific analytical conditions. Indeed, under low energy collision-induced dissociation (CID) conditions, a lack of reproducibility is often observed in the MS/MS spectra of ions generated by an atmospheric pressure ionization (API) source using different instruments. In addition, resonant (typically used in ion trapping devices) or non-resonant CID (“in-axis CID”) produces different fragmentation patterns in hybrid spatial instrumentation and on different instrumental configurations (Ichou et al., 2014). Overall, MS/MS can be used for the identification of some isomers but generally not for their distinction in mixtures (Cui et al., 2001; Díaz-Cruz et al., 2003; Soldin and Soldin, 2009). Thus, the use of CCS values can be proposed as an alternative or complementary solution for the metabolite identification.

To evaluate the performance of the TIMS-TOF instrument in providing reliable CCS_{N_2} values, the experimental values obtained in our study were compared with those described in the literature, more precisely with the values provided by TWIMS instruments (Hernández-Mesa et al., 2018, 2019; Rister et al., 2019a). Ideally, $^{DTIMS}CCS_{N_2}$ values calculated directly from the drift time measurements are desirable (Rister et al., 2019a), but none has been reported to the best of our knowledge. CCS_{N_2} values are obtained by calculations via a calibration step when using a TIMS or TWIMS instrument. Therefore, the calibration procedure is an essential step and must be done correctly to avoid measurement errors (Hines et al., 2016). In addition, no consensus has been established on the calibrants to be used. It should be underlined that the calibration standards used by (Rister et al., 2019a), (Hernández-Mesa et al., 2018, 2019) and in our work differ, and, therefore, the CCS_{N_2} values provided by each experiment may vary. Nevertheless, the differences in CCS_{N_2} measurements between the two instrument types, TIMS and TWIMS, were investigated and expressed as $\Delta TW/TIMSCCS\%$.

(Hernández-Mesa et al., 2018, 2019) measured the CCS_{N_2} values of the $[\text{M} - \text{H}]^-$ ions of estrogens, such as $\text{E}_2\beta$, $\text{E}_2\beta\text{-3G}$ and $\text{E}_2\beta\text{-17G}$, using a TWIMS instrument. A difference of $\Delta^{\text{TW/TIMS}}\text{CCS}\% = 0.7\%$ was obtained for the two estradiol glucuronide isomers ($\text{E}_2\beta\text{-3G}$ and $\text{E}_2\beta\text{-17G}$) and $\Delta^{\text{TW/TIMS}}\text{CCS}\%$ of 1.1% for estradiol ($\text{E}_2\beta$) from the results obtained in our study. From the work of (Rister et al., 2019a) who measured the $\text{TWIMS}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ values of the $[\text{M} + \text{Li}]^+$ and $[2\text{M} + \text{Li}]^+$ species of the estradiol epimers, $\text{E}_2\alpha$ and $\text{E}_2\beta$, we calculated the differences in CCS_{N_2} values between their measurements and ours, and found $\Delta^{\text{TW/TIMS}}\text{CCS}\%(\text{E}_2\alpha) = 0.3\%$ and $\Delta^{\text{TW/TIMS}}\text{CCS}\%(\text{E}_2\beta) = 0.6\%$ for the $[\text{M} + \text{Li}]^+$ ions, and $\Delta^{\text{TW/TIMS}}\text{CCS}\%(\text{E}_2\alpha/\text{E}_2\alpha) = 3.9\%$ and $\Delta^{\text{TW/TIMS}}\text{CCS}\%(\text{E}_2\beta/\text{E}_2\beta) = 5.0\%$ for the $[2\text{M} + \text{Li}]^+$ adducts.

The experimental CCS_{N_2} values of the monomer species obtained by the two instrument types (TIMS and TWIMS) are very similar although using different calibration procedures. At present, it is recommended that experimental CCS values are reported with a systematic error of $\pm 2\%$ in a compound identification step (Paglia and Astarita, 2017; Paglia et al., 2015) due to variations in CCS values between instruments and between laboratories. To decrease such inter-laboratory deviations it has been recently proposed that cross-laboratory databases should be created, composed of mean CCS values measured on different platforms (Hernández-Mesa et al., 2020; Zhang et al., 2018). Surprisingly, the CCS_{N_2} values calculated for the dimer species display higher discrepancies. (Rister et al., 2019a) have found large differences in the CCS values measured (about 5%) for the sodiated dimer forms between DTIMS and TWIMS instruments, and concluded that the calibration protocol is limited for dimeric species. One hypothesis assumes the presence of multiple noncovalent dimer structures and also large discrepancies in the populations of calibrant ions, which leads to greater differences in CCS measurements. To draw any further conclusions, a comparison between CCS_{N_2} values measured by different ion mobility devices should be performed for a large set of standard compounds as well as a comparison with the values provided by DTIMS.

3.4. Matrix effects on the detection of estrogens

To assign the ability of TIMS to separate isomers in complex matrices, an investigation was carried out on urine spiked with estrogens. Diluted human urine spiked with estradiol glucuronides, $\text{E}_2\beta\text{-3G}$ and $\text{E}_2\beta\text{-17G}$, was first analyzed in negative ion mode using both detect and ultra modes (see **Figure 3**). The ion mobility spectra extracted for the $[\text{M} - \text{H}]^-$ ions are reported in **Figure 3B**, showing a good ion mobility separation of the deprotonated estradiol glucuronide isomers with $\Delta\text{CCS}\% = 1.7\%$ which is similar to the separation obtained in a standard solution with $\Delta\text{CCS}\% = 1.6\%$ (see **Figure 1D**); this indicates that there are no matrix

effects on the ion mobility separation (Adams et al., 2018; Hernández-Mesa et al., 2019). IM-MS seems to be a very sensitive technique, and a well-resolved ion mobility spectrum could be obtained for low-abundance species in a complex mass spectrum (relative peak intensity of about 10%) (see **Figure 3A**), demonstrating the ability of the TIMS-TOF instrument to separate isomers even in complex matrices (see **Figure 3B**).

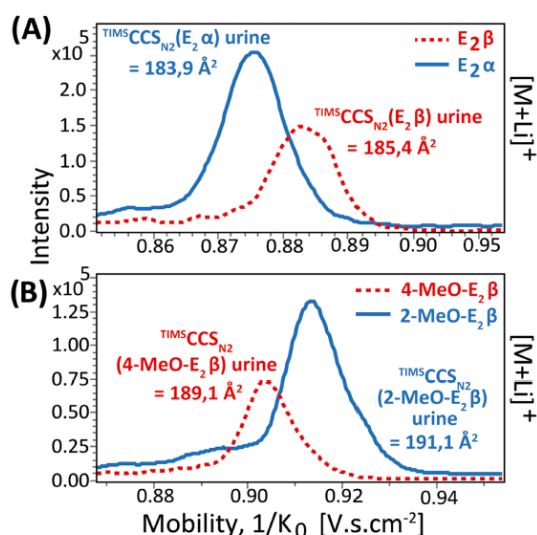


Figure 3. A) Negative ESI mass spectrum of human urine diluted by 200-fold in H₂O/MeOH (50:50, v/v) and spiked with E₂β-3G (2 pg.μL⁻¹) and E₂β-17G (5 pg.μL⁻¹). B) Ion mobility spectra extracted at m/z 447 using detect range (1/K₀ = 0.50–1.30 V.s.cm⁻²) and ultra range (1/K₀ = 1.00–1.10 V.s.cm⁻²).

Finally, the estradiols, E₂α and E₂β, and the methoxyestradiols, 2-MeO-E₂β and 4-MeO-E₂β, were also spiked separately into the urine and analyzed in positive ion mode with the addition of lithium (see **Figure 4**). For all the isomers, monomer adducts were observed but no dimer ions could be detected. The formation of dimer species is unfavorable in complex mixtures, probably due to the concentration required and also to the presence of several matrix components. In addition, several heterodimers could be generated in the mixtures of many isomers (more than two) and could therefore complicate the interpretation of the obtained results. This underlines the difficulty in characterizing compounds based on the detection of dimer species in complex matrices. Again, the ion mobility separation does not appear to be altered by such a complex environment with CCS differences similar to those obtained in the solvent (see above): ΔCCS_{urine}% = 0.8% for estradiols, E₂α and E₂β (see **Figure 4A**), and ΔCCS_{urine}% = 1.0% for methoxyestradiols, 2-MeO-E₂β and 4-MeO-E₂β (see **Figure 4B**). (Hernández-Mesa et al., 2019) as well as (Adams et al., 2018) also reported very small variations in CCS values measured in the LC/IMMS analysis of compounds in urine. Similarly,

we evaluated the shifts in $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values obtained for the estrogen standards analyzed alone and for those spiked in urine; the measured differences ($\Delta CCS\%$) varied from 0.3 to 1.0% showing the robustness of IM-MS. This suggests that CCS values can be used with high confidence for metabolite identification in metabolomic fingerprinting experiments (untargeted approach). In addition, it is worth mentioning that the ion mobility resolving power was not affected by the matrix effects.

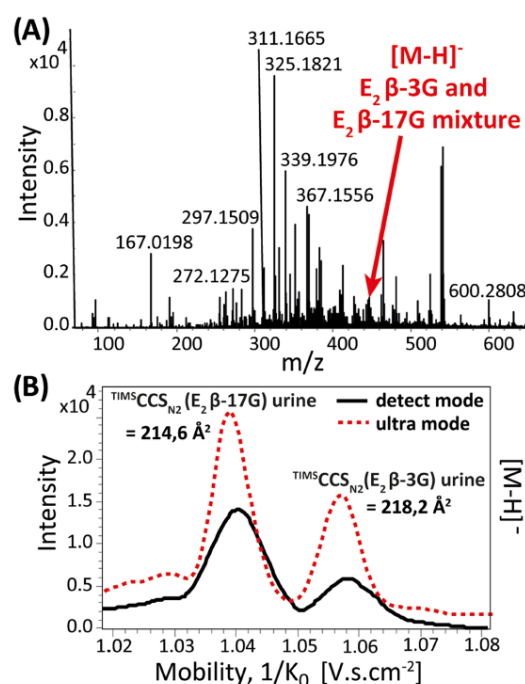


Figure 4. Ion mobility spectra extracted at A) m/z 279 for the $[M + Li]^+$ ions of $E_2\alpha$ ($0.5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) and $E_2\beta$ ($0.5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) with addition of LiCl ($10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) and B) m/z 309 for the $[M + Li]^+$ ions of 2-MeOE₂β ($0.25 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) and 4-MeO-E₂β ($0.25 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) with addition of LiCl ($5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) using detect range ($1/K_0 = 0.50\text{--}1.40 \text{ V.s.cm}^{-2}$). Ion mobility spectra were extracted from positive ESI analysis of human urine diluted 400-fold spiked with each estrogen and addition of LiCl.

4. Conclusion

This study demonstrates the potential of TIMS-TOF instrumentation to separate isomers with very close CCS values ($\Delta CCS\% \approx 2\%$). Isomers of conjugated estradiol metabolites, such as E₂β-3G and E₂β-17G, were successfully separated by IM-MS in negative ion mode. Other estrogen metabolites, such as estradiols, E₂α and E₂β, and methoxyestradiols, 2-MeO-E₂β and 4-MeO-E₂β, could also be distinguished thanks to the lithium addition which improves the mobility separation in positive ion mode. In particular, the lithiated dimers give complete isomer separation. However, dimer formation requires relatively concentrated analytes, which

is often not an ideal case in real samples; a preliminary isolation or separation step must be carried out to characterize some of them.

In addition, the experimental CCS_{N_2} values (with a relative standard deviation $<0.5\%$ for at least 3 replicate measurements) provided by the TIMS instrument are consistent with the published CCS_{N_2} values using a TWIMS instrument. Therefore, the CCS_{N_2} value can be considered as an important data feature, which can be implemented in metabolomic databases to assist in metabolite identification. However, its use to characterize isomers with CCS differences less than 1% is still limited without the use of authentic standard compounds. Complementary LC/MS and/or MS/MS data could be useful to support the structural elucidation of metabolites. Finally, the ion mobility separation and the $^{\text{TIMS}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ values measured are not altered by the biological matrices. This highlights the potential of TIMS-TOF for the structural separation of isomer compounds in complex matrices in a millisecond timeframe.

Acknowledgments

The authors thank the MetaboHUB infrastructure (ANR-11-INBS-0010 grant) for the funding. They would also like to thank Professor Alain Paris of Muséum National d'Histoire Naturelle for kindly providing the standard compounds.

Supporting Information

“An emerging powerful technique for distinguishing isomers: Trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of estrogen isomers”

Aurélie Delvaux¹, Estelle Rathahao-Paris^{1,2}, Sandra Alves¹

¹ Sorbonne Université, Faculté des Sciences et de l'Ingénierie, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), F-75005 Paris, France

² Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Summary of contents

Supporting information section contains **Table S1** displaying species for m/z calibration and additional results obtained from both IM-MS analysis using other ion mobility separation parameters and complementary MS/MS experiments are reported in **Figure S1** to **S5**.

Table S1. Accurate m/z values of positive and negative sodium formate and acetate cluster ions used for m/z calibration

Figure S1. IM-MS analysis of the estradiol glucuronide isomers under negative ESI using Detect mode.

Figure S2. IM-MS analysis of the estradiol isomers at varying concentration under positive ESI with addition of LiCl using Detect mode.

Figure S3. IM-MS analysis of the methoxy-estradiol isomers under positive ESI with addition of LiCl using Ultra mode.

Figure S4. MS/MS spectra of $[M-H]^-$ ions of A) $E_2\alpha$ and $E_2\beta$ ($0.2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 48 eV, B) of 2MeO- $E_2\beta$ and 4MeO- $E_2\beta$ ($0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 25 eV, and C) of $E_2\beta$ -3G and $E_2\beta$ -17G ($0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 30 eV.

Figure S5. MS/MS spectra of $[M+Li]^+$ ions of A) $E_2\alpha$ and $E_2\beta$ ($0.2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) with LiCl ($2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 28 eV B) 2MeO- $E_2\beta$ and 4MeO- $E_2\beta$ ($0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) with LiCl ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 30 eV C) $E_2\beta$ -3G and $E_2\beta$ -17G ($0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) with LiCl ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 30 eV.

Table S1. Accurate m/z values of positive and negative sodium formate ($Fo = HCOO$) and acetate ($Ac = CH_3COO$) cluster ions used for m/z calibration. List provided by the manufacturer.

Positive cluster ions					
n	$Na(Fo)_n$	$Na(AcNa)_n$	$Na(NaAc)_1(NaFo)_n$	$Na(NaAc)_2(NaFo)_n$	...
1	90.976645	104.992295	172.979719	254.982793	
2	158.964069	186.995369	240.967143	322.970217	
3	226.951493	268.998443	308.954567	390.957641	
4	294.938917	351.001517	376.941991	458.945065	
5	362.926341	433.004591	444.929415	526.932489	
6	430.913765	515.007665	512.916839	594.919913	
7	498.901189	597.010739	580.904263	662.907337	
8	566.888613	679.013813		730.894761	
9				798.882185	
10				866.869609	
11				934.857033	
Negative cluster ions					
n	$Fo(Fo)_n$	$Ac(NaAc)_n$	$Ac(NaFo)_n$	$Ac(NaAc)_1(NaFo)_n$	...
1	112.985627	141.016927	127.001277	209.004351	
2	180.973051	223.020001	194.988701	276.991775	
3	248.960475	305.023075	262.976125	344.979199	
4	316.947899	387.026149	330.963549	412.966623	
5	384.935323	469.029223	398.950973	480.954047	
6	452.922747	551.032297	466.938397	548.941471	
7	520.91017	633.035371	534.925821	616.928895	
8	588.897594	715.038445	602.913244	684.916319	
9	656.885018	797.041519	670.900668	752.903742	
10	724.872442	879.044593	738.888092	820.891166	
11	792.859866		806.875516	888.878590	
12	860.84729		874.862940	956.866014	
13	928.834714		942.850364		
14	996.822138		1010.837788		

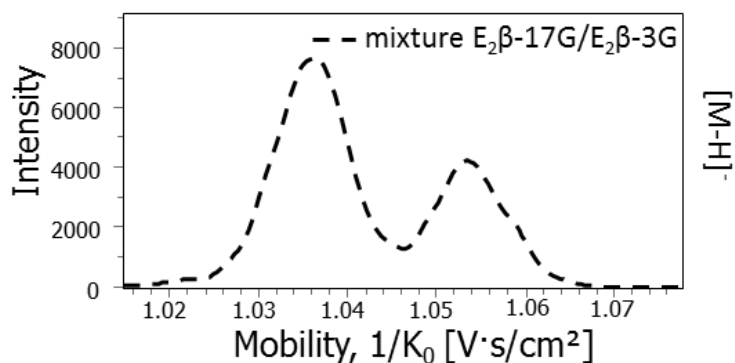


Figure S1. IM-MS analysis of the mixture of the estradiol glucuronide isomers, $E_2\beta$ -3G ($45 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) and $E_2\beta$ -17G ($10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), under negative ESI. Ion mobility spectrum extracted at m/z 447 for the $[M-H]^-$ ions using Detect range $1/K_0 = 0,50\text{-}1,30 \text{ V} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$.

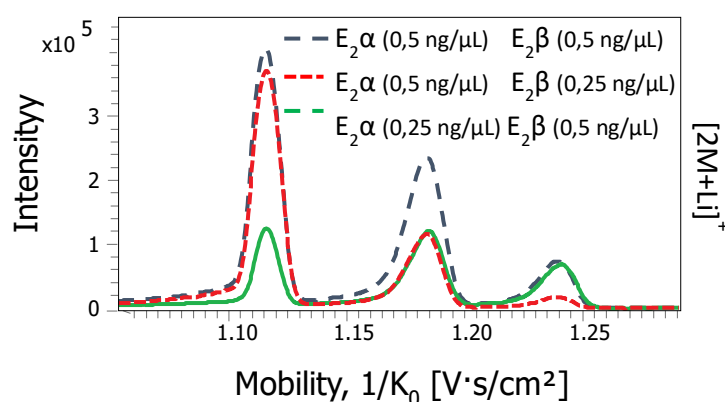


Figure S2. IM-MS analysis of the mixture of the estradiol isomers, $E_2\alpha$ and $E_2\beta$, at different concentrations under positive ESI with addition of LiCl ($5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Ion mobility spectrum extracted at m/z 551 for the $[2M+Li]^+$ adducts using Detect range $1/K_0 = 0,80\text{-}1,30 \text{ V} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$.

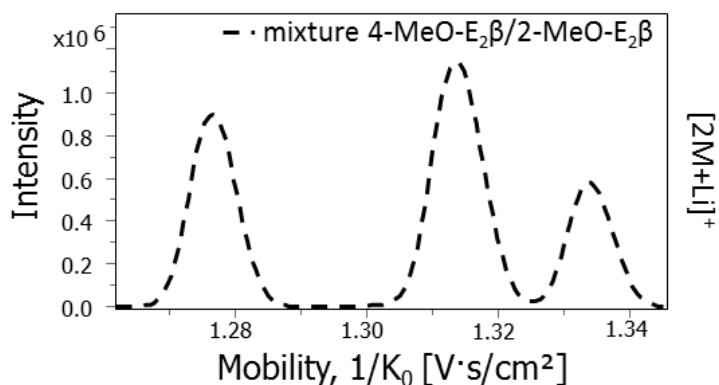
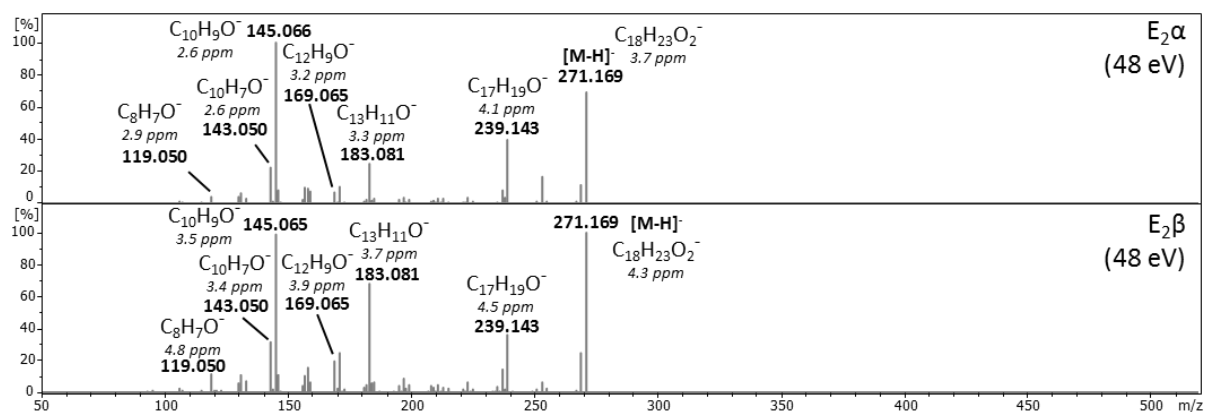
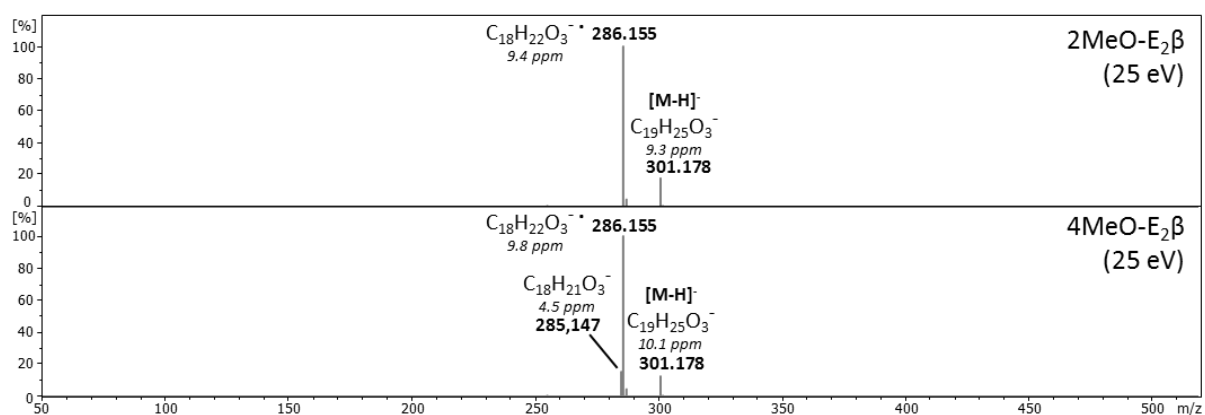


Figure S3. IM-MS analysis of the methoxyestradiol isomers, 2-MeO- $E_2\beta$ ($0,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) and 4-MeO- $E_2\beta$ ($0,25 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), under positive ESI with addition of LiCl ($5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Ion mobility spectrum extracted at m/z 611 for the $[2M+Li]^+$ adducts using Ultra range $1/K_0 = 1,24\text{-}1,36 \text{ V} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$.

A)



B)



C)

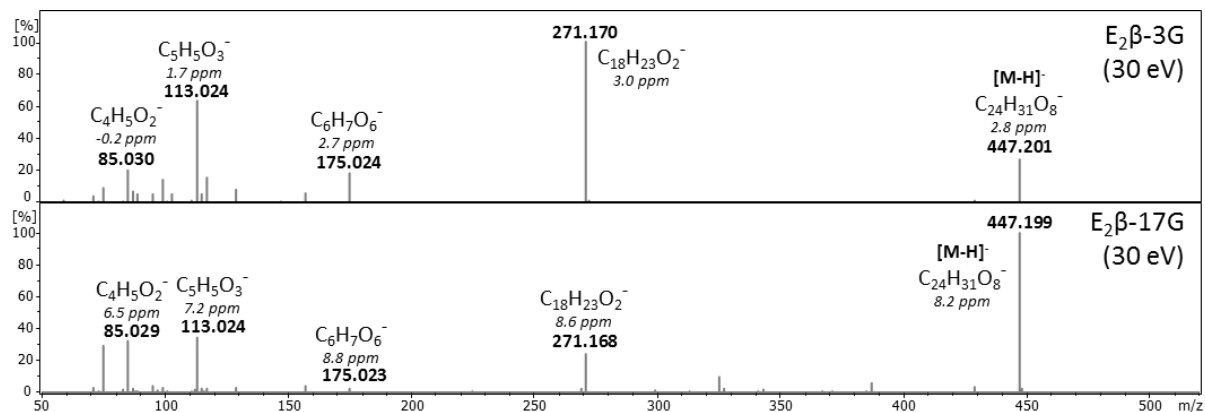


Figure S4. MS/MS spectra of $[M-H]^-$ ions of A) $E_2\alpha$ and $E_2\beta$ ($0.2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 48 eV, B) 2MeO- $E_2\beta$ and 4MeO- $E_2\beta$ ($0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 25 eV, and C) $E_2\beta$ -3G and $E_2\beta$ -17G ($0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 30 eV. Nitrogen was used as the collision gas.

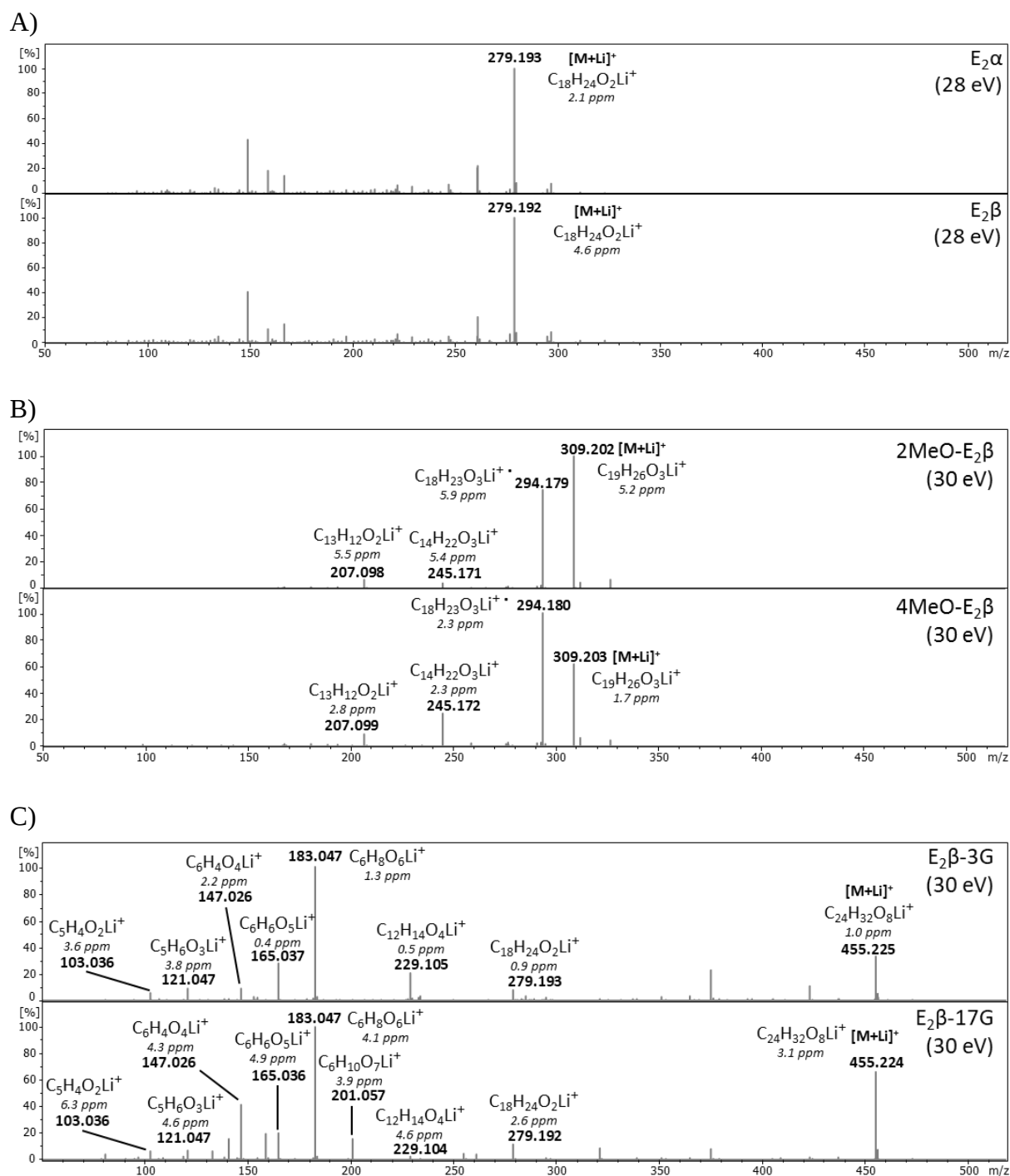


Figure S5. MS/MS spectra of $[M+Li]^+$ ions of A) $E_2\alpha$ and $E_2\beta$ ($0.2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) with LiCl ($2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 28 eV, B) 2MeO- $E_2\beta$ and 4MeO- $E_2\beta$ ($0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) with LiCl ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 30 eV, and C) $E_2\beta$ -3G and $E_2\beta$ -17G ($0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) with LiCl ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) at 30 eV. Nitrogen was used as the collision gas.

The MS/MS spectra of estrogens show small fragmentation pattern differences between isomers (**Figures S4 and S5**). Main differences are related to variations in the dissociation rate constants resulting in differences in the relative intensities of product ions. Most estrogen precursor ions display different stabilities. For example, $[M-H]^-$ ions of $E_2\beta$ and $E_2\beta$ -17G appear more stable than their respective isomer $E_2\alpha$ and $E_2\beta$ -3G, which seem to have higher dissociation rate. Rarely, diagnostic product ions are detected for a given isomer, for example, the m/z 285 ions are only observed in the MS/MS spectrum of the deprotonated $[M-H]^-$ 4MeO- $E_2\beta$ with low abundance.

Dans cette étude, nous avons pu montrer la distinction de différents types d'isomères de dérivés estradiols grâce à l'utilisation du TIMS-TOF. La séparation des composés ayant de très faibles différences en CCS a été réalisée par l'utilisation du mode ultra de l'instrument qui peut être qualifié de mode d'analyse ciblée. Il permet, en effet, d'augmenter la résolution de valeurs moyennes d'environ 50-80 en mode d'analyse globale (mode detect du TIMS-TOF) à des valeurs de pouvoir résolutifs de 120-180, en mode ultra. Des améliorations analytiques ont, également, été explorées telles que la formation d'adduits lithium et/ou de dimères non covalents. Ces conditions ont, notamment, permis la séparation des épimères $E_2\beta$ et $E_2\alpha$. La robustesse dans la mesure des valeurs de $^{TIMS}CCS_{N_2}$ a aussi été démontrée, avec des mesures répétées présentant des valeurs de RSD largement inférieures à 2% (tolérance généralement appliquée). Les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ expérimentales de notre étude sont également cohérentes avec celles fournies par des instruments de type TWIMS pour les espèces monomériques, néanmoins elles présentent des écarts plus importants pour des valeurs correspondant aux dimères. Ces observations expérimentales avaient également été faites dans les travaux de (Rister et al., 2019a) où des écarts plus élevés ont été reportés pour les formes dimériques détectées par un instrument TWIMS en les comparant aux valeurs mesurées sur un instrument DTIMS. Enfin, l'analyse de ces composés surchargés dans un échantillon d'urine humaine a montré que les mesures $^{TIMS}CCS_{N_2}$ variaient peu (RSD<1%) dans une matrice biologique, ce qui ouvre la voie à l'utilisation des valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ comme critère d'identification pour la caractérisation des métabolites présents dans des mélanges complexes et encourage ainsi à la création d'une base de données $^{TIMS}CCS_{N_2}$ (voir **chapitre III**).

Suite à ce premier travail, nous avons étudiés les oligosaccharides du lait maternel, qui constituent une autre famille de métabolites présentant une grande diversité structurale.

II-2. Analyse des HMOs dans le lait maternel

A la suite de l'étude des dérivés d'estradiols, nous nous sommes intéressés aux oligosaccharides du lait maternel (Human Milk Oligosaccharides, HMOs) qui représente une classe de composés très intéressante de par leur fonction mais également de par leur grande variété structurale. Les HMOs sont la 3^{ème} famille de composés la plus abondante dans le lait maternel après le lactose et les lipides (Plaza-Díaz et al., 2018) et ils sont de plus en plus étudiés pour leur intérêt biologique. Ce sont, en effet, des prébiotiques pour le microbiome intestinal (Bode, 2015) qui participeraient à la protection des enfants allaités face à certaines infections microbiennes et maladies et également au développement de leur système immunitaire (Quin et al., 2020; Plaza-Díaz et al., 2018). Or, ces différents bénéfices seraient liés à la composition du lait maternel et notamment à celle en HMOs. Cette dernière est très variable d'une mère à l'autre et a conduit à définir différents types de laits. Les laits maternels se classent, en effet, en plusieurs catégories selon le statut sécréteur ou non et le groupe Lewis de la mère (Kunz et al., 2017). Pour classer les différents laits maternels au sein de ces groupes, certains HMOs sont (semi-)quantifiés car ils sont surexprimés ou absents selon les échantillons considérés (voir **Tableau II-2.1**). Enfin, il est également important de caractériser les HMOs du lait maternel car la quantité de certains composés serait liée à la durée de lactation, à des caractéristiques maternelles (âge, poids, alimentation, ethnicité) mais également à certains facteurs environnementaux (lieu et saison) (Azad et al., 2018). Cependant, cette classe de molécules reste difficilement analysable car elle contient de nombreux isomères résultant de la manière dont les différents blocs monosaccharides sont branchés sur la chaîne oligosaccharide mais également de la stéréochimie des liaisons des différents blocs entre eux.

Tableau II-2.1. HMOs semi-quantifiés pour classer les échantillons de lait selon leur statut sécréteur ou non, ainsi que leur groupe de Lewis. Figure reproduite de (Kunz et al. 2017)

Name	Structure group	1	2	3	4
2'FL	Fuc α 1-2 Gal β 1-4 Glc	+	—	+	—
LDFT	Fuc α 1-2 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) Glc	+	—	+	—
LNFP I	Fuc α 1-2 Gal β 1-3 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc	+	—	+	—
LNFP II	Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc	- ¹	+	- ¹	—
LNDFH II	Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) Glc	- ¹	+	- ¹	—

Group 1: Lewis (a-b+), secretor.

Group 2: Lewis (a+b-), nonsecretor.

Group 3: Lewis (a-b-), secretor.

Group 4: Lewis (a-b-), nonsecretor.

2'FL = 2'-fucosyllactose; LDFT = difucosyllactose; LNDFH = lacto-N-difucohexaose; LNFP = lacto-N-fucopentaose.

-¹ traces may be present.

Afin d'évaluer la possibilité de caractériser le lait maternel par le couplage de la mobilité ionique et de la spectrométrie de masse (IM-MS), nous nous sommes d'abord intéressés à quatre couples d'isomères : le lacto-N-tetraose (LNT) et le lacto-N-neotetraose (LNnT), le lacto-N-fucopentaose I et V (LNFP I et LNFP V), le 2' fucosyllactose (2'FL) et le 3-fucosyllactose (3FL) ainsi que le 3'-sialyllactose (3'SL) et le 6'-sialyllactose (6'SL). Ces composés, ont été choisis car ils font partis des HMOs principalement trouvés dans les laits maternels, par exemple le 2'FL est utilisé pour déterminer le caractère sécréteur d'un échantillon (Azad et al., 2018; Kunz et al., 2017) mais également de par leurs structures chimiques. En effet, deux des quatre couples présentent une isomérisation de type positionnel, le fucose est positionné à différents endroits de la chaîne oligosaccharide (LNFP I/LNFP V et 2'FL/3FL) tandis que les deux autres ont des blocs liés différemment à la chaîne principale (LNT/LNnT et 3'SL/6'SL). Nous avons étudié ces composés par une approche IM-MS selon deux modes de détection de l'instrument TIMS-TOF : une détection dite de type globale permettant d'analyser l'ensemble des HMOs sur une large gamme de mobilités et une de type ciblée sur un composé d'intérêt permettant d'atteindre des résolutions plus élevées et donc des séparations en mobilité accrues (voir description du TIMS-TOF en **Annexe 1**). Nous avons, également, évalué l'impact de la réduction des HMOs sur la séparation en mobilité. Enfin, nous avons appliqué nos méthodes à l'analyse d'un échantillon de lait pour la séparation de nos composés d'intérêt par IM-MS mais également par IM-MS/MS. Ce dernier mode permet de mener des expériences de fragmentation après séparation en mobilité dans la cellule TIMS (voir **Annexe 1**) dans un double objectif : en premier lieu, pour l'acquisition simultanée de deux données spectrales orthogonales, les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ et les voies de fragmentation et dans un deuxième lieu, le cas échéant, pour identifier un isomère vis à vis de l'(des) autre(s) isomères si la séparation en mobilité est insuffisante via la détection d'ions diagnostiques ou des variations des intensités des ions fragments détectés.

Ces travaux sont présentés dans la section II-2A de ce chapitre et ont fait l'objet d'un article, actuellement en resoumission après révision auprès du journal **Analytica Chimica Acta**, intitulé « *Trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for high throughput and high resolution characterization of human milk oligosaccharide isomers* ».

A la suite de ce travail préliminaire, nous avons voulu étendre notre méthode à un plus grand nombre de HMOs afin de caractériser au mieux le lait maternel. Pour cette étude, nous nous sommes basés sur les travaux de (Azad et al., 2018) qui ont démontré que malgré des compositions en HMOs très variables selon les échantillons, les laits maternels sont constitués à 90% en quantités de 19 HMOs. Tous les HMOs commercialement disponibles parmi ces 19 HMOs ont donc été acquis soit 2'FL/3FL, LNnT/LNT, 3'SL/6'SL, LNFP I/LNFP II, LS-tetrasaccharide b et c (LSTb/LSTc), lacto-N-hexaose (LNH) et difucosyllacto-N-hexaose (DFLNH). Le lactodifucotetraose (LDFT) et le lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II) ont également été étudiés afin d'analyser l'ensemble des HMOs permettant d'assigner à un lait maternel son statut sécréteur ou non, ainsi que son groupe de Lewis (voir **Tableau II-2.1**). Enfin, le LSTa, le LNDFH I, ainsi que les isomères LNFP V et le LNFP VI ont été ajoutés à cette liste afin de constituer des familles d'isomères les plus complètes possible (voir **Figure II-2B.1**). L'ensemble de ces dix-huit HMOs a été caractérisé par une approche directe IM-MS sous forme de plusieurs espèces ioniques et l'échantillon de lait maternel a été analysé dans les mêmes conditions, en étudiant l'ensemble de ces composés *via* les analyses IM-MS et IM-MS/MS mises au point avec les composés standards. Ces travaux sont présentés dans la partie II-2B de ce chapitre.

II-2A. Etude préliminaire sur quatre couples d'isomères

Trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for high throughput and high resolution characterization of human milk oligosaccharide isomers

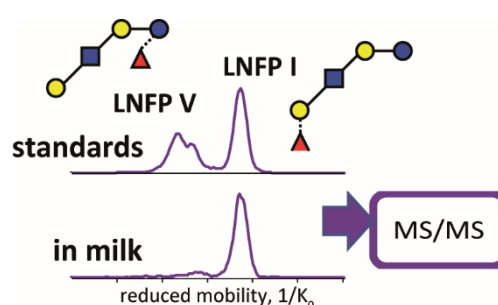
Aurélien Delvaux¹, Estelle Rathahao-Paris^{1,2}, Blanche Guillon², Sophie Cholet², Karine Adel-Patient², François Fenaille², Christophe Junot², Sandra Alves¹

¹ Sorbonne Université, Faculté des Sciences et de l'Ingénierie, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), 75005 Paris, France

² Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Abstract

The microbiome and immune system of infants are shaped by various bioactive components of human breastmilk, notably human milk oligosaccharides (HMOs). HMOs represent the third component of breastmilk and exhibit extremely high structural diversity with many isomers. Here, we propose a high throughput and high resolution approach to characterize main oligosaccharides present in breastmilk with high identification level thanks to ion mobility spectrometry. Four pairs of standard HMO isomers, that are (LNT/LNnT), (LNFP I/LNFP V), (3'-SL/6'-SL) and (2'-FL/3-FL), were first investigated under both positive and negative ionization mode using direct injection-trapped ion mobility spectrometry-time-of-flight mass spectrometry (TIMS-TOF). By examining all the ionic species formed (i.e. protonated and deprotonated ions as well as adduct species), every isomer pair could be distinguished through the separation of at least one species even with a small difference in collision cross section values (as small as 1.5%) thanks to the flexible resolution capacities of the TIMS instrument. Although multiple mobility peaks resulting from different glycan anomeric conformers, open-ring and/or different ionic isomer structures (i.e. various charge site locations), could be observed for some HMO species. Reduction at the reducing-end of HMOs did not significantly facilitate isomer distinction. Finally, the unambiguous identification of the studied HMOs in a breastmilk sample showed the potential of the approach combining ion mobility separation and MS/MS experiments for high throughput distinction of HMO isomers in complex breastmilk samples without laborious sample preparation.



Keywords

Human milk oligosaccharides, ion mobility-mass spectrometry, isomer, breastmilk

1. Introduction

Breastmilk is the primary source of nutrition of neonates and its biochemical characterization is therefore of great interest. Human milk oligosaccharides (HMOs) are the third most abundant component in breastmilk after lactose and lipids and their concentration ranges from 23 down to 5 g/L in colostrum (first milk produced after birth) and mature breastmilk, respectively (Mehra and Kelly, 2006; Plaza-Díaz et al., 2018; Zivkovic et al., 2011). HMOs are indigestible by the developing infants gut and instead target bacteria in the neonate large intestine and colon. Thus, HMOs greatly influence the microbiome composition and functions (Quin et al., 2020; Zivkovic et al., 2011). HMOs also appear to protect breastfed infants against microbial infections, acting as a decoy receptor, and to help the development of their immune system (Quin et al., 2020; Plaza-Díaz et al., 2018). All these functions show the need for in-depth HMO analysis (Amicucci et al., 2019). Nevertheless, the oligosaccharide characterization constitutes a great analytical challenge due to the large structural diversity of this compound class. The basic structure of HMOs includes a lactose core at the reducing end, elongated with at least one of five distinct building blocks: D-glucose, D-galactose, N-acetylglucosamine, L-fucose, and N-acetylneuraminic acid (sialic acid) (see **Scheme 1**). Despite a limited number of monosaccharide building blocks, their combination can yield over 100 structures for a same mother and up to 200 HMOs considering breastmilks from multiple mothers (Amicucci et al., 2019; Porfirio et al., 2020). This heterogeneity results from the composition (type of monosaccharide building blocks), the connectivity (position of the glycosidic bond, linear or branched sequence) and the configuration (stereochemistry of the glycosidic bond) of the oligosaccharides.

Various analytical tools have been employed for the characterization of oligosaccharides (Kailemia et al., 2014; Mirgorodskava et al., 2018) and in particular of HMOs (Porfirio et al., 2020; Ruhaak and Lebrilla, 2012), including Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS). MS is mostly used, especially for complex breastmilk sample analyses thanks to its high sensitivity (Amicucci et al., 2019; Kailemia et al., 2014; Mirgorodskava et al., 2018). In addition, capillary electrophoresis (CE) has also been widely employed with laser induced fluorescence (LIF) (Mantovani et al., 2018) or MS (Mechref and Novotny, 2009) as well as liquid chromatography (LC) hyphenated with MS (Kailemia et al., 2014). Reversed phase (RP), hydrophilic interaction LC (HILIC) and porous graphitic carbon (PGC) are commonly used in LC/MS analyses. Currently, PGC-MS is considered as the most efficient HMO separation platform (Kailemia et al., 2014). Tandem

mass spectrometry (MS/MS), in conjunction with (or without) LC, is also essential in structural elucidation, providing elemental composition determination and connectivity of saccharide residues and in a few cases their configuration (Porfirio et al., 2020; Kailemia et al., 2014). Additionally, semi-quantitative or quantitative analyses can be performed through multiple reaction monitoring (MRM) using LC/MS platform as proposed by (Mank et al., 2017) and (Csernák et al., 2020). Currently, more than 200 HMO structures have been characterized from breastmilk samples in term of accurate mass measurements, retention times and fragmentation patterns (Remoroza et al., 2018; Wu et al., 2010). These hyphenated methods allowed to produce HMO fingerprints and to investigate relations between infant and maternal characteristics (Azad et al., 2018; Wang et al., 2020). They, for example, enabled the mother's breastmilk classification according to the HMOs found in the breastmilk (Plaza-Díaz et al., 2018; Wang et al., 2020). These groups mainly depend on the secretor status and Lewis blood group of the mother (Kunz et al., 2017; Wang et al., 2020). Secretor mothers yield breastmilks containing $\alpha(1,2)$ -fucose HMOs, while non-secretors do not. This status can drastically affect the substrates available for microbiota, and thus gut microbiota composition of the infant. The ratio of secretors/non-secretors varies by ethnicity and geography (Amicucci et al., 2019). Even if extensive works have been carried out on glycans and more specifically in HMO analysis, some bottlenecks are still present. First, the widely used hyphenated techniques generally require relatively long analysis times (10–60 min) and extensive sample preparation. More importantly, the characterization of the HMO structures, especially the resolution of isomers in very complex mixtures remains challenging.

The ion mobility separation based on the migration of gas phase ions under the effect of a low electric field (Dodds and Baker, 2019) constitutes an attractive separation technique complementary to conventional LC/MS and CE/MS platforms to characterize complex glycan structures (Hofmann and Pagel, 2017; Morrison and Clowers, 2018; Mu et al, 2018). (Jin et al., 2019), for example, demonstrated the ability of ion mobility-mass spectrometry (IM-MS) to resolve the structural complexity of some isomeric glycans, which was not possible by LC/MS alone. Indeed, ion mobility coupled with mass spectrometry has many advantages, the main one being its ability to characterize a large range of positional isomers, conformers but also stereoisomers (Hofman et al., 2015; Wu et al., 2020). In addition, IM-MS analyses proceed in a high throughput fashion (couple of minutes). In some cases, ion mobility separation can be a way to facilitate interpretation of complex samples by revealing the presence of minor compounds from biological matrixes (Harvey et al., 2011). Moreover, ion mobility separation provides a new highly reproducible data feature to ascertain compound identification: the

collision cross section (CCS) (May et al., 2017) and in that respect, efforts were made to provide CCS databases for the glycan analyses (Fenn and McLean, 2011; Struwe et al., 2016a). A high separation capacity can also be achieved through the incorporation of an LC separation to the IM-MS instrumentation, allowing a comprehensive three-dimensional (3D) analysis (Lareau et al., 2015; Yamaguchi et al., 2012). Finally, similar to LC/MS, tandem mass spectrometry can be incorporated into the classical IM-MS platform to produce IM-MS/MS analyses, improving the structural characterization level by the acquisition of CCS and of fragmentation patterns in a single experiment (Hofman and Pagel, 2017; Jin et al., 2019; Wei et al., 2020).

Previous works demonstrated the potential of ion mobility to resolve isomeric oligosaccharides despite their small structural differences. Nevertheless, sophisticated methods are usually required, in which the ion mobility separation was combined with either chemical covalent derivation (Li et al., 2018), gas phase adduct (Fenn and McLean, 2011; Huang and Dodds, 2013, 2015; Xie et al., 2020; Zheng et al., 2017c), and/or complex ion production (Gaye et al., 2016) as well with prior tandem mass spectrometry experiments (Hofman et al., 2017; Li et al., 2013). Recent technical innovations, such as TIMS (Przybylski and Bonnet, 2021; Wei et al., 2020), Structures for Lossless Ion Manipulations (SLIM) (Nagy et al., 2018), or cyclic Travelling Wave Ion Mobility Spectrometer (cTWIMS) (Ropartz et al., 2019; Ujma et al., 2019), strongly improved carbohydrate studies, by increasing the ion mobility separation capacities.

In the present study, high throughput characterization of HMOs was investigated using high resolution trapped ion mobility spectrometry-time of flight mass spectrometry (TIMS-TOF). Few IM-MS studies focused on HMOs have been performed (Fenn and McLean, 2011; Huang and Dodds, 2013; Nagy et al., 2018; Wei et al., 2020; Zheng et al., 2017), and rarely with the objective of their direct characterization in complex matrix. We can only cite, the work of (Struwe et al., 2016b) who studied two sets of HMO isomers isolated from milks to evaluate the impact of the charge location using IM-MS experiments and *ab initio* molecular dynamics. Here, the separation of the HMO isomers was examined in both negative and positive ionization modes. Four isomer pairs of HMOs commonly found in breastmilk samples were studied: i) lacto-N-tetraose (**LNT**) and lacto-N-neotetraose (**LNnT**) (connectivity isomers: β 1,3 versus β 1,4 linkage), ii) lacto-N-fucopentaose I and V (**LNFP I** and **LNFP V**) (positional isomers: different fucose positions), iii) 2'-fucosyllactose (**2'FL**) and 3-fucosyllactose (**3FL**) (positional isomers: different fucose positions), iv) 3'-sialyllactose (**3'SL**) and 6'-sialyllactose (**6'SL**) (connectivity isomers: α 2,3 versus α 2,6 linkage). Despite the presence of multiple mobility features for some HMO species which makes difficult the identification of these isomers, all

isomer pairs could be distinguished by considering well separated HMO species in a global fingerprint. Additionally, the effects of reduction at the reducing end were examined. An overall loss of sensitivity was observed under such conditions while no major improvement in ion mobility separation or decrease in the number of mobility peaks could be obtained. Finally, the application of IM-MS eventually with MS/MS studies for the direct characterization of HMO isomers in complex matrices was evaluated. To the best of our knowledge, the present results constitute the first study reporting the direct IM-MS analysis of native HMOs in a breastmilk sample.

2. Experimental section

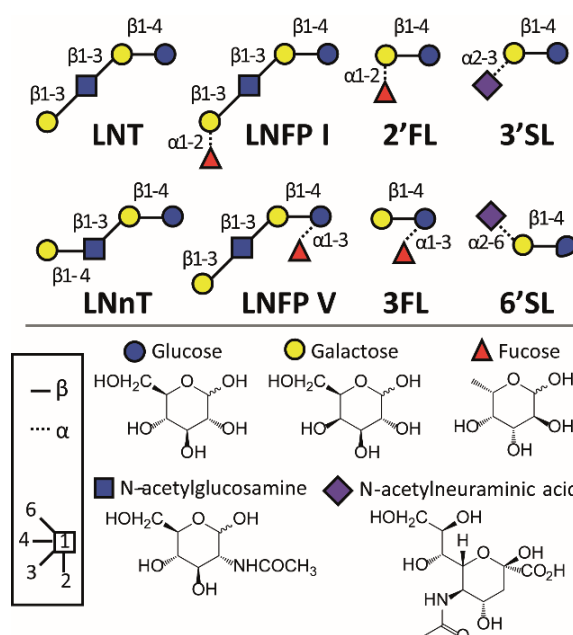
2.1. Chemicals and samples

A Select HP water purification system (Purite France eau, Lormont, France) was used to produce ultrapure water with resistivity of 18.2 M Ω .cm. Acetonitrile (ACN, UHPLC grade) was purchased from VWR Chemicals (Fontenay sous Bois, France). Lithium chloride (LiCl), glacial acetic acid, formic acid and sodium borohydride (NaBH₄) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

ESI-L low concentration tuning mix calibration solution (G1969-85000) was purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Lacto-N-tetraose (LNT), lacto-N-neotetraose (LNnT), lacto-N-fucopentaose I and V (LNFP I and LNFP V), 3'-sialyllactose (3'-SL), 6'-sialyllactose (6'-SL), 2'-fucosyllactose (2'-FL) and 3-fucosyllactose (3-FL) were acquired from Elicityl (Crolles, France) (see structures in **Scheme 1**).

Oligosaccharide standards were studied at a concentration of 0.1 ng. μ L⁻¹ or 1 ng. μ L⁻¹ in ACN/H₂O 50:50 (v/v) in negative ionization and in ACN/H₂O 50:50 (v/v) + 0.1 % formic acid or ACN/H₂O 50:50 (v/v) in positive ionization mode. Lithium chloride (LiCl) was added to enhance cationization (final LiCL concentration of 1 ng. μ L⁻¹) under positive ionization.

The mature breastmilk sample was collected from an healthy donor twelve weeks after parturition (Bernard et al., 2014) and stored at -80 °C until analysis. Then, 450 μ L of water was added to 50 μ L of breastmilk. The resulting mixture was centrifuged 30 min at 3000xg to separate lipids. The lower-phase was collected and centrifuged again for 30 min (Oursel et al., 2017). The obtained lower-phase was then diluted 500 times for a final dilution of 5000 in the appropriate solvent for IM-MS analysis.



Scheme 1. Structures of the isomer pairs of HMO studied (according to the Symbol Nomenclature for Graphical Representation of Glycans (Neelamegham et al., 2019))

2.2. Oligosaccharide reduction (Oursel et al., 2017)

10 μL of HMO standard at 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ was diluted by adding 90 μL of water. The resulting sample was then mixed with 100 μL of NaBH_4 solution (1 M in 0.1 M NaOH) and incubated for 1 h at 37 $^\circ\text{C}$. The solution was then neutralized by addition of 3 x 4 μL of glacial acetic acid and purified on a PierceTM graphite spin column (10 mg; Thermo Scientific, les Ulis, France). The reduced standards were eluted 3 times using the same 100 μL of $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (50:50, v/v) solution, and 1 time with an additional 100 μL of $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (50:50, v/v), thus leading to a final volume of 200 μL . Each reduced standard was further diluted for optimal MS analysis.

2.3. Ion mobility spectrometry – mass spectrometry

All IM-MS experiments were conducted on a trapped ion mobility spectrometer – quadrupole – time of flight (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using electrospray ionization (ESI) and direct infusion at a flow rate of 3 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. All experimental parameters from the ESI source to the ion mobility cell and mass spectrometer detection were optimized to ensure an optimal response of the studied HMO isomers. Nitrogen was used both as spray and drift gas. The dry gas, capillary temperature and nebulizer gas of the ion source were set at 3.0 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 250 $^\circ\text{C}$ and 0.3 bar, respectively. The end plate offset was maintained at 500 V and the electrospray voltage at – 4500 V and + 3500 V in positive and negative ionization, respectively. For the TIMS analyzer, the Funnel 1 RF, Funnel 2 RF and deflection delta were fixed at 250 Vpp, 250 Vpp and +/- 80 V, respectively. The experiments were acquired in the 100 - 1350 m/z range

using variable mobility ranges (see below). All parameters were controlled through the oTof control software (Bruker Daltonics).

^{TIMS}CCS_{N2} values were determined from the reduced mobilities, K_0 , measured, through a calibration step. Thus, an external calibration for m/z values (in quadratic mode) and reduced mobilities (in linear mode) was carried out before each experiment series using the ESI-L low concentration tuning mix solution. The calibrant ions are detected in positive ionization at m/z 322.0481 ($C_6H_{19}N_3O_6P_3^+$), m/z 622.0289 ($C_{12}H_{19}F_{12}N_3O_6P_3^+$), m/z 922.0098 ($C_{18}H_{19}F_{24}N_3O_6P_3^+$) and m/z 1221.9906 ($C_{24}H_{19}F_{36}N_3O_6P_3^+$) with $1/K_0$ values of 0.736, 0.991, 1.199 and 1.393 V.s.cm⁻², respectively. For the negative ionization, the calibrant ions are observed at m/z 301.9981 ($C_6H_9F_9N_3O_1^-$), m/z 601.9790 ($C_{12}H_9F_{21}N_3O_1^-$), m/z 1033.9881 ($C_{20}H_{18}F_{27}N_3O_8P_3^-$) and m/z 1333.9689 ($C_{26}H_{18}F_{39}N_3O_8P_3^-$) with $1/K_0$ of 0.669, 0.882, 1.258 and 1.407 V.s.cm⁻², respectively.

The repeatability and robustness of the ion mobility measurements were assessed. All the experiments were repeated on at least 3 different days and the average ^{TIMS}CCS_{N2} values are reported with a maximum relative standard deviation (RSD) of 0.5 % and an average RSD value of 0.2%, for both ion source polarities. In addition, the ^{TIMS}CCS_{N2} measurements are not impacted by compound concentrations. All experiments were conducted for HMO standard concentrations of 0.1 ng.μL⁻¹ and 1 ng.μL⁻¹ but some HMO analyses were also performed at 0.01 ng.μL⁻¹ without variations of the ^{TIMS}CCS_{N2} measurements.

The mobility separation resolving power of the TIMS analyzer (see **Equation 1**) can be changed by modifying the scanning rate on a defined mobility range (Ridgeway et al., 2018). In our study, two types of IM-MS analysis were conducted: i) the first one could be qualified as a “global sample fingerprinting” where inverse reduced mobilities ($1/K_0$) were collected into a range of mobilities of 0.55 – 1.90 V.s.cm⁻² and a scanning rate of 9.52 Hz, resulting in mobility resolving powers ranging from 50 to 80 (depending on the studied HMO) and ii) the second type was referred to “targeted analyses” centered on specific m/z values with narrow mobility detection ranges (widths typically range from 0.10 to 0.32 V.s.cm⁻²) for a scanning rates from 2 to 5 Hz and resolving powers from 120 to 180. The first global mode is a custom mode where the mobility range as well as the scanning rate were manually optimized to cover a m/z range of 100-1350 (corresponding to CCS range from 100 to 450 Å² considering singly-charged ions).

$$R = \frac{K_0}{\Delta K_0} = \frac{CCS}{\Delta CCS} \quad (1)$$

The generated data were manually treated using Data Analysis 5.2 (Bruker Daltonics). All ion mobility spectra reported in this work were extracted from a fixed m/z (mass to charge ratios) of the ionic specie considered. To evaluate the ion mobility separation efficiency, the difference in CCS values, $\Delta\text{CCS}\%$ (see **Equation 2**), was considered as the best criterion to estimate the ion mobility separation capacity. Indeed, the commonly used resolving power was shown to underestimate the real separation capability of some ion mobility instrumentation (e.g. TWIMS) (Dodds et al., 2017).

$$\Delta\text{CCS}\% = \frac{\text{CCS}_B - \text{CCS}_A}{\text{average CCS}_{B,A}} \times 100 \quad (2)$$

3. Results and discussion

IM-MS analysis of four HMO isomer pairs (see **Scheme 1**), as native or reduced forms, in a standard mixture or in breastmilk matrix, was conducted using both negative and positive ionization modes to investigate the analytical conditions for optimal isomer separation (see **experimental section**). In negative ionization mode, deprotonated species, $[\text{M}-\text{H}]^-$, are mainly produced as well as adduct anions, $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ and $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$. For positive ionization conditions, mass spectra display more or less abundant protonated molecules, $[\text{M}+\text{H}]^+$, as well as abundant doubly-charged calcium adducts, $[\text{M}+\text{Ca}]^{2+}$ and weak sodium adduct peaks, $[\text{M}+\text{Na}]^+$. The addition of lithium salt was tested to promote the production of adduct ions under positive ESI conditions. Indeed, adduct ions have been reported to enhance mobility separation for various small size isomer compounds (Delvaux et al., 2020a; Rister et al., 2019a; Zietek et al., 2018) but also for glycans (Fenn and McLean, 2011; Huang and Dodds, 2013, 2015; Xie et al., 2020; Zheng et al., 2017c). Here, singly-charged, $[\text{M}+\text{Li}]^+$, and doubly charged adducts, $[\text{M}+2\text{Li}]^{2+}$, were detected for some compounds. With the lithium addition, the peak intensities of the $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ions were overall enhanced because the $[\text{M}+\text{H}]^+$ forms were disfavored resulting in a strong decrease in their intensity.

3.1. IM-MS analysis of native HMOs

The mobility response and separation of all species formed for each native HMO standard were first investigated. A global sample fingerprinting was acquired using large mobility range detection ($1/K_0 = 0.55\text{-}1.90 \text{ V.s.cm}^{-2}$, as global fingerprints) with limited mobility resolving power. More accurate analyses in term of resolution were then conducted by scanning narrow mobility ranges (as targeted analysis, see **experimental section**).

Table 1. Δ CCS% values of all ionic species detected for the isomer pairs. The table shows a heat map, based on the IM-MS separation of each isomer pair mixture depending on the IM-MS conditions applied: the global fingerprinting (in bold) versus the targeted (in bracket) modes.

Ion species	LNT/LNnT	LNFP I/LNFP V	2'FL/3FL	3'SL/6'SL
[M-H] ⁻	5.8% ^{(a) (c)} (6.1%-7.1%)	5.3% ^{(a) (c)} (5.3%)	1.1% ^{(a) (d)} (1.0%)	1.0% ^(e) (0.1% - 2.1%)
[M+Cl] ⁻	2.0% (1.7%)	1.7% ^{(a) (c)} (1.7%)	1.7% ^(a) (1.8% - 3.7%)	n.d.
[M+HCOO] ⁻	1.5% (1.1% - 2.6%)	4.5% ^(a) (2.5%-4.5%)	1.1% (1.1% - 3.0%)	n.d.
[M+H] ⁺	3.9% (3.9% - 4.9%)	5.2% (2.3% - 5.3%)	n.d.	3.8% ^{(a) (d)} (3.8%)
[M+Ca] ²⁺	3.8% ^{(b) (d) (e)} (3.8%)	1.8% (0.5% - 2.0%)	6.1% ^{(a) (d) (e)} (4.9% - 6.8%)	3.7% ^{(b) (e)} (3.7%)
[M+Na] ⁺	0.9% ^(b) (0.6% - 1.2%)	1.4% ^(a) (1.4% - 2.6%)	1.6% ^(a) (1.8%)	1.2% (1.2%)
[M+Li] ⁺ (f)	1.3% ^(a) (0.4% - 3.0%)	0.3% ^(a) (0.1% - 2.3%)	2.6% (2.3%-2.8%)	2.5% (0.2% - 2.7 %)
[M+2Li] ²⁺ (f)	2.5% (2.6%)	5.5% (5.4% - 6.3%)	n.d.	n.d.

	separation using fingerprinting mode
	isomer distinction in fingerprinting mode and separation in targeted mode
	separation only in targeted mode
	no mobility separation

n.d.: not detected

Note that Δ CCS% values are reported for the major peaks when multiple peaks are detected for one HMO species (labelled as (a)), with few exceptions (labelled as (b)) when the largest mobility difference was obtained from minor mobility signals. In bracket Δ CCS% values recorded in narrow mobility range detection (targeted analysis) are reported with calculated minimum and maximum Δ CCS% values when multiple mobility peaks appear under targeted analysis.

- (a) Δ CCS% values between two major mobility peaks in the presence of multiple peaks for one or both isomer ions.
- (b) Δ CCS% values between a major peak and a non-major peak, i.e. mobility peaks at 86%, 46% and 79% of relative intensity are considered for the [M+HCOO]⁻ species from LNFP V, for the [M+Ca]²⁺ adducts from LNnT and the [M+Na]⁺ from LNT, respectively.
- (c) Separation between two major peaks of each isomer but with overlap of a minor peak for an HMO isomer.
- (d) A very high MS response of an isomer (2'FL for [M-H]⁻, 6'SL for [M+H]⁺, LNT and 3FL for [M+Ca]²⁺) hinders detection of its respective isomer (3FL for [M-H]⁻, 3'SL for [M+H]⁺, LNnT and 2'FL for [M+Ca]²⁺) in a mixture.
- (e) The detection of a single peak reflects the presence of LNT, 3FL or 3'SL for the calcium adducts while the observation of two peaks (or more) is characteristic of the presence of LNnT, 2FL or 6'SL and does not allow to confirm the presence or not of their respective isomers, LNT, 3FL or 3'SL.
- (f) The [M+Li]⁺ and [M+2Li]²⁺ adducts are formed by addition of lithium.

Experimental $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values obtained from both source polarities are reported in **Tables S1** and **S2**. To investigate more deeply the ability of the TIMS device to resolve HMO isomers, all pairs of isomers were analyzed as binary mixtures (see **Figures S1** and **S2**). The $\Delta CCS\%$ values obtained from the analyses of all the ionic species of the four isomer pairs are reported in **Table 1** and represented as a heat map according to the experimental ion mobility spectra acquired for the isomer pair mixture. The baseline separation of compounds with $\Delta CCS\% > 3.5\%$ is easily obtained using the large mobility range conditions (i.e. global fingerprint) and the separation of isomers with $\Delta CCS\% > 1.5\%$ is achievable only by using the targeted mode with enhanced resolution.

For the global fingerprint, contrasted results are observed depending on the studied isomer pair and on the ionic species considered (see **Figures S1** and **S2**). With resolving powers of about 50-80, baseline separation is only achieved for few species demonstrating the difficulty of characterizing such structurally-closed compounds. The **Figure 1** shows the best isomer separation for each HMO pair in positive and negative ESI mode. Overall, the distinction between **LNT** and **LNnT** isomers is obtained for the $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ (see **Figure 1**) and $[M+2Li]^{2+}$ forms (see **Figure S1**), a partial separation is also observed for the $[M+Cl]^-$ adducts (see **Figure S2**). Similarly, the **LNFP I** and **LNFP V** isomers can be well-separated as $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ (see **Figure 1**), $[M+2Li]^{2+}$ and also $[M+HCOO]^-$ ions, whereas a partial separation is obtained for the $[M+Ca]^{2+}$ and $[M+Cl]^-$ adducts (see **Figures S1** and **S2**). However, both **3'SL/6'SL** and **2'FL/3FL** pairs cannot be separated efficiently, with only partial mobility separation achieved for singly charged lithium adducts (see **Figure 1**).

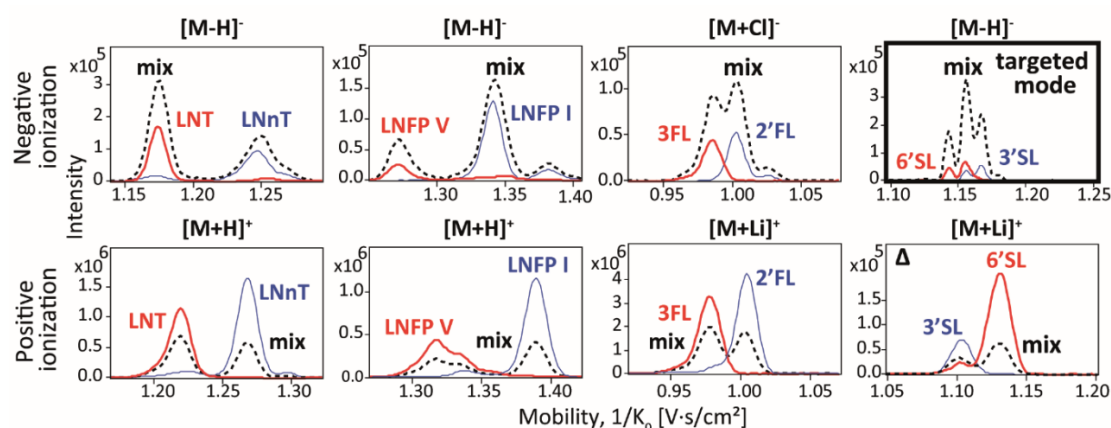


Figure 1. Extracted ion mobility spectra of different HMO isomer species, corresponding to the best isomer mobility separation under both positive and negative ESI modes using large mobility range detection, excepted for the deprotonated ions of **3'SL/6'SL** pair for which a targeted mode is applied for their separation. All HMOs were injected alone (plain plots) or in binary mixtures (dashed plots) with a final concentration of $1 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$.

Targeted analyses using narrow mobility range detection were also conducted (see **experimental section**). These experiments allowed improving the ion mobility separation with resolving powers of about 120-180, for all ionic forms of the HMO studied. Mobility responses for all **LNT/LNnT** ionic species with targeted analyses are shown in **Figure 2**. This isomer pair was particularly investigated because it is not easily separated by conventional liquid chromatography (Oursel et al., 2017; Remozora et al., 2018; Wu et al., 2010) and constitutes interesting positional isomers (Struwe et al., 2016b). Under high resolution mobility conditions, **LNT** and **LNnT** isomers are well-separated as $[M+H]^+$, $[M+2Li]^{2+}$, $[M-H]^-$ and $[M-Cl]^-$ species (see **Figure 2**). A good separation is also obtained as $[M+HCOO]^-$ ions whereas only partial separation is observed for the $[M+Li]^+$ ions. However, the sodium adducts could not be separated and the calcium ions did not allow to reach an unambiguous identification (see **Table 1**).

For the **LNFP I/LNFP V** pair, all adduct forms detected could be separated using targeted analysis and the largest differences in mobility were obtained for the $[M+H]^+$, $[M+2Li]^{2+}$ and $[M-H]^-$ species (see **Table 1**, and their extracted ion mobility spectra in **Figures S1** and **S2**). Importantly, better separation was obtained under high resolution mobility conditions for **2'FL/3FL** and **3'SL/6'SL** pairs. The distinction of **2'FL/3FL** isomers can be obtained by the baseline mobility separation of the $[M+Li]^+$ and $[M-Cl]^-$ ions as well as by the partial separation for the $[M+Na]^+$ and $[M+HCOO]^-$ adducts (see **Table 1**). In the same fashion, the **3'SL/6'SL** isomers could be separated as $[M+Li]^+$ and $[M-H]^-$ species (see **Figure 1** and **Table 1**) and a partial separation for $[M+Na]^+$ adducts was observed (see **Figure S1**).

These results are in accordance with previous results (Struwe et al., 2016b; Zheng et al., 2017c), *i.e.*, better mobility separation of **LNT/LNnT** isomers as $[M-H]^-$ species is observed compared to sodiated and/or protonated forms. In our study, the $\Delta CCS\%$ value between **LNT** and **LNnT** isomers is higher for $[M-H]^-$ ions ($\Delta CCS\%$ of 5.8 %) than for $[M+H]^+$ ions ($\Delta CCS\%$ of 3.9 % see **Table 1**). Nevertheless, the $\Delta CCS\%$ values are comparable for $[M-H]^-$ and $[M+H]^+$ ions of the **LNFP I/LNFP V** couple, with 5.3 % and 5.2 %, respectively (see **Table 1**). No conclusions can be drawn for the **2'FL/3FL** and **3'SL/6'SL** pairs due to the low abundance peak of **3'SL** protonated ions and the absence of signals detected for the protonated **2'FL** and **3FL**. In addition, a good accordance with $^{DTIMS}CCS_{N_2}$ values found in the literature (May et al., 2014; Zheng et al., 2017a) were obtained with CCS shifts below 1% (see **Table S4**) ; demonstrating that CCS represents a promising compound identification criterion (Paglia and Astarita, 2017).

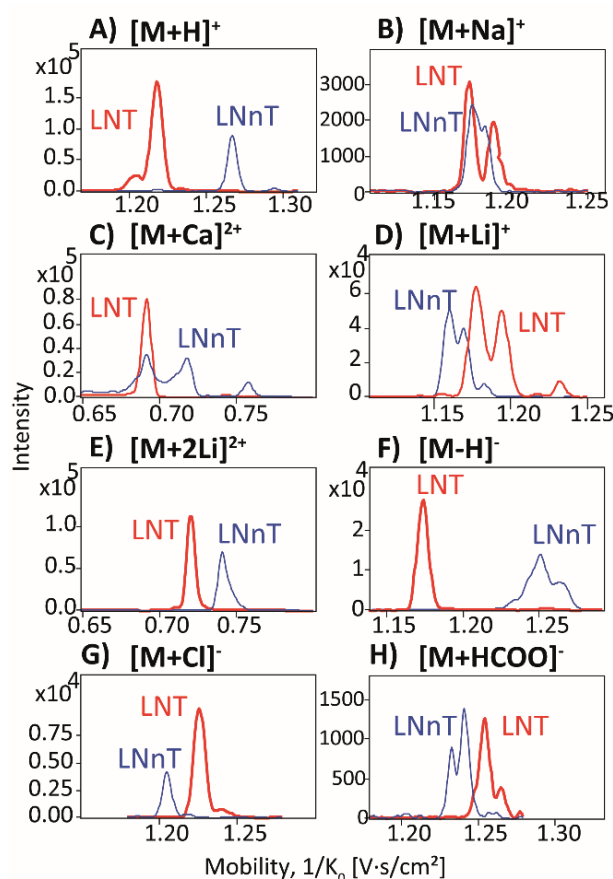


Figure 2. Extracted ion mobility spectra of all LNT and LNnT detected ions under both positive and negative ESI modes, using narrow mobility range detection mode (high resolution conditions). Each HMOS were injected at a concentration of $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. In D) and E), results were obtained for positive ESI mode after addition of lithium at $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Mobility ranges used for each targeted analysis can be found in Figures S1 and S2.

No real improvement in mobility separation is obtained by performing metal adduction, in contradiction with previous studies (Fenn and McLean, 2011; Huang and Dodds, 2013, 2015; Xie et al., 2020; Zheng et al., 2017c). Addition of lithium do not allow better ion mobility separation of corresponding adducts. Although isomer separation can only be achieved with this ionic form for the 2'FL/3FL and 3'SL/6'SL pairs ($\Delta\text{CCS\%}$ of 2.6% and 2.5%, respectively, see **Table 1**). The $\Delta\text{CCS\%}$ values are more significant for the $[\text{M}+\text{Ca}]^{2+}$ species. Nevertheless, the adduct ion formation constitutes an alternative analytical solution, especially for the HMOs which give poor signals as protonated or deprotonated species as, for example, for the 2'FL/3FL isomer pair.

Figures 1 and 2 highlighted a critical issue for IM-MS analysis of HMOs. Multiple mobility peaks are often encountered for detected species, especially under high resolution TIMS conditions. A similar phenomenon has been described by other groups also using high resolution instrumentations (Nagy et al., 2018; Prybylski and Bonnet, 2021; Ujma et al., 2019).

(Ujma et al., 2019) assigned these multiple peaks to two major anomeric forms (α and β forms) and a minor open-ring form using a heavy oxygen labelling strategy with a cyclic TWIMS in ion mobility/ion mobility mode. Most adduct ions formed in positive ESI mode were detected as multiple peaks for at least one isomer (see **Figure S1** or the example of **LNT/LNnT** species in **Figure 2**). Such observations, previously reported (Nagy et al., 2018; Prybylski and Bonnet, 2021; Ujma et al., 2019), could be explained by variable metal coordination within various glycan conformations, resulting in mobility differences between the different forms. These different forms and conformations can be resolved thanks to high resolution TIMS instrument, resulting in the detection of multiple peaks. However, their presence complicates the HMO isomer characterization and in some cases, prevents the unambiguous isomer distinction (independently on the use of large or narrow mobility ranges).

The deprotonated ions of **2'FL/3FL** are, for example, characterized by at least three features (or CCS values) using the large mobility range while the application of targeted mode resulted in the detection of even more peaks (see **Table S2**). In this latter case, isomer identification cannot be reached due to the presence of several mobility peaks, some of them being overlapped. Otherwise, most of the deprotonated ions from the **LNT/LNnT** and **LNFP I/LNFP V** sets are characterized by two mobility peaks with a major and a minor one (see **Table S2** and **Figure 1**). The minor peak of **LNnT** displays a mobility very close to that of the peak of **LNT** and similarly the minor peak of **LNFP V** cannot be resolved from the major peak of **LNFP I**, it could eventually be due to low standard compound purity. Nevertheless, for these two isomer pairs, the major peaks are well resolved and characteristics of each HMO structure. Hence, the isomer distinction can be performed under the condition of comparable MS response which is less straightforward in complex mixtures. Note that another difficulty in such a direct methodology arises from the varying MS response between isomer ions. The peaks of the protonated ions of **3'SL/6'SL** are, for example, well separated using a global fingerprint mode but **3'SL** gives a much lower response compared to **6'SL** in equimolar conditions and no isomer distinction can be obtained from the mixture of the two compounds (see **Figure S1**). Nevertheless, the HMO direct characterization can be globally performed despite the presence of multiple peaks. For example, the $[M+Li]^+$ forms of both **LNT** and **LNnT** show multiple peaks in the targeted analysis (see **Figure 2D**) but each isomer displays two resolved major specific peaks (Δ CCS% of about 3% between both isomers in **Table 1**). Another example is the distinction of deprotonated **3'SL** and **6'SL** ions, which are detected as two peaks using narrow mobility range (see **Figure 1**). Despite the overlap of a peak of each isomer, the characterization

of each isomer is still possible thanks to the detection of a specific mobility peak ($\Delta\text{CCS}\%$ of 2.1% between both isomers; see **Table 1**).

The resolving power and the mobility peak width are also interesting parameters that can be useful to predict the occurrence of multiple peaks, in particular for less resolving ion mobility instruments. Indeed, a low resolution peak (typically $R_p < 50$) with a FWHM (Full Width at Half Maximum) greater than 0.015 detected in global fingerprinting mode often leads to multiple peak detection in the targeted analysis. For example, the peaks of the deprotonated forms of 3'SL and 6'SL show signals with resolving powers of 50 and 48, respectively and FWHM of 0.023 and 0.024 in the global fingerprinting mode while two resolved peaks appeared for each deprotonated isomer in the targeted analysis (see **Figures 1** and **S2**).

Hence, the presence of multiple and/or unresolved peaks can make difficult HMO identification and no general trends can be obtained for all the HMOs. Nevertheless, all species detected both in positive and negative ion modes can be distinguished when analyzing complex mixtures as the data from all detected species will altogether allow to draw conclusions about the isomer pair studied (see **section 3.3**).

3.2. IM-MS analysis of reduced forms

The detection of multiple signals for native HMO species has been explained by the existence of different conformations (see discussion upper and the work of (Ujma et al., 2019)). Typically, glycan reduction is commonly performed prior to LC separation to avoid chromatogram artefactual complexification resulting from chromatographic separation of alpha/beta anomers (i.e. peak splitting) (Ritamo et al., 2013). In our study, all isomer couples were reduced and analyzed by IM-MS analyses in both negative and positive polarities. However, reduced HMOs showed weak MS sensitivity under negative ion mode and no ion mobility experiments could be conducted. For positive ionization mode, better MS responses could be obtained and only global sample fingerprints are acquired for the reduced forms (see **Table S3** and **Figure S3**). A comparison of isomer separation between native and reduced forms is reported in the **Figure 3**, for some ionic species of HMO pairs detected under positive ESI conditions (all IM-MS analyses from reduced HMOs can be found in the **Figure S3**).

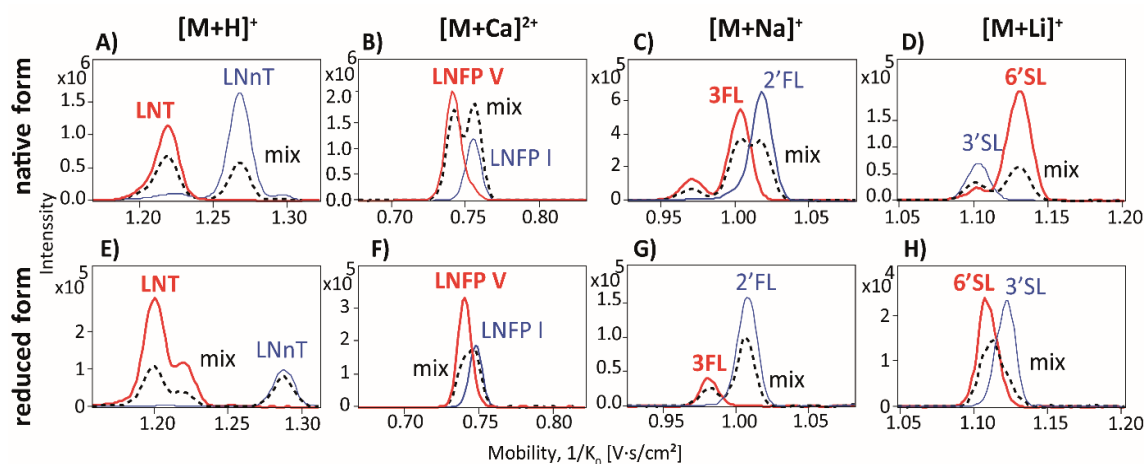


Figure 3. Extracted ion mobility spectra of different ionic species of HMO isomer pairs as (A, B, C and D) native and (E, F, G and H) reduced forms using large mobility range detection ($1/K_0 = 0.55\text{--}1.90\text{ V}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$). HMOs were analyzed at $1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ as native forms and were specifically diluted after reduction step. In D) and H) results were obtained for positive ESI mode after addition of lithium at $1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Dilution factor for each compound analysis can be found in Figures S1–S3.

Contrasted results were obtained according to the isomer pair and the ionic species studied. Overall, no real improvement in mobility separation was achieved after reduction. **Figure 3** shows poorer separations for the $[\text{M}+\text{Ca}]^{2+}$ species of reduced **LNFP I/LNFP V** and for the $[\text{M}+\text{Li}]^{+}$ ions of reduced **3'SL/6'SL** compared to their native forms, while a small separation improvement is obtained for the $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ adducts of reduced **2'FL/3FL** pair. Nevertheless, the protonated $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ ions of reduced **LNT/LNnT** and **LNFP I/LNFP V** forms are better separated than the $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ ions of their native forms (see **Figures 3** and **S3**).

It should be noted that, despite the decrease in their number, multiple peaks are still observed from reduced HMOs. For example, multiple peaks are detected for the protonated ions of reduced **LNT/LNnT** and **LNFP I/LNFP V** forms (see **Figure 2** and **S3**, respectively). (Wei et al., 2020) recently reported a similar observation with permethylated isomeric glycans, with the reducing-end reduction not decreasing the number of mobility peaks detected. Hence, the multiple mobility features could result from multiple ion structures, i.e. with various charge locations for a given specie (Nagy et al., 2018; Oranzi et al., 2019).

These results enlightened the difficulty to characterize the high heterogeneity of glycans. In addition to the glycan structural variety, the existence of anomeric configurations (α and β) and to a lesser extent of large ion populations makes very difficult the prediction of a general trend for all HMOs. Nevertheless, these preliminary studies on HMO standards provide a very promising analytical solution to characterize HMOs in breastmilk samples using IM-MS.

3.3. Direct IM-MS and IM-MS/MS analysis of breastmilk sample

Direct and fast IM-MS analysis of breastmilk sample was then performed without extensive sample preparation (only a defatted protocol was applied, see **experimental section**). IM-MS experiments were conducted on a breastmilk sample diluted 1:5000 under both positive (see **Figure S4**) and negative (see **Figure 4**) ionization modes. Large mobility range detection was first applied to acquire a global HMO profile. Nevertheless, targeted method using a narrow mobility range is then applied to screen specific ionic forms (see the extracted ion mobility spectrum of deprotonated **3'SL** and **6'SL** ions detected in milk using targeted analysis in **Figure 4**). **Figure 4** shows the IM-MS analysis under negative ESI mode of a diluted breastmilk sample. The extracted ion mobility spectra for the $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ and $[M+HCOO]^-$ ions of the four native HMOs isomer pairs were reported from both standard mixture solution (final concentration at $1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) and diluted breastmilk sample.

As described in the previous section, isomer separation cannot be achieved for all HMO ionic species. Nevertheless, by combining the results from all the different ions, the distinction of most of the isomers can be successfully obtained under global fingerprinting conditions (see **Figure 4**). Indeed, **LNFP I** and **LNFP V** are well or partially separated for all the ionic forms considered. The $[M+HCOO]^-$ ions of **LNT** and **LNnT** are not detected in the diluted breastmilk sample but these two isomers are separated as $[M-H]^-$ and $[M+Cl]^-$ ions. The characterization of the **2'FL/3FL** pair is more complicated since these two isomers are not separated as $[M-H]^-$ ions (see **Figure S2** and **Figure 4**) but a partial separation is obtained for the $[M+Cl]^-$ adducts and the mobility peak width of the $[M+HCOO]^-$ ions suggests the presence of the two isomers. Finally, **3'SL/6'SL** is the sole isomer pair that cannot be resolved using a large mobility range because the only detected $[M-H]^-$ ions display a broad single peak under moderate resolution conditions. Nevertheless, the targeted analysis on these deprotonated ions showed the presence of the two isomers (detected as multiple ion mobility peaks), which are successfully distinguished (see the comparison of **Figure 1** and **Figure 4**).

Similar observations can be made from IM-MS analysis under positive ion conditions (see the acquired global fingerprint in **Figure S4**), where the **LNT/LNnT** and **LNFP I/LNFP V** pairs are distinguished from the extracted ion mobility spectra of $[M+H]^+$ ions while the width of the $[M+Na]^+$ form of **2'FL/3FL** allow to figure out the presence of both isomers. The **3'SL/6'SL** pair is still the more difficult to distinguish in global fingerprinting mode but the $[M+Ca]^{2+}$ species gives an insight on the presence of one of the isomer or the other (see **Table 1**). Finally, an accurate isomer characterization can be obtained by combining all data from both positive and negative ion modes (**Figures 4** and **S4**).

The IM-MS analysis of HMO standard mixture reveals another striking observation that is the variable MS response among the HMO structures. A much higher intensity of mobility signal is, for example, observed for $[M-H]^-$ ion of **3'SL/6'SL** isomers compared to other deprotonated HMO ions (see **Figure 4**).

Interestingly, comparison of HMO responses under IM-MS analysis between the standard mixture under equimolar conditions and the breastmilk sample suggested a much lower amount of **LNFP V** and **3FL** relatively to their respective isomers in breastmilk sample. Indeed, the mobility peaks corresponding to the **LNFP V** compound are clearly absent in the breastmilk sample for all the ionic forms under both negative (**Figure 4**) and positive (**Figure S4**) ion modes. A much lower relative amount of **3FL** compared to **2'FL** can also be evidenced by the disappearance of the shoulder for the $[M+Cl]^-$ and $[M+Na]^+$ ions which corroborates the smaller width of the unresolved peak of $[M+HCOO]^-$ ions in the breastmilk sample (see **Figures 4** and **S4**). To check the possibility that the absence of mobility peaks for **LNFP V** and **3FL** is not caused by matrix effects, IM-MS analysis of a diluted breastmilk sample spiked with the corresponding authentic standard at $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ was performed under the same conditions (see **Figure S5**). The detection of mobility signals corresponding to the two spiked **LNFP V** and **3FL** compounds indicated that they were not affected by matrix effects, but rather evidenced their low quantity in breastmilk sample. In fact, a lower relative amount of these two HMOs compared to their respective isomers has already been reported by previous LC/MS experiments (Oursel et al., 2017). Such encouraging result showed the possibility to characterize quantitatively an isomer from the other using direct IM-MS approach. Further investigations should be done to determine the limit of detection and the linearity of the response for a large range of concentrations. Nevertheless, few works reported the tentative estimation of relative content of (isomeric) compounds (Hofmann et al., 2015; Przybylski and Bonnet, 2021) using IM-MS approach, with, for example, a 0.1% of detection limit between sugar anomers (Hofmann et al., 2015).

To further investigate the breastmilk sample, the search for other HMOs, was performed based on their theoretical accurate m/z values and their corresponding extracted mobility spectra were reported (see **Table S5 and S6**). Although the monosaccharide composition can be unambiguously assigned thanks to the accurate mass measurements, the experimental $\text{TIMS}^{\text{CCS}}_{\text{N}_2}$ values cannot be attributed to a specific HMO structure without authentic standard compounds. Indeed, our results demonstrated the possibility for a given HMO structure to display multiple ion mobility peaks due to different HMO configurations and/or ion isomers.

The availability of pure standards is therefore mandatory in order to unambiguously build a reference HMO mobility database.

Finally, in addition to IM-MS analysis, tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments were performed on the breastmilk sample, providing three data features for a high degree of compound identification (m/z , fragmentation pattern and $^{TIMS}CCS_{N_2}$) in a single experiment (see **Figure 4**). With our ion source parameters, no in-source fragmentation is detected under ESI conditions. Therefore, collision-induced dissociation (CID) experiments were systematically performed on both protonated and deprotonated precursor ions after their ion mobility separations. The CID spectra display in both positive and negative modes mostly correspond to cleavages of glycosidic bond, yielding B, Y or C, Z type ions with little or no cross-ring fragment ions (A and X ions) according to (Domon and Costello, 1988) nomenclature. It must be noted that glycan rearrangements (typically fucose residue) may occur in MS/MS experiments for protonated species using CID conditions (Wuhrer et al., 2011).

The obtained data were, compared with the MS/MS experiments carried out for the HMO standards. **Figures 4, S4 and S6** show the MS/MS spectra of some HMOs which can be distinguished by ion mobility and which exhibit distinct spectral fingerprints and/or isomer diagnostic ions. Note that better isomer distinction according to specific isomer fragment ions was obtained from deprotonated LNFP I/LNFP V pair (compared to positive ion conditions) as already reported by (Mank et al., 2018) It should be pointed out that although the $[M-H]^-$ ions of **3'SL** and **6'SL** are not separated using global fingerprinting mode, the specific fragmentation patterns of each isomer can be obtained by performing a targeted analysis (see MS/MS spectra obtained from mobility peaks A and C detected under targeted conditions in **Figure 4**). Nevertheless, it is still possible to extract an isomer-specific fragmentation pattern from an unresolved ion mobility peak detected in large mobility mode by extracting the MS/MS spectra on the edges of the peak (see **Figure S6**).

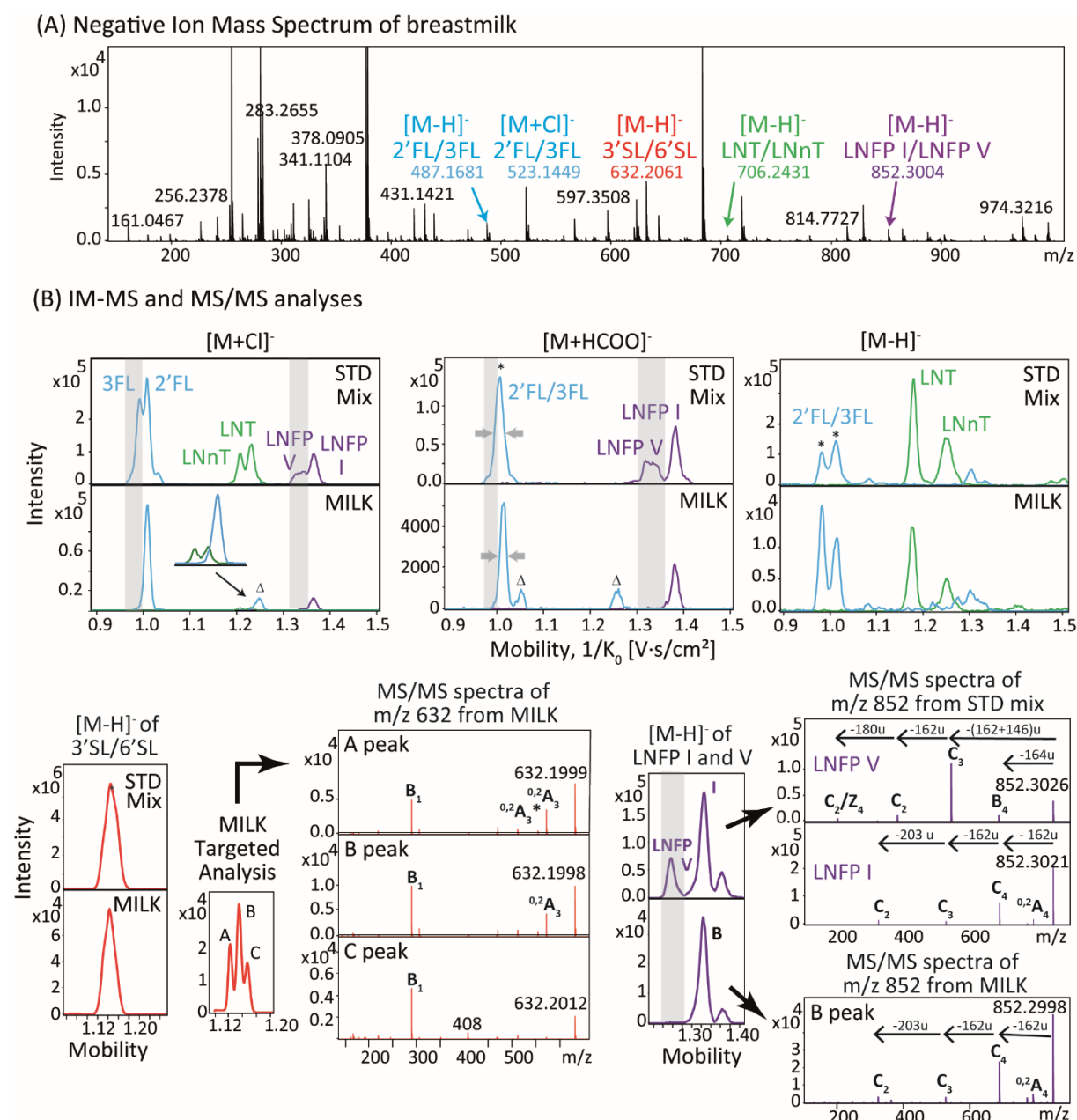


Figure 4. IM-MS and MS/MS analyses of breastmilk sample (1:5000 dilution in ACN/H₂O) under negative ESI mode. A) Mass spectrum showing some low abundant ions annotated as the native HMO species, confirmed by, in B), their extracted ion mobility spectra as $[M+Cl]^-$, $[M+HCOO]^-$ and $[M-H]^-$ species detected from both the HMO standard mixture (1 ng. μL^{-1} final concentration) and the diluted breastmilk sample. For $[M-H]^-$ ions of the 3'SL/6'SL pair, a targeted analysis was conducted and MS/MS spectra conducted at 45 eV extracted from their respective mobility peaks in the breastmilk sample are reported (see Figure S6 for MS/MS spectra of the standard compounds). For $[M-H]^-$ of LNFP I and LNFP V, MS/MS spectra at 15 eV are reported for the two isomers standards and for the single mobility peak (as B peak) detected in breastmilk. Peaks labelled with *: not separated isomers, Δ : mobility peak from an isobaric compound; note that large differences in intensity detected in the mobility peaks between the standard mixtures and the breastmilk sample are highlighted by gray bands.

4. **Conclusion**

Breastmilk characterization is challenging due to the diversity of HMOs and their structural complexity. This study shows the potential of direct injection TIMS-TOF for high throughput and high resolution analyses of most abundant HMOs, without extensive sample preparation of breastmilk samples. The IM-MS analyses under both positive and negative ESI modes allowed to identify all the HMO pairs studied by combining the different species detected in both ion polarities. With such direct IM-MS analysis, some semi-quantitative hypotheses could even be made about breastmilk components. In addition, the flexible resolution of the TIMS enabled to perform both global fingerprints and targeted analyses on the same sample. Finally, MS/MS experiments after mobility separation of isomer species allowed increasing the level of confidence in the compound identification, by providing three molecular descriptors obtained in a single analysis (CCS, m/z and fragmentation patterns). Our results constitute the proof of concept study of the application of IM-MS approach as a high throughput analytical platform for the characterization of HMOs in breastmilk. It could, for example, be used for the classification of secretor status without lengthy LC-MS analyses. Further investigations on other HMO standards are required to build an HMO database including ion mobility and fragmentation pattern data useful to identify as many HMOs as possible in breastmilk.

Acknowledgments

We thank the MetaboHUB infrastructure (ANR-11-INBS-0010 grant) for the funding.

Supporting Information

“Trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for high throughput and high resolution characterization of human milk oligosaccharide isomers”

Aurélie Delvaux¹, Estelle Rathahao-Paris^{1,2}, Blanche Guillon², Sophie Cholet², Karine Adel-Patient², François Fenaille², Christophe Junot², Sandra Alves¹

¹ Sorbonne Université, Faculté des Sciences et de l'Ingénierie, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), 75005 Paris, France

² Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Experimental

All ion mobility spectra were extracted for m/z values specific to species detected for all HMOs studied with an error of ± 0.005 u. They are obtained by applying Gaussian smoothing of 0.001 V.s.cm⁻². The average ^{TIMS}CCS_{N2} values reported in tables **S1**, **S2** and **S3** are from experiments carried out over 3 days or more with an average RSD of 0.2% (maximum RSD of 0.5%).

Summary of contents

Table S1. ^{TIMS}CCS_{N2} values of different species detected in positive ESI ionization IM-MS analyses of native standard HMOs.

Table S2. ^{TIMS}CCS_{N2} values of different species detected in negative ESI ionization IM-MS analyses of native standard HMOs.

Table S3. ^{TIMS}CCS_{N2} values for different species detected in positive ESI ionization IM-MS analyses of reduced standard HMOs.

Table S4. Comparison of our ^{TIMS}CCS_{N2} values for different species detected in positive and negative ESI ionization IM-MS analyses of native standard HMOs with some ^{DTIMS}CCS_{N2} values from (Zheng et al., 2017a) and (May et al., 2014)

Table S5. Putative HMOs detected in positive ESI ionization IM-MS analyses of diluted human milk sample (1:5000).

Table S6. Putative HMOs detected in negative ESI ionization IM-MS analyses of diluted human milk sample (1:5000).

Figure S1. *Extracted ion mobility spectra under positive ESI mode of native HMO isomer pairs using global fingerprinting and targeted modes (narrow mobility detection range centered on the studied species).*

Figure S2. *Extracted ion mobility spectra under negative ESI mode of native HMO isomer pairs using global fingerprinting and targeted modes (narrow mobility range detection centered on the studied species).*

Figure S3. *Extracted ion mobility spectra under positive ESI mode of reduced HMO isomer pairs using global fingerprinting mode.*

Figure S4. *IM-MS and IM-MS/MS analyses under positive ESI mode of human milk sample (diluted 1:5000) using global fingerprinting mode.*

Figure S5. *Comparison of the extracted ion mobility spectra under positive and negative ESI ionization of diluted human milk sample (1:2000) and diluted human milk sample spiked with A) LNFP V and B) 3FL.*

Figure S6. *IM-MS/MS analysis under negative ESI mode of the standard 3'SL and 6'SL isomer mixture and of the diluted human milk sample using global fingerprinting mode.*

Table S1. $^{TMS}CCS_{N_2}$ values of different species detected in positive ESI ionization IM-MS analyses of native standard HMOs. The standard compounds were analyzed at different concentrations but always in equimolar conditions for each isomer pair.

Native HMO	IMS mode	$[M+H]^+$ TIMS CCS _{N2} (Å ²)		$[M+Ca]^{2+ (a)}$ TIMS CCS _{N2} (Å ²)			$[M+Na]^+$ TIMS CCS _{N2} (Å ²)		$[M+Li]^+$ TIMS CCS _{N2} (Å ²)		$[M+2Li]^{2+ (a)}$ TIMS CCS _{N2} (Å ²)
LNT	F	249.1		288.1			239.3 (100%)	242 (79%)	240.5 (100%)	251.3 (14%)	300.0
	T	246.3 (17%) 249.0 (100%)		287.8			239.6 (100%)	242.6 (74%)	240.1 (100%) 243.5 (81%)	251.0 (17%)	299.7
LNnT	F	259.1		288.0 (100%)	299.4 (46%)	314.6 (17%)	239.9		237.3		307.7
	T	258.8		287.8 (100%)	298.6 (86%)	314.9 (34%)	239.6 (100%) 241.2 (74%)		236.4 (100%) 238.4 (81%) 241.0 (17%)		307.7
LNFP I	F	282.6		312.8			274.1		270.8		302.2
	T	281.9		313.2			274.0		270.1 (100%) 272.6 (74%)		302.7
LNFP V	F	268.3		307.1			260.6 (24%)	270.4 (100%)	254.8 (13%)	270.0 (100%)	319.4
	T	267.4 (100%) 270.7 (19%) 275.5 (16%)		306.9 (100%) 311.5 (14%)			261.0 (19%)	267.1 (28%) 270.1 (100%)	254.5 (9%)	266.5 (16%) 269.7 (100%)	319.5 (87%) 322.5 (100%)
2'FL	F	n.d.		269.3 (73%)	281.5 (100%)		209.8		207.7		n.d.
	T			268.0 (51%)	280.8 (100%)		210.2		208.5		
3FL	F	n.d.		264.8			199.9 (23%)	206.5 (100%)	202.3		n.d.
	T			262.3 (19%) 267.3 (100%)			200.9 (27%)	207.2 (100%)	202.7 (94%) 203.8 (100%)		
3'SL	F	223.1 (100%)	231.8 (53%)	278.6			231.0		226.6		n.d.
	T	223.2 (100%)	231.8 (46%)	278.0			231.0		226.9		
6'SL	F	231.8		279.0 (100%)	289.1 (58%)		233.8		232.3		n.d.
	T	231.8		278.6 (90%)	288.5 (100%)		233.7		226.5 (13%) 231.7 (69%) 233.1 (100%)		

F, Fingerprinting mode; T, Targeted mode

The normalized abundances of multiple mobility peaks for a given HMO ion are reported in brackets. Only peaks with a normalized abundance > 10% (relative to the major mobility signal) are reported. The $[M+Li]^+$ and $[M+2Li]^{2+}$ adducts are generated by addition of lithium chloride

^(a) Note that (Pagel and Harvey, 2013) showed that it is important to use calibrant ions at the same charge state as the studied species to increase the level of confidence in their experimental CCS produced. Here, we could only calibrate with singly charged ions (ESI-L Low Concentration Tuning Mix calibration solution, see experimental section). Hence, the $^{TMS}CCS_{N_2}$ values of $[M+Ca]^{2+}$ and $[M+2Li]^{2+}$ should be considered with caution.

n.d. = not detected

Table S2. $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values of different species detected in negative ESI ionization IM-MS analyses of native standard HMOs. The standard compounds were analyzed at different concentrations but always in equimolar conditions for each isomer pair

Native HMO	IMS mode	[M-H] ⁻ _{TIMS} CCS _{N2} (Å ²)				[M+Cl] ⁻ _{TIMS} CCS _{N2} (Å ²)		
LNT	F	240.1				250.4		
	T	239.3				249.6		
LNnT	F	239.4 (33%)	254.5 (100%)			245.5		
	T	n.d.	254.4 (100%) 256.8 (50%)			245.3		
LNFP I	F	272.9 (100%)	281.3 (11%)			276.8		
	T	271.9 (100%)	280.5 (8%)			275.8		
LNFP V	F	258.9 (100%)	274.2 (27%)			269.6 (84%)	272.1 (100%)	278.2 (18%)
	T	257.9 (100%)	273.6 (26%)			268.3 (99%)	271.2 (100%)	277.3 (22%)
2'FL ^(a)	F	201.3 (> 50%)	207.8 (> 50%)	267.4 (< 50%)	273.8 (< 50%)	206.4 (100%)	211.3 (9%)	
	T	201.3 (> 50%)	207.6 (< 50%)	266.9 (> 50%)	273.5 (< 50%)	206.3 (100%)	210.9 (11%)	
3FL ^(a)	F	205.5 (> 50%)	266.6 (> 50%)	272.5 (< 50%)		202.9		
	T	205.6	265.0 (> 50%) 266.7 (> 50%) 268.9 (< 50%)	271.7 (~ 50%) 273.0 (~ 50%)		198.9 (12%) 202.7 (100%)		
3'SL	F	239.0				n.d.		
	T	236.7 (66%) 239.0 (100%)						
6'SL	F	236.6				n.d.		
	T	234.0 (71%) 236.5 (100%)						

F, Fingerprinting mode; T, Targeted mode

The normalized abundances of multiple mobility peaks for a given HMO species are reported in brackets. Only peaks with a normalized abundance > 10% (relative to the major mobility signal) are reported.

(a) Note that for 2'FL and 3FL, the relative intensities of $[M-H]^-$ species varied from run to run despite the repeatability of the CCS values. Thus, only an indication of abundance relative to 50% is reported. Note that normalized abundances are reported by comparing all peaks in global fingerprinting but in targeted analysis, only the first two peaks of 2'FL and the first peak of 3FL could be considered together in a first analysis and then the remaining two peaks for both isomers were compared in a second analysis.

n.d. = not detected

Table S3. $^{TMS}CCS_{N_2}$ values for different species detected in positive ESI ionization IM-MS analyses of reduced standard HMOs.

Reduced HMO	IMS mode	$[M+H]^+$ $^{TMS}CCS_{N_2}$ (Å ²)		$[M+Ca]^{2+}$ $^{TMS}CCS_{N_2}$ (Å ²)	$[M+Na]^+$ $^{TMS}CCS_{N_2}$ (Å ²)	$[M+Li]^+$ $^{TMS}CCS_{N_2}$ (Å ²)	
LNT	F	244.8 (100%)	248.7 (39%)	283.1	241.1	238.8 (100%)	245.8 (12%)
	T	244.5 (100%)	248.5 (49%)	n.d.	241.0	n.d.	n.d.
LNnT	F	262.8		285.0	240.0	237.9	
	T	261.7		n.d.	239.6	n.d.	
LNFP I	F	279.5		309.1	265.9	265.6	
	T	277.6 (100%) 279.4 (58%)		n.d.	265.0	n.d.	
LNFP V	F	256.0		305.8	268.6	270.0	
	T	n.d.		n.d.	267.5 (100%) 270.8 (19%)	n.d.	
2'FL	F	n.d.		n.d.	207.2	204.9	
	T				208.1	n.d.	
3FL	F	n.d.		n.d.	201.8	199.7	
	T				202.8	n.d.	
3'SL	F	n.d.		271.1	232.4	229.9	
	T			n.d.	232.4	n.d.	
6'SL	F	n.d.		275.8	230.0	227.4	
	T			n.d.	230.2	n.d.	

F, Fingerprinting mode; T, Targeted mode

The normalized abundance of multiple mobility peaks are reported in brackets. Only peaks with a normalized abundance > 10% (relative to the major mobility signal) are reported.

***n.d.* = not detected**

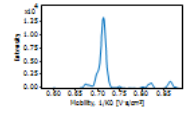
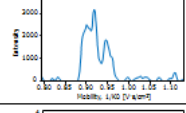
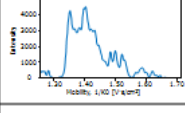
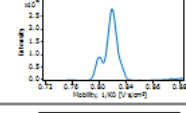
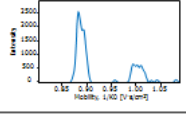
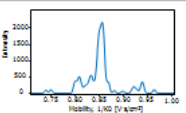
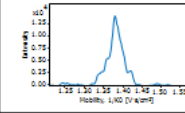
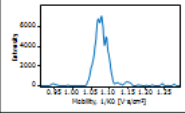
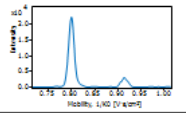
Table S4. Comparison of our $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values for different species detected in positive and negative ESI ionization IM-MS analyses of native standard HMOs with some $^{DTIMS}CCS_{N_2}$ values from (Zheng et al., 2017a) and (May et al., 2014)

	[M+Na] ⁺				
	$^{TIMS}CCS_{N_2}$	$^{DTIMS}CCS_{N_2}(\text{Zheng})$	$\Delta CCS\%$	$^{DTIMS}CCS_{N_2}(\text{May})$	$\Delta CCS\%$
LNT	239,3	239,2	-0,05%	x	
LNnT	239,9	240,6	0,29%	x	
LNFP I	274,1	274,9	0,29%	276,1	0,73%

	[M+Li] ⁺				
	$^{TIMS}CCS_{N_2}$	$^{DTIMS}CCS_{N_2}(\text{Zheng})$	$\Delta CCS\%$	$^{DTIMS}CCS_{N_2}(\text{May})$	$\Delta CCS\%$
LNT		x		x	
LNnT		x		x	
LNFP I	270,8	x		269,6	-0,44%

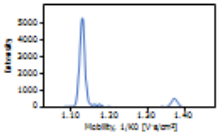
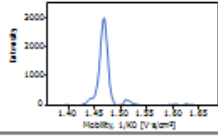
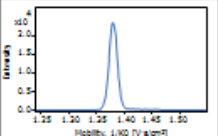
	[M-H] ⁻				
	$^{TIMS}CCS_{N_2}$	$^{DTIMS}CCS_{N_2}(\text{Zheng})$	$\Delta CCS\%$	$^{DTIMS}CCS_{N_2}(\text{May})$	$\Delta CCS\%$
LNT	240,1	240,9	0,33%	x	
LNnT	254,5	254,7	0,09%	x	
LNFP I	272,9	275,9	1,08%	x	

Table S5. Putative HMOS detected in positive ESI ionization IM-MS analyses of diluted human milk sample (1:5000). Proposed HMO structures were from (Azad et al., 2018).

Code (a)	Proposed structure	[M+H] ⁺ m/z exp (error)	Ion mobility spectrum	[M+Na] ⁺ m/z exp (error)	Ion mobility spectrum	[M+Ca] ²⁺ m/z exp (error)	Ion mobility spectrum
2020	DFLac	n.d.		n.d.		337.0965 (0.9 ppm)	
4220	DFLNH	Out of the mass range		Out of the mass range		702.2278 (1.6 ppm)	
4110	DFLNT	1000.3672 (4.3 ppm)		n.d.		519.6606 (4.4 ppm)	
3102	DSLNT	n.d.		n.d.		664.6993 (1.7 ppm)	
4200	LNH	n.d.		n.d.		556.1693 (3.2 ppm)	
3101	LSTb	999.3487 (2.4 ppm)		1021.3283 (4.7 ppm)		519.1517 (1.9 ppm)	
	LSTc						

(a) Monosaccharide Composition (Hex/HexNAc/Fuc/NeuAc)
n.d. = **not detected**

Table S6. Putative HMOS detected in negative ESI ionization IM-MS analyses of diluted human milk sample (1:5000). Proposed HMO structures were from (Azad et al., 2018).

Code (a)	Proposed structure	[M-H] ⁻ m/z exp (error)	Ion mobility spectrum	[M+Cl] ⁻ m/z exp (error)	Ion mobility spectrum
2020	DFLac	n.d.		669,2042 (-4,2 ppm)	
4110	DFLNT	n.d.		1034,3342 (-0,6 ppm)	
3101	LSTb	997,3370 (-0,4 ppm)		n.d.	
	LSTc				

(a) Monosaccharide Composition (Hex/HexNAc/Fuc/NeuAc)
n.d. = **not detected**

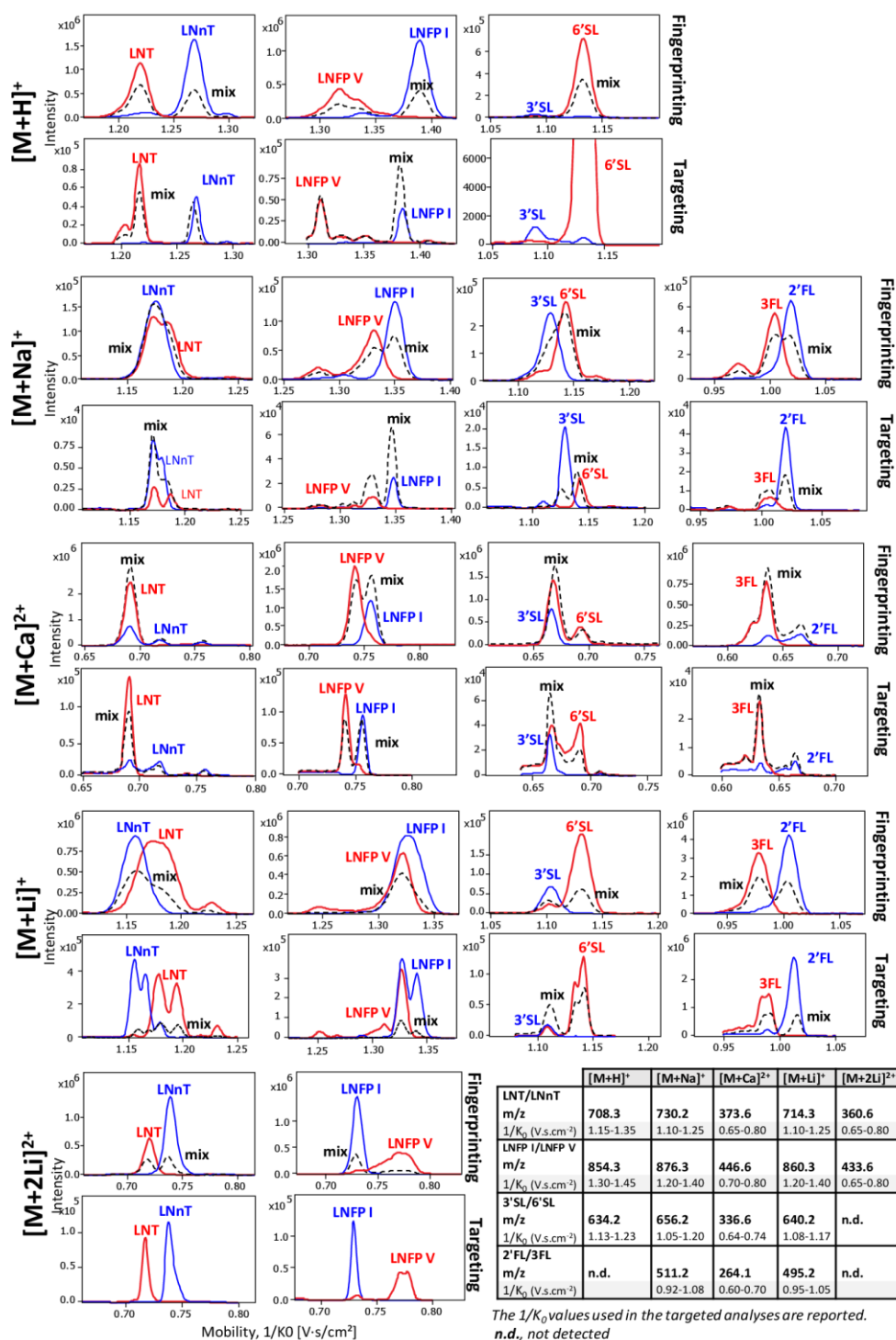
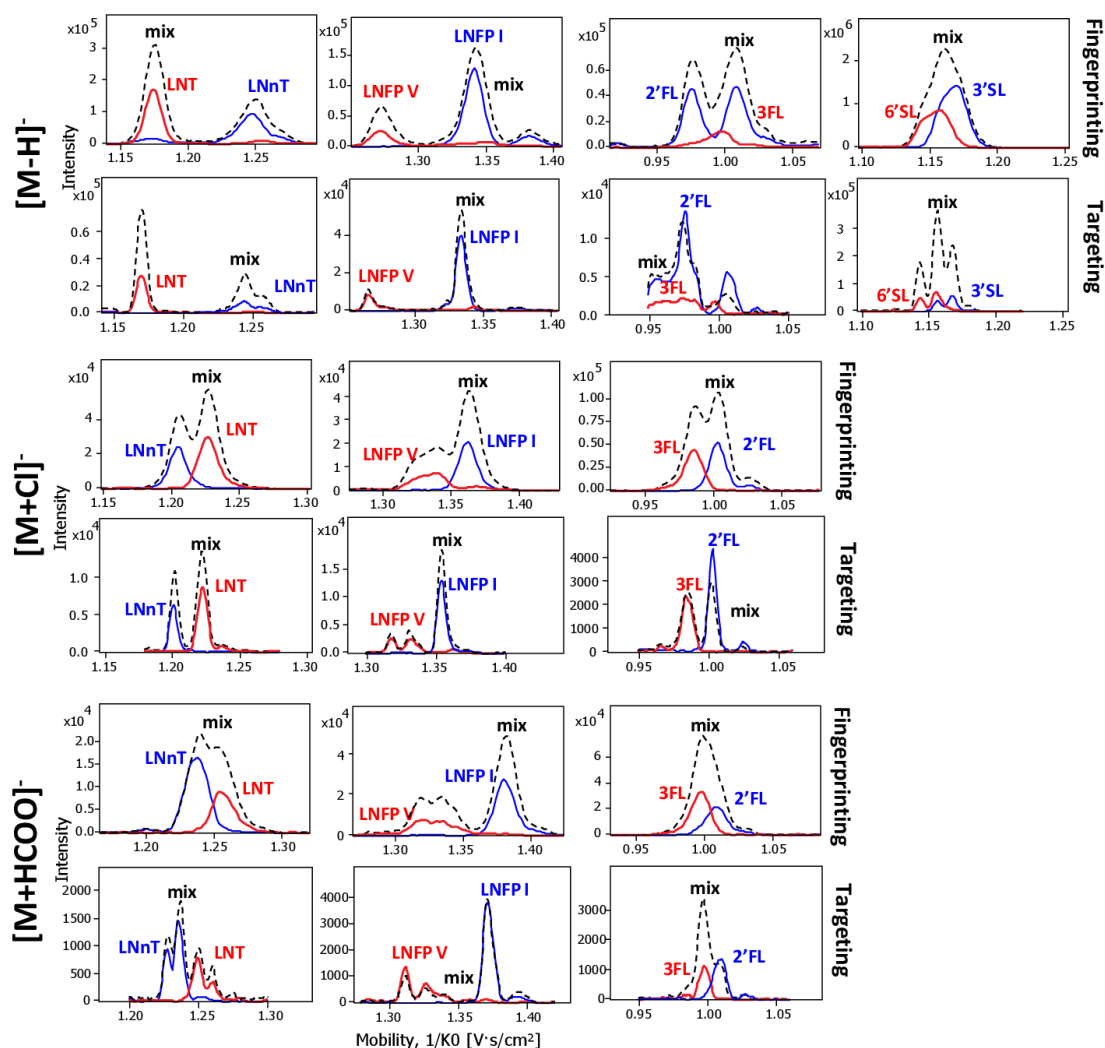


Figure S1. Extracted ion mobility spectra under positive ESI mode of native HMO isomer pairs using large mobility range detection (as global fingerprinting, $1/K_0 = 0.55\text{--}1.90\text{ V.s.cm}^{-2}$) and using narrow mobility range detection as targeted analyses. All compounds were analyzed at $1\text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ for the global fingerprinting and at $0.1\text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ for the targeted analyses. The ion mobility spectra are extracted at the m/z value corresponding to each species detected for each HMO isomer pair using either a large mobility range or a narrow mobility range indicated in the table. Traces are reported for each isomer and the isomer pair mixture when available. Note that $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions are not detected for the 2'FL/3FL pair, and after lithium addition, $[\text{M}+2\text{Li}]^{2+}$ ions are not observed for both 2'FL/3FL and 3'SL/6'SL pairs.

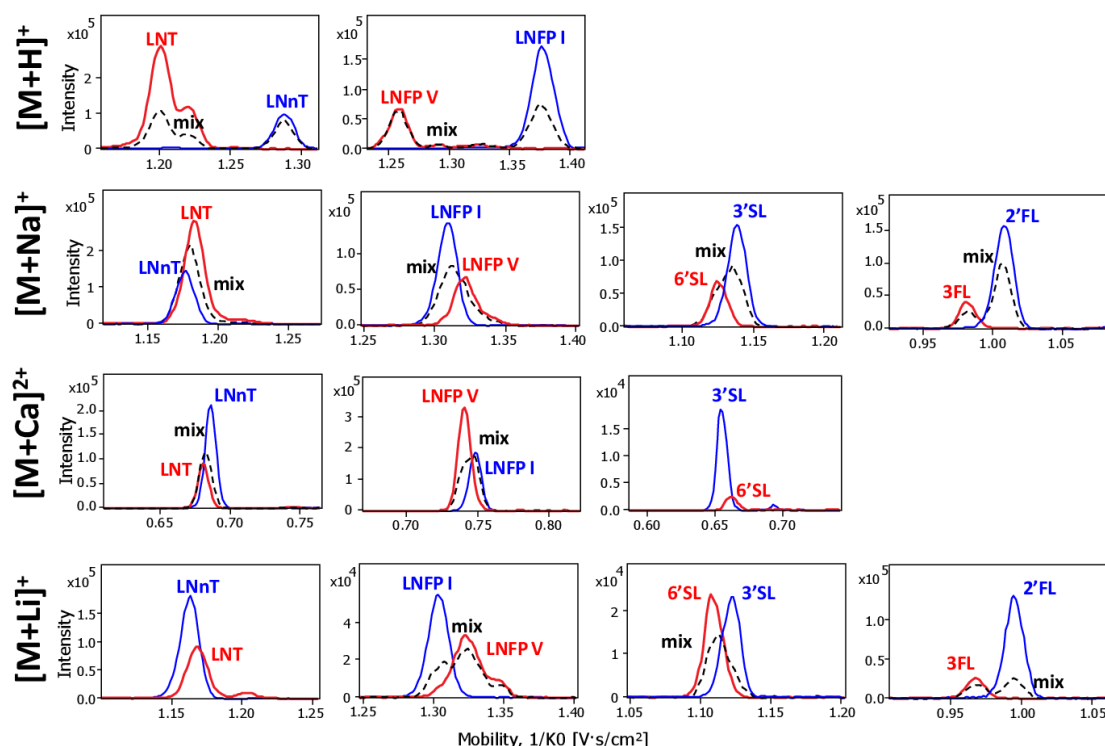


	[M-H] ⁻	[M+Cl] ⁻	[M+HCOO] ⁻
LNT/LNnT			
m/z	706.2	742.2	752.2
1/K ₀ (V.s.cm ⁻²)	1.12-1.30	1.18-1.28	1.20-1.30
LNFP I/LNFP V			
m/z	852.3	888.3	898.3
1/K ₀ (V.s.cm ⁻²)	1.22-1.42	1.30-1.40	1.28-1.42
3'SL/6'SL			
m/z	632.2	n.d.	n.d.
1/K ₀ (V.s.cm ⁻²)	1.10-1.22		
2'FL/3FL			
m/z	487.2	523.2	533.2
1/K ₀ (V.s.cm ⁻²)	0.95-1.05	0.95-1.06	0.95-1.06

The 1/K₀ values used in the targeted analyses are reported.

n.d., not detected

Figure S2. Extracted ion mobility spectra under negative ESI mode of native HMO isomer pairs using large mobility range detection (as global fingerprinting, 1/K₀ = 0.55-1.90 V.s. cm⁻²) and narrow mobility range detection as targeted analyses. All compounds were analyzed at 1 ng.μL⁻¹ for the global fingerprinting and at 0.1 ng.μL⁻¹ for the targeted analysis. The ion mobility spectra are extracted at m/z value corresponding to each species detected for each HMO isomer pair using either a large mobility range or a narrow mobility range indicated in the table. Traces are reported for each isomer and the isomer pair mixture when available. Note that [M+Cl]⁻ and [M+HCOO]⁻ ions are not detected for the 3'SL/6'SL.



	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+Ca] ²⁺	[M+Li] ⁺
LNT/LNnT				
m/z	710.3	732.2	374.6	716.3
Dilution	1:20	1:20	1:10	1:10
LNFP I/LNFP V				
m/z	856.3	878.3	447.6	862.3
Dilution	1:20	1:20	1:10	1:40 for LNFP I 1:10 for LNFP V
3'SL/6'SL				
m/z	n.d	658.2	337.6	642.2
Dilution		1:10	1:10	1:40 for 3'SL 1:10 for 6'SL
2'FL/3FL				
m/z	n.d.	513.2	n.d.	497.2
Dilution		1:40 for 2'FL 1:10 for 3FL		1:40 for 2'FL 1:10 for 3FL

n.d., not detected

Figure S3. Extracted ion mobility spectra under positive ESI mode of reduced HMO isomer pairs using large mobility range detection ($1/K_0 = 0.55\text{--}1.90\text{ V.s.cm}^{-2}$). All compounds were specifically diluted after reduction for each species, the dilution factors are reported in the table. The ion mobility spectra are extracted at m/z value corresponding to each species detected for each reduced HMO isomer pair. Traces were reported for each isomer and the isomer pair mixture when available. $[M+Li]^+$ ions were formed after addition of lithium at $1\text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Note that $[M+H]^+$ ions are not detected for both 3'SL/6'SL and 2'FL/3FL pairs and $[M+Ca]^{2+}$ ions are not observed for 2'FL/3FL pair.

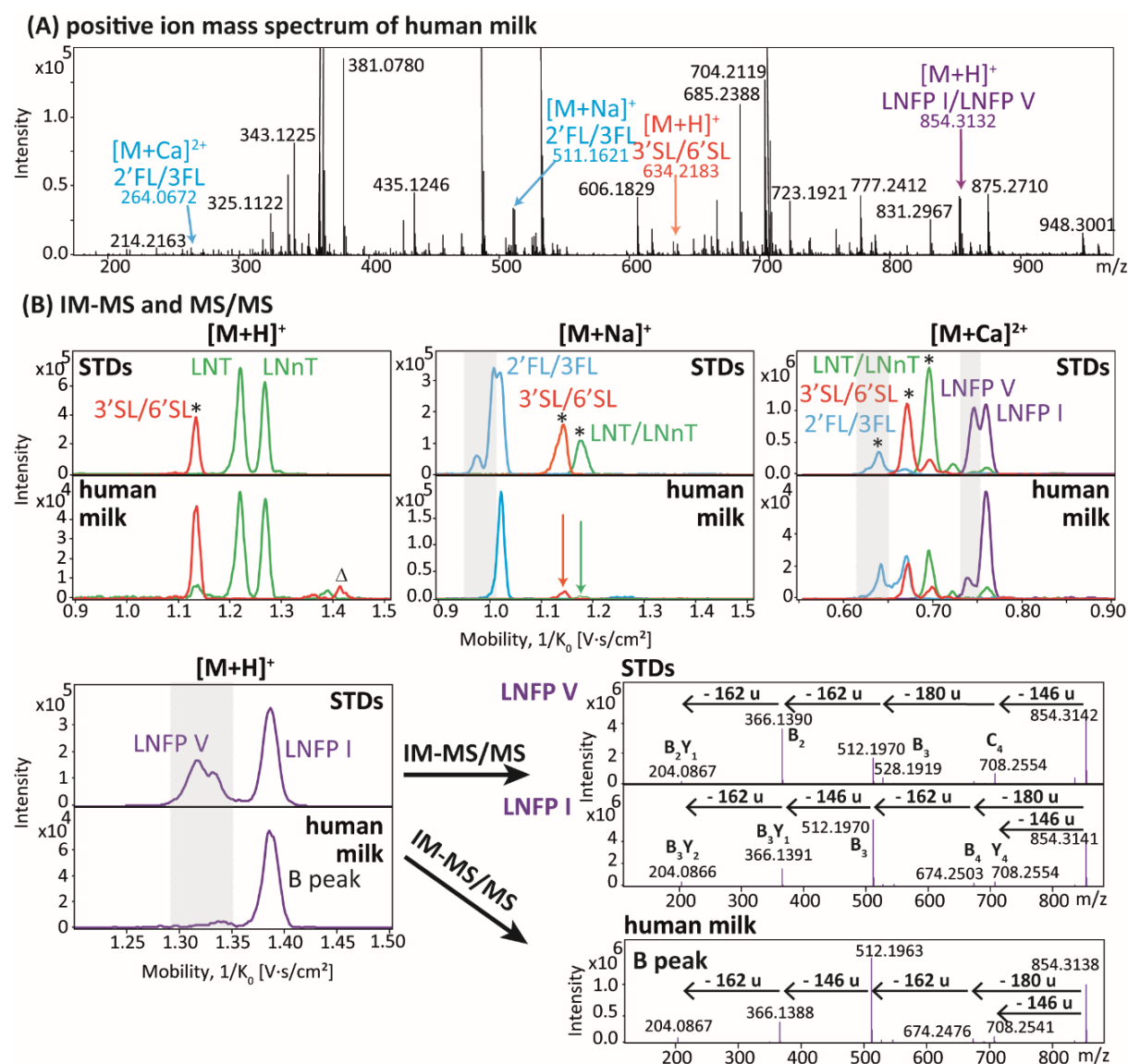


Figure S4. IM-MS and MS/MS analyses of breastmilk sample (1:5000 dilution in ACN/H₂O + 0.1% acid formic) under positive ESI mode. A) Mass spectrum showing some low abundant ions annotated as the native HMOs specie, confirmed by, in B) their extracted ion mobility spectra as [M+H]⁺, [M+Na]⁺ and [M+Ca]²⁺ species detected from both the HMO standard mixture (1 ng.μL⁻¹ final concentration) and the diluted breastmilk sample. For [M+H]⁺ of the LNFP I/LNFP V pair, MS/MS spectra at 15 eV are reported for the two isomers standards and for the single mobility peak (as B peak) detected in breastmilk. Peaks labelled with *: not separated isomers, Δ: mobility peak from an isobaric compound. Note that large differences in intensity detected in the mobility peaks between the standard mixtures and the breastmilk sample are highlighted by gray bands.

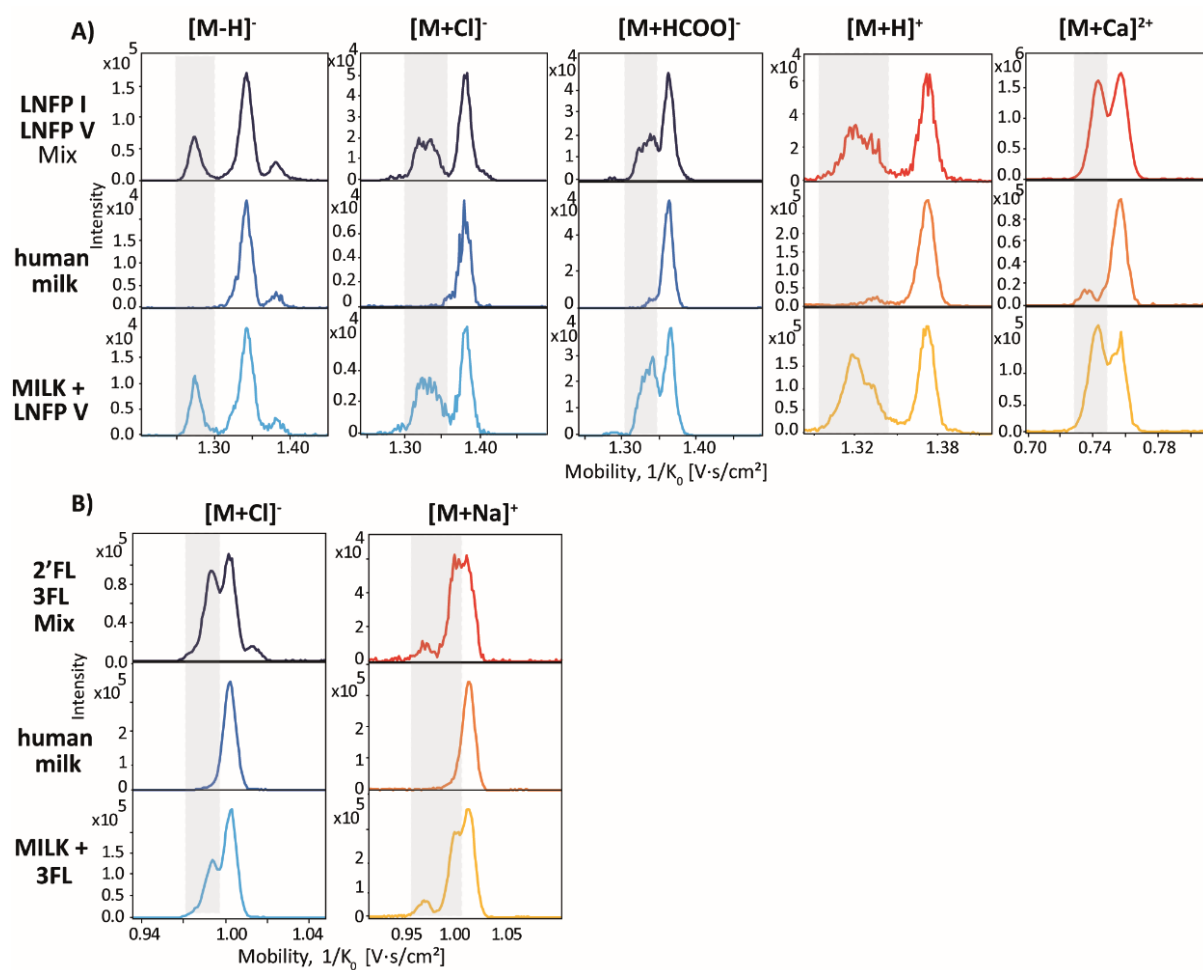


Figure S5. Comparison of the extracted ion mobility spectra under positive and negative ESI ionization of diluted human milk sample (1:2000) and diluted human milk sample spiked with A) LNFP V ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) and B) 3FL ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) using fingerprinting mode ($1/K_0 = 0.55-1.90 \text{ V} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$).

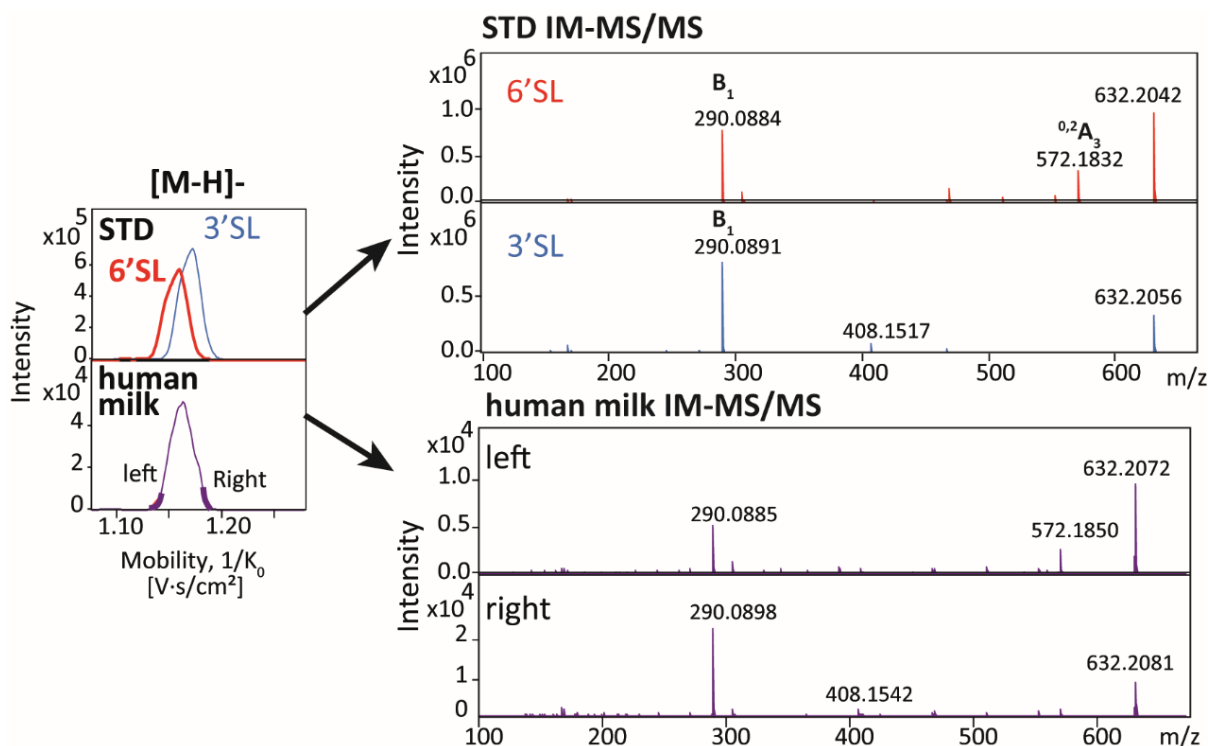


Figure S6. IM-MS/MS analysis under negative ESI mode of the standard 3'SL and 6'SL isomer mixture and of the diluted human milk sample (1:5000 dilution) using large mobility range detection ($1/K_0 = 0.55-1.90 \text{ V} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$). Note that the MS/MS spectra of the m/z 632.2 $[M-H]^-$ ions were extracted on different part of the ion mobility spectra of 3'SL/6'SL from diluted human milk.

II-2B. Etude étendue des HMOs communément présents dans le lait maternel

A la suite de cette étude préliminaire, nous avons décidé d'étendre nos méthodes à l'analyse de dix-huit HMOs communément trouvés dans le lait maternel (voir **Figure II-2B.1**). Les composés 2'FL, 3FL, 3'SL, 6'SL, LNDFH I, LNFP I, LNFP II, LNH, LDFT, LSTb, LSTc et DFLNH ont été achetés auprès du fournisseur Carbosynth (Bratislava) tandis que les autres, LNDFH II, LNFP V, LNFP VI, LNT, LNnT et LSTa auprès de Elicityl (Crolles, France). L'eau ultrapure de resistivité 18.2 M Ω .cm a été obtenue grâce à un système de purification HP Select (Purite France, eau Lormont, France). Le méthanol (UHPLC grade) a été fourni par VWR Chemicals (Fontenay sous Bois, France) et la solution de calibration ESI-L Low Concentration Tuning Mix (G1969-85000) par Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Le chlorure de potassium (KCl) a été acheté auprès de Merck (Darmstadt, Germany) et le phosphate de calcium (Ca₃(PO₄)₂) auprès de Rhône-Poulenc (France).

Toutes les expériences IM-MS ont été menées sur l'instrument timsTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Ridgeway et al., 2018) par infusion directe à un débit de 3 μ L.min⁻¹. Les ions sont générés en mode d'ionisation ESI negative et positive avec un *dry gas*, *capillary temperature* et *nebulizer gas* à 3.0 L.min⁻¹, 250 °C and 0.3 bar, respectivement. Le *end plate offset* est maintenu à 500V et le voltage du spray d'électronébulisation à - 4500V et + 3500V en mode d'ionisation ESI positive et négative, respectivement. Pour l'analyseur TIMS, le *Funnel 1 RF*, *Funnel 2 RF* et le *deflection delta* sont fixés à 260 Vpp, 250 Vpp et +/- 80V (ionisation ESI positive/négative), respectivement. Pour éviter la saturation du TIMS, l'ICC (ion charge control) a été fixé à 1.5 Mio. Les spectres de masse ont été acquis sur une gamme de m/z de 100-1650 avec un transfer time de 80 μ s et un pre-pulse storage de 5 μ s. Les mobilités réduites (1/K₀) sont collectées en mode IM-MS global sur la gamme de mobilités réduites 0.55-1.90 V.s.cm⁻² avec une vitesse de scan de 9.52 Hz et en mode IM-MS ciblé, sur des gammes de mobilité beaucoup plus restreintes (de largeurs de 0.10 à 0.35 V.s.cm⁻² selon l'espèce ciblée) avec des vitesses de scan allant de 2 à 5Hz. La calibration en m/z (mode enhanced quadratics) et en mobilités réduites (mode linéaire) se fait à partir de la solution de calibration ESI-L Low Concentration Tuning Mix. L'ensemble des paramètres sont contrôlés via le logiciel otof Control (Bruker Daltonics) et les données acquises sont traitées avec Data Analysis 5.3 (Bruker Daltonics).

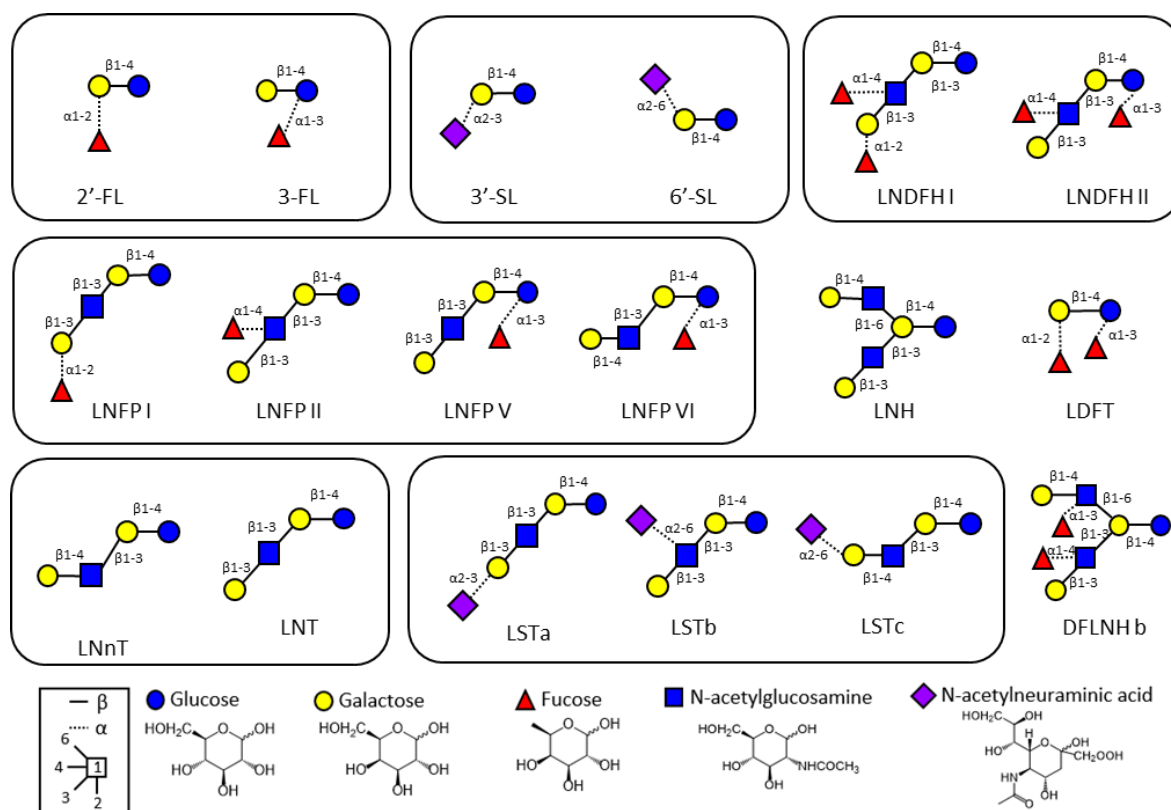


Figure II-2B.1. Représentation graphique des HMOs étudiés, selon la nomenclature symbolique des glycans définie par (Neelamegham et al., 2019)

Des analyses globales ont tout d'abord été menées de manière systématique sur les dix-huit HMOs en étudiant les mêmes espèces que dans notre étude préliminaire soit en ionisation ESI positive, les ions $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+Ca]^{2+}$ et en ionisation négative, les ions $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ et $[M+HCOO]^-$. Ces analyses, ont été réalisées en triplicat et les spectres de mobilité extraits pour chaque espèce ionique des composés isomères non étudiés dans l'étude préliminaire peuvent être retrouvés en **Figure II-2B.7** ainsi que les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ en ionisation ESI positive et négative de tous les HMOs dans les **Tableaux II-2B.4** et **5**. Tout comme pour notre étude préliminaire, les mesures de $^{TIMS}CCS_{N_2}$ présentent une bonne répétabilité avec des valeurs $RSD < 0.5\%$ entre les différentes séries d'analyse.

Nous avons, également, comparé nos valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ avec celles de l'étude préliminaire et avons trouvé de faible biais ($< 0.5\%$) entre les mesures ce qui correspond au RSD maximal annoncé pour des mesures répétées (voir **partie expérimentale** de la **section II-2A**). Nous avons, également, comparé nos valeurs à celles des travaux publiés de (Zheng et al., 2017a) et (May et al., 2014) (voir **Tableau II-2B.1**) et avons observé des écarts faibles i.e. $\Delta CCS\% < 2\%$ (tolérance admise pour des comparaisons entre différents laboratoires et différents instruments (Paglia and Astarita, 2017 ; Paglia et al., 2015)).

Tableau II-2B.1. Comparaison des valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ pour les espèces $[M+Na]^+$ et $[M-H]^-$ détectées en ionisation ESI positive and négative, respectivement avec les valeurs publiées de (Zheng et al., 2017a) et (May et al., 2014). Il est à noter que les valeurs publiées ont été obtenues sur une cellule de mobilité de type tube de dérive DTIMS.

	[M+Na] ⁺				
	$^{TIMS}CCS_{N_2}$	$^{DTIMS}CCS_{N_2}$ (Zheng)	$\Delta CCS\%$	$^{DTIMS}CCS_{N_2}$ (May)	$\Delta CCS\%$
LNDFH I - pic a	292.9	x		290.6	-0.8%
LNDFH I - pic b	299.4	x		304.2	1.6%
LNDFH II	292.8	x		291.2	-0.5%
LNFP I	274.6	274.9	0.1%	276.1	0.5%
LNFP II	267.3	269.0	0.6%	271.1	1.4%
LNT	240.1	239.2	-0.4%	x	
LNT	240.5	240.6	0.0%	x	
LNH	298.8	301.6	0.9%	x	

	[M-H] ⁻				
	$^{TIMS}CCS_{N_2}$	$^{DTIMS}CCS_{N_2}$ (Zheng)	$\Delta CCS\%$	$^{DTIMS}CCS_{N_2}$ (May)	$\Delta CCS\%$
LNFP I	273.6	275.9	0.8%	x	
LNFP II	271.5	274.3	1.0%	x	
LNT	240.9	240.9	0.0%	x	
LNT	255.2	254.7	-0.2%	x	

Nous nous sommes également intéressés lors de cette seconde étude, aux adduits $[M+K]^+$ comme autre forme pour la caractérisation des HMOs. Sur de nombreux spectres de mobilité pour l'ion $[M+K]^+$, deux groupes de pics à des mobilités distinctes ont pu être observés. Nous nous sommes alors interrogés sur la possibilité de la présence de deux formes ioniques isobares $[M+K]^+$ et $[M-H+Ca]^+$ pour un spectre de mobilité donné. Ces deux formes ioniques présentent, en effet, une faible différence en m/z d'environ 0.01u. Or, notre analyseur à temps de vol présente une résolution insuffisante (aux alentours de 40 000) pour distinguer ces espèces isobares (pour lesquelles une résolution supérieure à 80 000 serait nécessaire avec $\Delta m \approx 0.01u$ à m/z 800). Ainsi, les deux formes ioniques isobares semblent être séparées par mobilité ionique (voir **Figure II-2B.2 et 8**) mais la résolution de notre spectromètre de masse n'est pas suffisante pour obtenir des spectres de mobilité extraits distincts montrant ici une limitation de l'instrumentation TIMS-TOF. Le couplage de la cellule TIMS avec un spectromètre de masse FTICR permettrait de contrer cette limitation (Benigni et al., 2015, 2017, 2018; Benigni and Fernandez-Lima 2016; Ridgeway et al., 2016; Tose et al., 2018). Cependant, ce couplage est compliqué en raison de la vitesse d'acquisition spectrale plus lente du FTICR par rapport au TOF (voir **chapitre I, partie 3.2**).

Afin de caractériser au mieux les HMOs étudiés, nous avons voulu annoter chaque pic de mobilité comme une forme ionique $[M+K]^+$ ou $[M-H+Ca]^+$. Pour ce faire, le spectre de masse de chaque pic du spectre de mobilité a été extrait puis le m/z ainsi que le massif isotopique expérimentaux ont été comparés aux valeurs et massifs isotopiques théoriques des espèces $[M+K]^+$ et $[M-H+Ca]^+$. En effet, le pic isotopique $M+2u$ est deux fois plus élevé pour les adduits $[M+K]^+$ par rapport aux adduits $[M-H+Ca]^+$ à cause de l'isotope ^{42}K qui présente une abondance relative de 4%. L'annotation a également été validée par des expériences menées dans les mêmes conditions où l'ajout de KCl ou de $Ca_3(PO_4)_2$ a été opéré, permettant de favoriser la formation de $[M+K]^+$ ou de $[M-H+Ca]^+$, respectivement et de confirmer l'annotation des pics de mobilités (voir **Figure II-2B.2**). L'ensemble des spectres de mobilité extraits pour les ions isobares $[M+K]^+/[M-H+Ca]^+$ avec annotation des différents pics de mobilité peut être retrouvé dans la **Figure II-2B.8**.

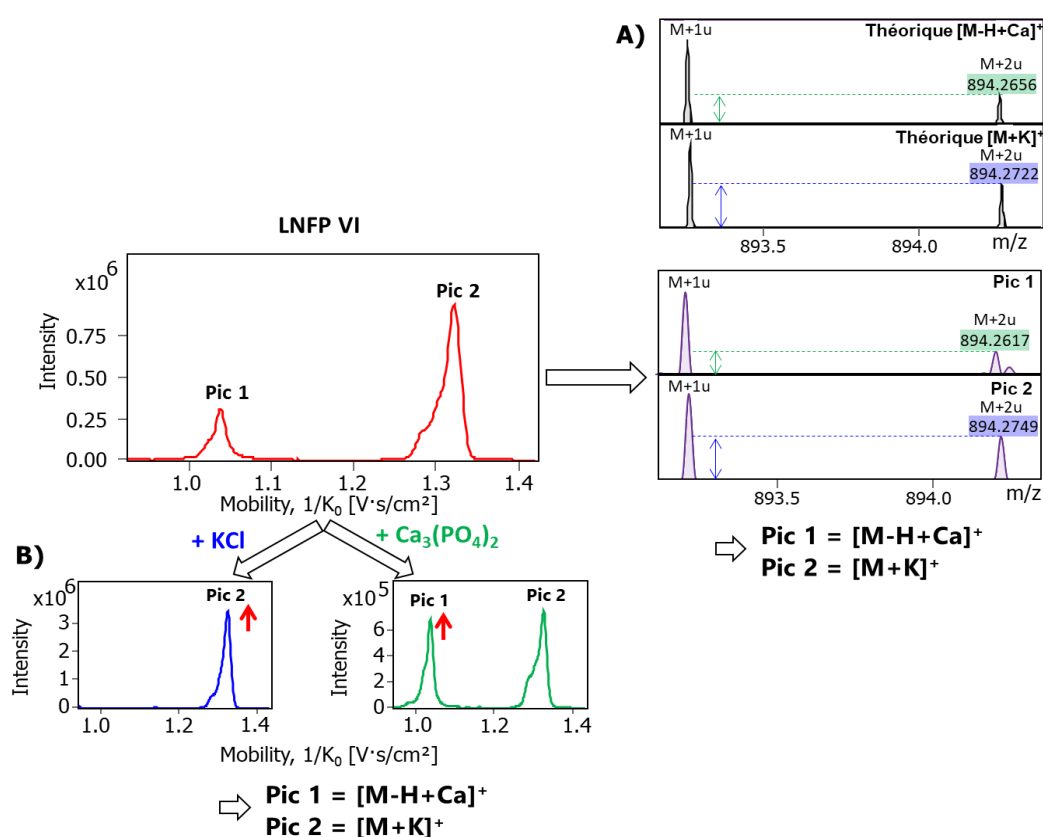


Figure II-2B.2. Annotation des pics de mobilités observés sur le spectre de mobilité de LNFPII VI ($5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) extrait à m/z 892 correspondant au m/z des espèces isobares $[M+K]^+$ et $[M-H+Ca]^+$. Afin de déterminer la composition de chaque pic de mobilité, l'écart par rapport aux masses précises et les différences dans les massifs isotopiques théoriques de $[M+K]^+$ et $[M-H+Ca]^+$ sont comparés (panneau A). L'ajout du sel KCl ou $Ca_3(PO_4)_2$ ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) aux différents HMOs ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) a également été réalisé afin de confirmer l'annotation (panneau B).

A la suite de l'ensemble de ces mesures, la capacité du TIMS-TOF à séparer les groupes d'isomères a été évaluée en reportant les $\Delta\text{CCS}\%$ entre les isomères considérés (voir **Tableau II-2B.2**). Grâce à nos études précédentes (Delvaux et al., 2020a, 2021b), nous avons pu déterminer des critères d'efficacité de séparation par mobilité de notre instrument en fonction des écarts entre deux pics de mobilités mesurés. Ainsi, deux composés présentant un $\Delta\text{CCS}\% > 3.5\%$ peuvent être séparés à la ligne de base en mode IM-MS global tandis que la séparation des composés ayant un $\Delta\text{CCS}\%$ compris entre 1.5% et 3.5% nécessite une analyse IM-MS mode ciblé (mode ultra, voir **Annexe 1**). Les composés avec $1\% < \Delta\text{CCS}\% < 1.5\%$ ne peuvent être distingués que par une analyse IM-MS ciblée.

Dans ces conditions, seuls les composés LNT/LNnt sous forme $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}-\text{H}]^-$ peuvent être séparés en mode IM-MS global. En revanche, la distinction des isomères de ce couple ainsi que des couples 2'FL/3FL et LNDFH I/II avec ce mode de résolution moyenne est possible pour leur forme $[\text{M}+\text{Cl}]^-$. Une séparation partielle en mode global peut également être obtenue pour les composés LNDFH I et II en tant qu'ions adduits $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $[\text{M}+\text{K}]^+ / [\text{M}-\text{H}+\text{Ca}]^+$ (voir **Figure II-2B.7**). Globalement, les HMOs présentent une grande similarité structurale et en conséquence, il est difficile de les séparer par mobilité avec des résolutions modérées d'environ 50-80. De fait, seul l'accès à des instruments plus résolutifs tels que le TIMS (en mode ciblé) (Delvaux et al., 2021b; Przybylski and Bonnet, 2021; Wei et al., 2020), le TWIMS cyclique (Ropartz et al., 2019; Ujma et al., 2019) ou encore le SLIM (Nagy et al., 2018) permettent une séparation efficace de ces composés isomères.

Tableau II-2B.2. Evaluation de la séparation en mobilité des différents groupes d'isomères étudiés. L'écart entre les pics de mobilité ($\Delta\text{CCS}\%$) est reporté ici entre les pics majoritaires des différents composés (un pic est considéré comme majoritaire dès lors qu'il présente une abondance relative $> 80\%$).

HMOs	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$[\text{M}+\text{Ca}]^{2+}$	$[\text{M}+\text{K}]^+ \& [\text{M}-\text{H}+\text{Ca}]^+$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$[\text{M}+\text{Cl}]^-$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$
2'-FL 3-FL	n.d.	1,5%	2,0% ^{(a)(b)}	2,2%	<1,0% ^(MS/MS)	1,7% ^(MS/MS)	1,2% ^(MS/MS)
3'-SL 6'-SL	3,8% ^(b)	1,0%	0,0%	0,7%	1,0% ^(MS/MS)	n.d.	n.d.
LNDFH I LNDFH II	<1,0%	2,2%	0,3%	2,0%	0,1% ^(MS/MS)	1,8%	1,2% ^(MS/MS)
LNFP I LNFP II LNFP V LNFP VI	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0% ^(MS/MS)	<1,0% ^(MS/MS)	<1,0% ^(MS/MS)
LNnT LNT	3,9% ^(a)	0,2%	0,1%	1,8%	5,8% ^{(a) (MS/MS)}	2,1%	1,8% ^(MS/MS)
LSTa LSTb LSTc	<1,0%	<3,5%	<1,0%	<3,5%	<3,5%	n.d.	n.d.

	Pics séparés en mode IM-MS global ($\Delta\text{CCS}\% > 3.5\%$)
	Pics séparés en mode IM-MS ciblé mais qui peuvent être distingués en mode IM-MS global
	Pics uniquement séparés en mode ciblé ($1\% < \Delta\text{CCS}\% < 3.5\%$)
	Pics non séparés ($\Delta\text{CCS}\% < 1\%$), quelque soit le mode d'acquisitions du TIMS-TOF
(MS/MS)	Distinction par des expériences MS/MS grâce à la détection d'ions diagnostiques
(a)	Un ou plusieurs pics minoritaires qui se superposent avec le pic majoritaire
(b)	réponse en masse élevée d'un isomère (6'SL pour $[\text{M}+\text{H}]^+$ et 3FL pour $[\text{M}+\text{Ca}]^{2+}$ qui empêche la détection de son isomère (3'SL pour $[\text{M}+\text{H}]^+$ et 2'FL pour $[\text{M}+\text{Ca}]^{2+}$) en mélange
n.d.	Ion non détecté

Afin de favoriser la séparation de nos composés, des analyses en mode IM-MS ciblé ont été réalisées. Comme discuté dans notre étude préliminaire, un « dédoublement » de pics de mobilité peut être observé en conditions de résolution accrue, les nouveaux pics apparaissant avec ce mode d'analyse sont indiqués dans les **Tableaux II-2B.4 et 5**. Grâce à ces deux modes d'acquisition, l'ensemble des groupes de HMOs isomères peut être séparés mis à part les composés LNFP I, II, V et VI (**Figure II-2B.4**). La **Figure II-2B.3** présente notamment la distinction en mode ciblé des trois composés isomères LSTa, b et c sous formes d'adduits $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $[\text{M}+\text{K}]^+ / [\text{M}-\text{H}+\text{Ca}]^+$.

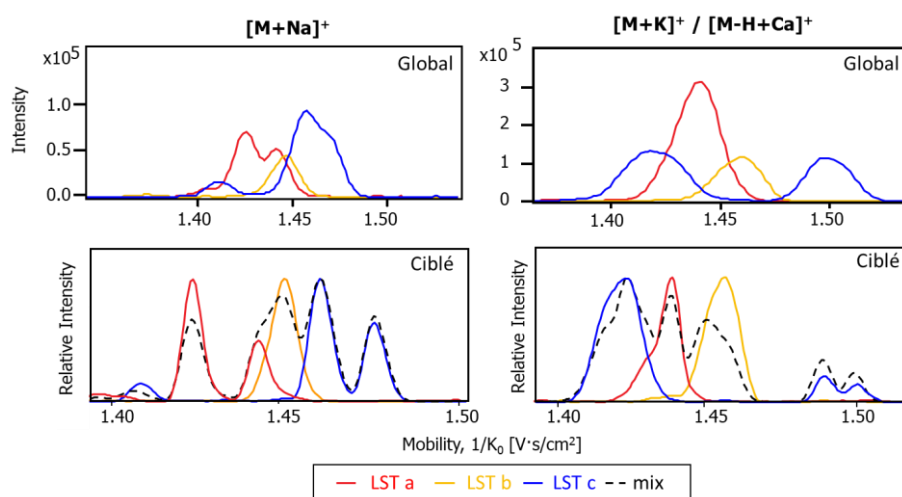


Figure II-2B.3. Séparation par mobilité ionique en utilisant le mode IM-MS ciblé pour les composés LST a, b et c sous forme $[M+Na]^+$ ($1/K_0 = 1.37 - 1.47 \text{ V.s.cm}^{-2}$) et $[M+K]^+ / [M-H+Ca]^+$ ($1/K_0 = 1.37 - 1.52 \text{ V.s.cm}^{-2}$) analysés seuls ou en mélange à la concentration de $5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Il faut noter que les pics des spectres de mobilité extraits en mode IM-MS ciblé ont été normalisés afin de comparer les différents échantillons (seuls ou en mélange).

Il est à noter que bien que les quatre isomères LNFP I, II, V et VI ne peuvent être tous séparés les uns des autres en une seule analyse IM-MS même en utilisant le mode IM-MS ciblé de la cellule TIMS, des distinctions entre différents sous-groupes d'isomères peuvent, néanmoins, être obtenues. En mode ciblé, le LNFP I et le LNFP V sont, en effet, séparés sous forme d'adduit $[M+Na]^+$ des isomères LNFP II et VI qui apparaissent confondus sous un même pic (voir **Figure II-2B.4A**). Bien que ces deux isomères, LNFP II et VI, ne puissent être séparés en ionisation positive, leur séparation est possible en mode ESI négatif (voir l'exemple de l'ion $[M-H]^-$ en **Figure II-2B.4B**). Cependant, le pic de LNFP VI est confondu avec celui de LNFP V dans ces conditions ESI négatives, alors que LNFP II est partiellement séparé de LNFP I. Ainsi, en combinant des analyses ciblées en ESI négatif et positif, il est possible de caractériser tous les LNFPs présents dans un mélange.

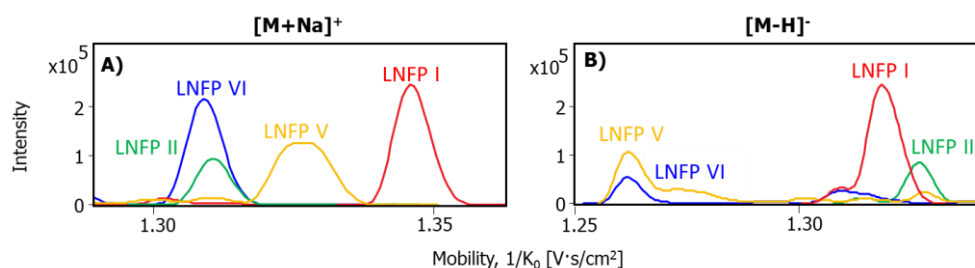


Figure II-2B.4. Exemple de séparation en mobilité en utilisant le mode IM-MS ciblé pour les composés LNFP I, LNFP II, LNFP V et LNFP VI sous forme $[M+Na]^+$ ($1/K_0 = 1.25 - 1.42 \text{ V.s.cm}^{-2}$) et $[M-H]^-$ ($1/K_0 = 1.20 - 1.45 \text{ V.s.cm}^{-2}$). Les concentrations finales de $5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ont été utilisées en mode ESI positif pour tous les LNFPs et respectivement à $0.5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, $2.5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, $2.5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ et $1 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ pour LNFP I, II, V et VI en mode ESI négatif.

Nous nous sommes également intéressés aux spectres de fragmentation des différents HMOs comme moyen supplémentaire pour la distinction des composés isomères. Les spectres MS/MS en mode d'ionisation positive se sont globalement avérés similaires entre les composés isomères. En revanche, en mode d'ionisation négative des ions diagnostiques de chaque isomère permettent la distinction des différents HMOs (Mank et al., 2018) (voir **Tableau II-2B.2** et le récapitulatif des spectres MS/MS dans la **Figure II-2B.9**). A titre d'illustration, les isomères LNFP I, II, V et VI ont, ainsi, pu être caractérisés grâce à leurs spectres de fragmentations présentant des ions diagnostiques pour chacun, malgré une séparation partielle par mobilité ionique de ces composés. La figure **II-2B.5** présente l'exemple de l'espèce ionique $[M-H]^-$ pour laquelle chaque isomère présente des voies de fragmentations différentes (voir panneau A) permettant ainsi leur distinction une fois en mélange (voir panneau B).

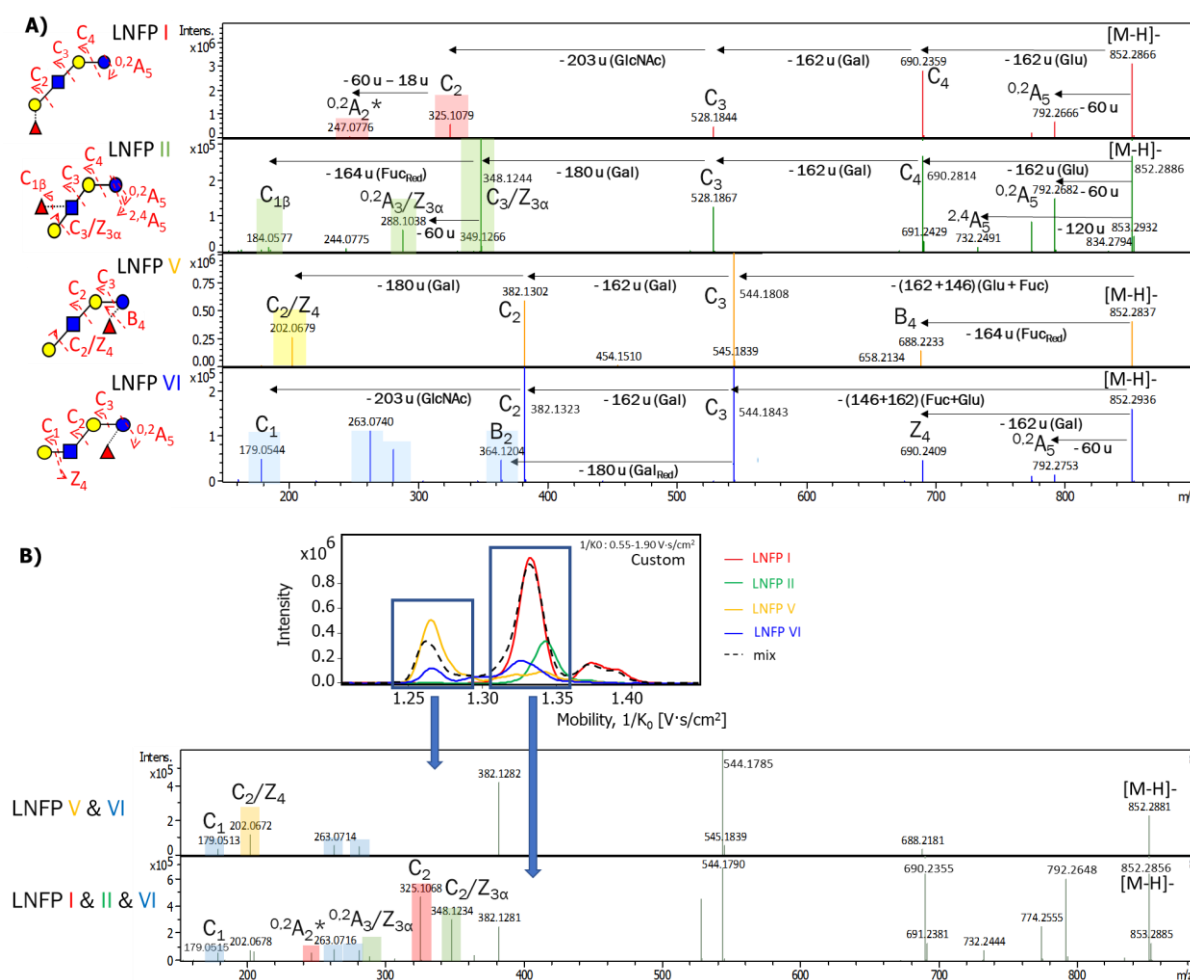
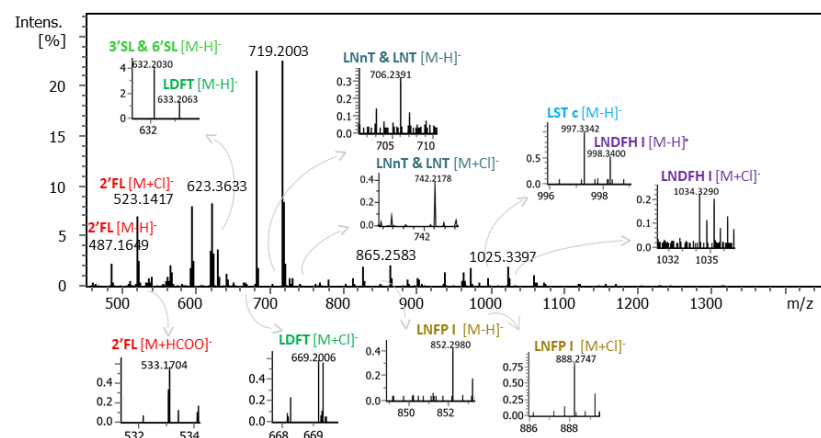


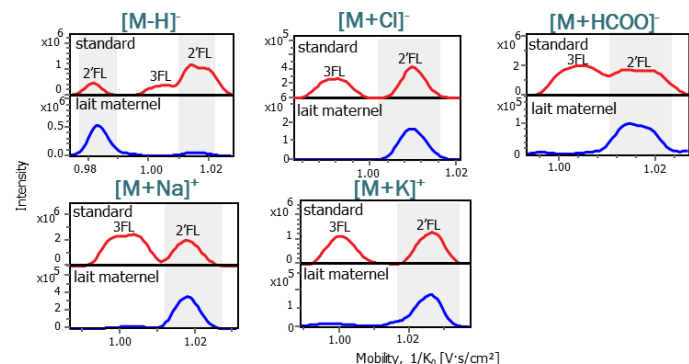
Figure II-2B.5. Analyse IM-MS/MS en mode ESI négatif des isomères LNFP I, II, V et VI à la concentration de 2.5 ng.μL⁻¹ sous forme $[M-H]^-$. A) Spectres MS/MS pour chaque isomère (mode CID, 18eV) et B) Spectres MS/MS acquis des ions $[M-H]^-$ pour le mélange des 4 isomères, extraits sur deux zones de mobilités réduites où se trouvent plusieurs isomères, les ions diagnostiques des spectres MS/MS résultants permettent de distinguer chaque isomère présent dans le mélange.

Enfin, nous avons voulu appliquer nos approches développées pour la séparation des HMOs isomères, à la détection et caractérisation d'un maximum d'HMOs dans une matrice complexe. Pour ce faire, l'échantillon de lait maternel analysé précédemment dans notre étude préliminaire, a de nouveau, été étudié. Cet échantillon a été uniquement délipidé (voir **partie expérimentale** dans la **section II-2A**) puis dilué 2000 fois dans un mélange H₂O/MeOH (50/50 v/v) pour une analyse en mode ESI négatif et H₂O/MeOH (50/50 v/v) + 0.1% acide formique en mode ESI positif. Afin de caractériser les HMOs présents dans l'échantillon étudié (voir **Tableau II-2B.3**), des analyses en mode IM-MS ciblé en ionisation ESI positive et négative ainsi que des analyses IM-MS/MS en mode de détection IM-MS global en ionisation ESI négative, ont été réalisées, dans les mêmes conditions et le même jour, pour les mélanges de composés standards ainsi que pour le lait maternel. Les spectres de mobilité extraits et les spectres de fragmentation des HMOs standards en mélange et dans le lait maternel ont été mis en vis-à-vis afin de comparer les réponses de chaque isomère dans les deux échantillons. La **Figure II-2B.6** résume la démarche suivie pour la caractérisation du couple d'isomères 2'FL/3FL : les analyses en mode IM-MS ciblé ainsi que les spectres de fragmentation en mode IM-MS global permettent de mettre en évidence que seul l'isomère 2'FL est contenu (ou tout du moins est présent en plus grande abondance vis-à-vis de son isomère) dans l'échantillon étudié. En utilisant, la même méthodologie, nous avons pu déterminer que cet échantillon contiendrait des quantités relatives plus importantes des isomères LNDFH I, LNFP I, LST c et 2'FL par rapport à leurs isomères respectifs (voir **Figure II-2B.10**). La présence majoritaire de 2'FL et de LNFP I ainsi que la détection de LDFT (voir **Figure II-2B.6**) indiquerait que l'échantillon de lait maternel étudié est de type sécréteur (voir **Tableau II-2.1**). Il est à noter que nos conclusions sont basées sur les signaux en mobilité ionique et/ou la présence d'ions diagnostiques présents sur les spectres MS/MS. En revanche, l'absence des autres HMOs peut toujours être imputée à des phénomènes de suppression d'ions et des effets matrice. Néanmoins, les expériences menées avec ajout de standards de 3FL et LNFP V dans l'échantillon de lait maternel dans l'étude préliminaire (voir **Figure S5** du **chapitre II-2A**) ont démontré qu'il est possible de détecter leur signaux en IM-MS dans la matrice de lait dans nos conditions (par exemple avec notre échantillon dilué 2000 fois) et que l'absence de leurs signaux dans l'échantillon de lait maternel indiquerait bien que ces composés isomères sont en quantités relatives plus faibles et non détectables. Néanmoins, d'autres études devront être menées pour évaluer la limite de détection des différents HMOs ainsi que la possibilité d'estimer leurs quantités relatives dans un mélange de standards et dans le lait maternel.

A) Spectre de masse en ionisation ESI négative du lait maternel



B) Analyse IM-MS en mode ciblé pour les isomères 2'FL/3FL



C) Spectres MS/MS extraits en mode IM-MS global des isomères 2'FL/3FL

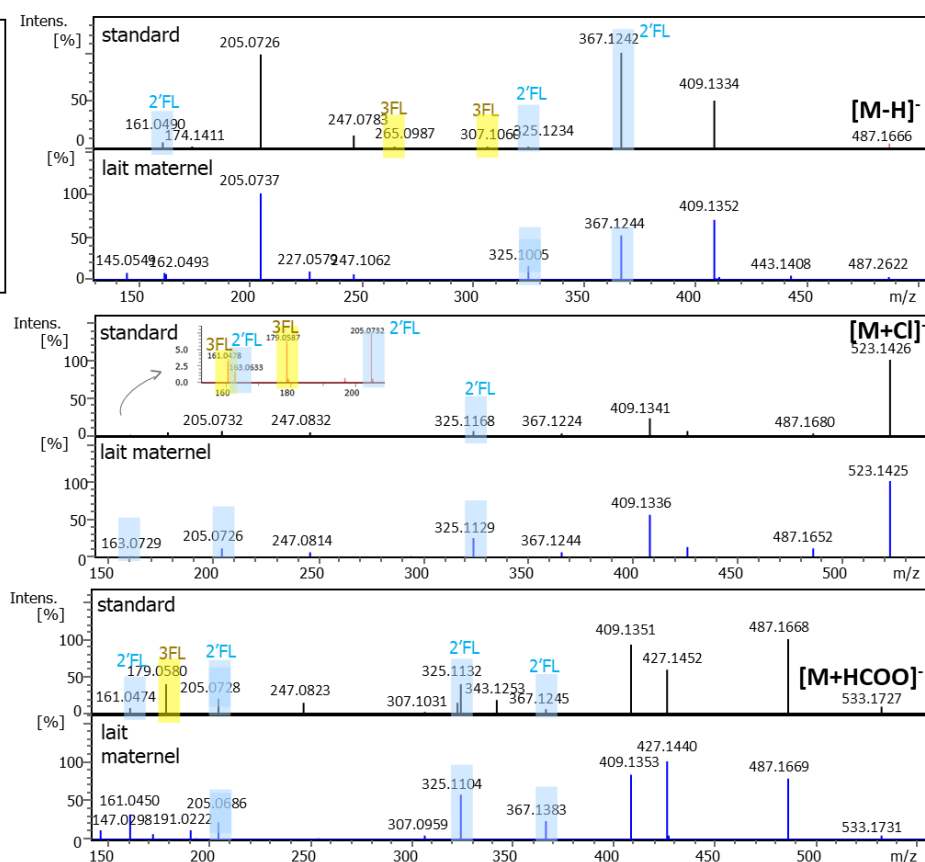


Figure II-2B.6. A) Spectre de masse de l'échantillon de lait maternel (dilution 1:2000 dans MeOH/H₂O) analysé par IM-MS en ionisation ESI négative. Les ions des HMOs détectés dans l'échantillon sont annotés sur le spectre de masse. B) Spectres de mobilité extraits pour plusieurs espèces ioniques des isomères 2'FL/3FL analysés en mode IM-MS ciblé à partir du mélange des composés standards (concentration finale de 1 ng.μL⁻¹) et de l'échantillon de lait maternel délipidé (dilution 1:2000) en ionisation ESI négative (gamme 1/K₀ = 0.97-1.03 V.s.cm⁻²) et positive (gamme 1/K₀ = 0.98-1.04 V.s.cm⁻²). C) Spectres MS/MS avec acquisition en mode IM-MS global des composés 2'FL/3FL à partir du mélange de composés standards (concentration finale de 1 ng.μL⁻¹) et de l'échantillon de lait maternel délipidé en tant que [M-H]⁻ (CID, 30 eV), [M+Cl]⁻ (25 eV) et [M+HCOO]⁻ (20 eV).

Tableau II-2B.3. Récapitulatif des HMOs détectés dans l'échantillon de lait maternel selon le type d'analyse directe de l'échantillon mené, HRMS seule ou IM-MS(/MS)

HMO	Exact mass	MS	IM-MS/MS
2'-FL	488,1741	✓	✓
3-FL			×
LDFT	634,2320	✓	✓
3'-SL	655,1936	✓	✓
6'-SL			✓
LNnT	707,2484	✓	✓
LNT			✓
LNFP I	853,3063	✓	✓
LNFP II			×
LNFP V			×
LNFP VI			×
LSTa	998,3438	✓	×
LSTb			×
LSTc			✓
LNDFH I	999,3642	✓	✓
LNDFH II			×
LNH	1072,3806	×	×
DFLNH b	1364,4964	×	×

De manière générale, nous avons étudié ici dix-huit composés HMOs représentant une grande majorité des HMOs présents dans le lait maternel grâce à une analyse directe et à haut débit par TIMS-TOF. Nous avons déterminé les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ de l'ensemble de ces espèces sous différentes formes ioniques afin de favoriser leurs caractérisations dans un échantillon complexe tel que le lait maternel. Grâce aux développements de méthodes analytiques pour une analyse en mobilité à haute résolution (mode IM-MS ciblé) et/ou pour une analyse de type IM-MS/MS (en mode IM-MS global), chacun des groupes isomères étudiés a pu être résolu. Ces développements ont ainsi permis d'annoter les HMOs d'un échantillon de lait maternel ayant subi une préparation d'échantillon limitée et ce avec une analyse directe de quelques minutes (voir **Tableau II-2.3**).

Tableau II-2B.4. Valeurs ^{TIMS}CCS_{N2} des HMOs standards pour différentes espèces ioniques détectées en ionisation positive

HMO	mode	[M+H] ⁺					[M+Na] ⁺		[M+Ca] ²⁺				[M-H+Ca] ⁺ et/ou [M+K] ⁺				
2'FL	g	n.d.					210.2		262.1(53%)	269.4(100%)	278.3(43%)	287.9(82%)	211.7				
	c						=						=				
3FL	g	n.d.					207.0		263.5				158,6(23%)	165,7(19%)	202,5(23%)	207,1(100%)	
	c						=						202.0(29%)		206.6*(100%)	208.6*(70%)	
3'SL	g	223.6(100%)		231.9(60%)			231.7		279,2(100%)		296,7(14%)		229,5(37%)		236,5(100%)		
	c						=						=				
6SL	g	232.2					234,1(100%)		239,7(14%)		279,3(100%)		296,3(12%)		177,5(13%)		234,9(100%)
	c						=								230.7*(35%)	234.2(100%)	
LNDFH I	g	276,8(33%)	287,1(100%)	292,6(58%)	302,6(41%)	308,5(37%)	292,9(16%)	299,4(100%)	335.8				293,6(19%)		299,7(100%)		
	c						=						293.4(12%)		298.8(100%)		
LNDFH II	g	285,2(86%)		300,2(100%)		307,1(40%)	292.8		334.8				284,9(20%)	293,9(100%)	300,5(12%)		
	c						=						=				
LNFP I	g	272,4(14%)		282,6(100%)			274.6		312.7				262,7(16%)		273,7(100%)		
	c						=						=				
LNFP II	g	267,1(100%)		275,7(34%)	280,4(40%)	287,2(29%)	267.3		310.7				270(100%)		274,8(58%)		
	c	266.5*(59%)	271.1*(21%)	274.3(58%)	280.8(81%)	286.4(98%)	=										
LNFP V	g	268.0					260,7(27%)		270,6(100%)		307.4				263,8(37%)	270,9(100%)	274,8(85%)
	c	267.1*(100%)	270.6*(31%)	275.2*(32%)	278.4*(12%)		260.0(22%)	266.6*(12%)	269.9(100%)								
LNFP VI	g	260,1(25%)		274,3(100%)	283,1(37%)		261,4(21%)		309.1				212.2(20%)		270,0(100%)		
	c	259.7(11%)	267.3*(11%)	273.7(53%)	279.4*(38%)	282.2*(100%)	260.0*(13%)	261.8*(13%)	266.4(100%)								
LNnT	g	250,9(15%)		259,4(100%)			240.5		288.5				195,0(24%)		244.2(100%)		
	c						=								243.1*(100%) 246.0*(76%)		
LNT	g	249.6					240.1		288.7				199,5(21%)	240,0(23%)	248,6(100%)	252,6(73%)	
	c						=						=				
LST a	g	281,4(62%)	286,6(75%)	291,7(36%)	303,6(100%)		290,4(100%)	294,1(67%)	327,2(100%)		419,9(15%)		292.7				
	c						=						=				
LST b	g	283.4					277,6(12%)		295,1(100%)		329.6				296.6		
	c						=						=				
LST c	g	281.1					232,8(36%)	287,1(37%)	298,4(100%)		331.2				288.3(13%)	304.1(100%)	
	c							286.3(15%)	296.8*(100%)	300.0*(64%)					=		
LDFT	g	236.9					232.4(>80%)		234.9(>80%)		289.7				178,4(50%)	186,0(23%)	234,0(100%)
LNH	g	287,7(40%)	292,2(100%)	304,7(76%)	319,8(24%)		298.8		350.2				232,4(40%)	239,7(47%)	299,6(100%)		
DFLNH b	g	332.2(>80%)		337.2(>80%)			340.6		378.3				341,7(100%) 350,2(14%)				

Valeur surlignée en gras	Pic de mobilité majoritaire
=	Valeur CCS en mode IM-MS ciblé identique à celle en mode IM-MS global
n.d.	Ion non détecté
*	Nouveau(x) pic(s) apparus en mode ciblé
g	Mode IM-MS global
c	Mode IM-MS ciblé

Tableau II-2B.5. Valeurs ^{TIMS}CCS_{N2} des HMOs standards pour différentes espèces ioniques détectées en ionisation négative

HMO	mode	[M-H] ⁻					[M+Cl] ⁻		[M+HCOO] ⁻			
2FL	g	202,3(>50%)	209,1(>50%)	223,2(<50%)	268,9(<50%)	275,0(<50%)	207.4		208.7			
	c	=					=		=			
3FL	g	201,7(<50%)	207,0(>50%)	268,4(<50%)	274,5(<50%)		203.8		206.2			
	c	=					=		=			
3SL	g	240.2					n.d.		n.d.			
	c											
6SL	g	237.7					n.d.		n.d.			
	c											
LNDFH I	g	298,4(100%)					298.4		302.1			
	c	=					=		=			
LNDFH II	g	287,1(35%)			298,2(100%)		293,1(100%)	301,8(17%)	294,0(83%)	298,6(100%)		
	c	=					=		293,1(62%)	297,6*(100%)	301,1*(20%)	
LNFP I	g	273.6					277.6		281.2			
	c	=					=		276,7*(100%)	281,0*(15%)		
LNFP II	g	271.5					278.9		278,5(100%)	280,7(76%)		
	c	268,1*(17%)			271,1*(100%)		=		=			
LNFP V	g	259,6(100%)		275,0(18%)				272.4	268,6(100%)	271,6(94%)		
	c	255,4*(100%)	258,5*(32%)	265,2*(13%)	268,3*(11%)	271,5*(26%)	266,1*(88%)	268,9*(100%)	275,1*(11%)	264,6*(100%)	268,7*(54%)	270,7*(50%)
LNFP VI	g	259,0(100%)		271,1(86%)			265,8(23%)	271,2(100%)	270.8			
	c	=					262,3(21%)	267,2*(100%)	269,7*(83%)	=		
LNnT	g	240,1(41%)		255,2(100%)		301,1(11%)	246.0		252.5			
	c	=					=		252,2*(75%)	253,9*(100%)		
LNT	g	240.9					251.3		257.1			
	c											
LST a	g	205,3(58%)	245,2(18%)	283,6(100%)	287,2(97%)		n.d.		n.d.			
	c											
LST b	g	195,1(<50%)	222,3(>50%)	284,2(>50%)	291,2(<50%)	295,7(>50%)	n.d.		n.d.			
	c											
LST c	g	280,3(100%)					n.d.		n.d.			
	c											
LDFT	g	226,9(100%)			232,8(49%)		283,8(22%)	230.3		232.4		
LNH	g	287,3(11%)			329,0(100%)		314,5(100%)		318.0			
DFLNH b	g	192,5(18%)	208,9(26%)	224,2(43%)	246,1(40%)	354,0(100%)	211,2(26%)	348,8(100%)	266,7(30%)	346,2(100%)		

Valeur surlignée en gras	Pic de mobilité majoritaire
=	Valeur CCS en mode IM-MS ciblé identique à celle en mode IM-MS global
n.d.	Ion non détecté
*	Nouveau(x) pic(s) apparus en mode ciblé
g	Mode IM-MS global
c	Mode IM-MS ciblé

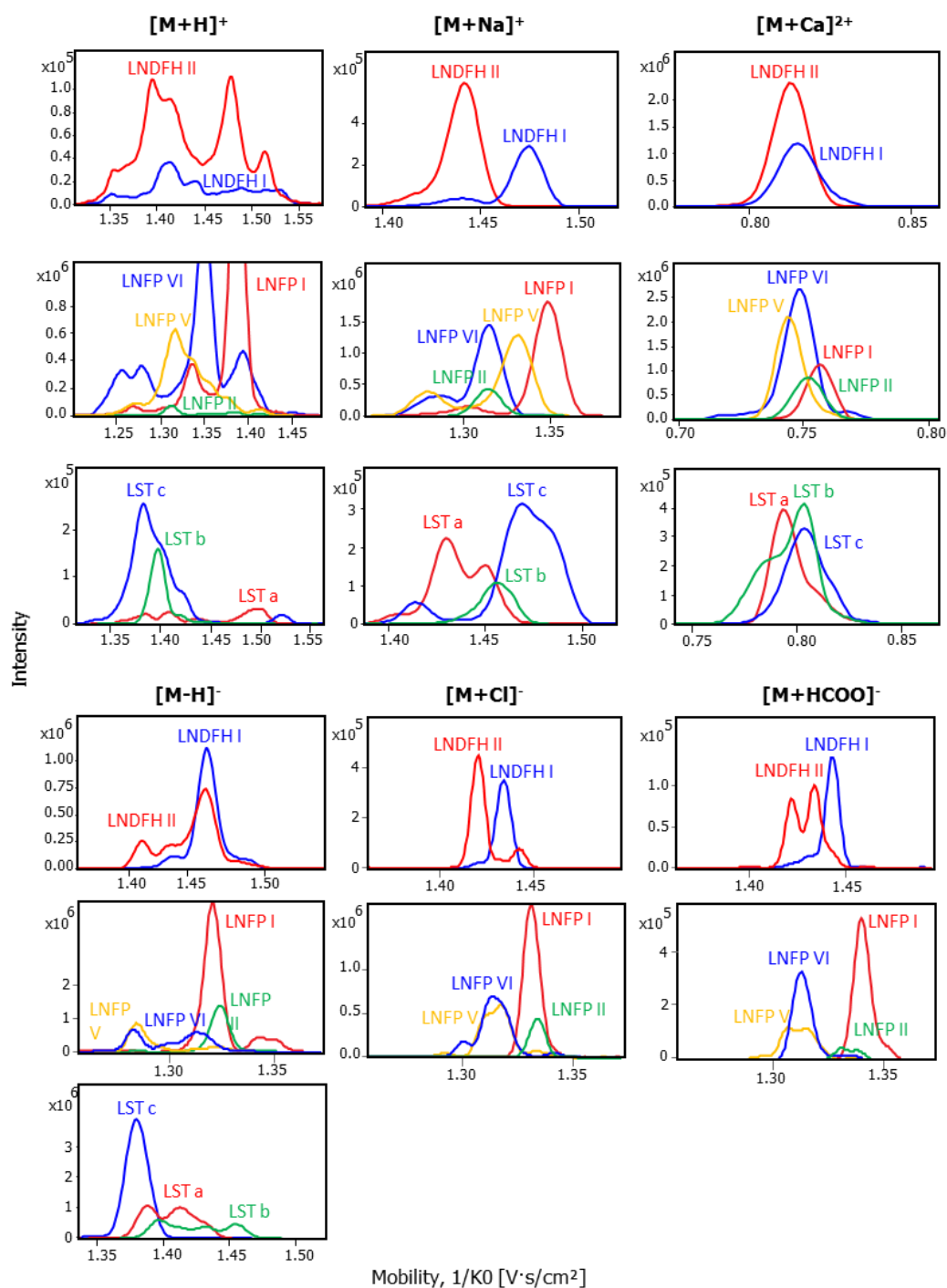


Figure II-2B.7. Spectres de mobilité extraits pour les formes ionique des groupes d'isomères HMOs détectés en mode IM-MS global en mode ESI positive et négative. Chaque HMO standard est analysé en solution pure à la concentration finale de $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

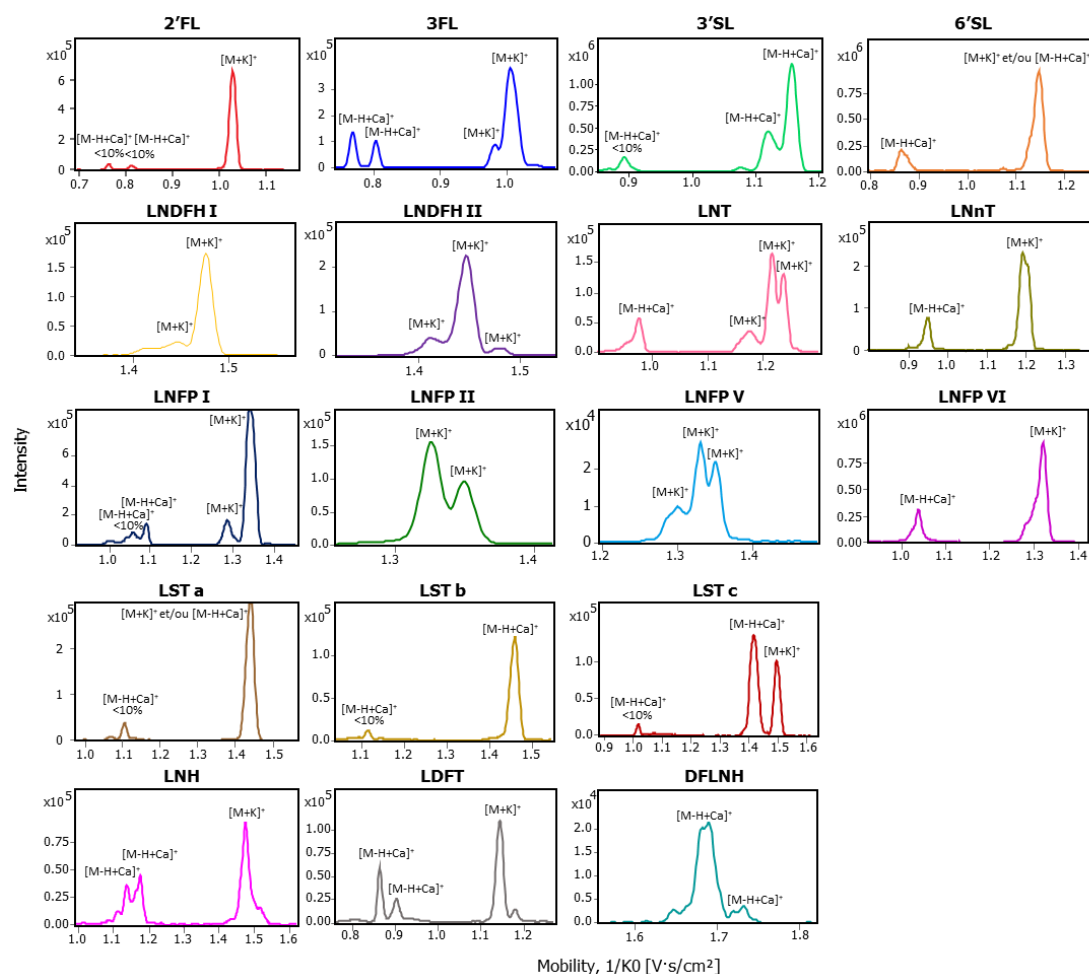
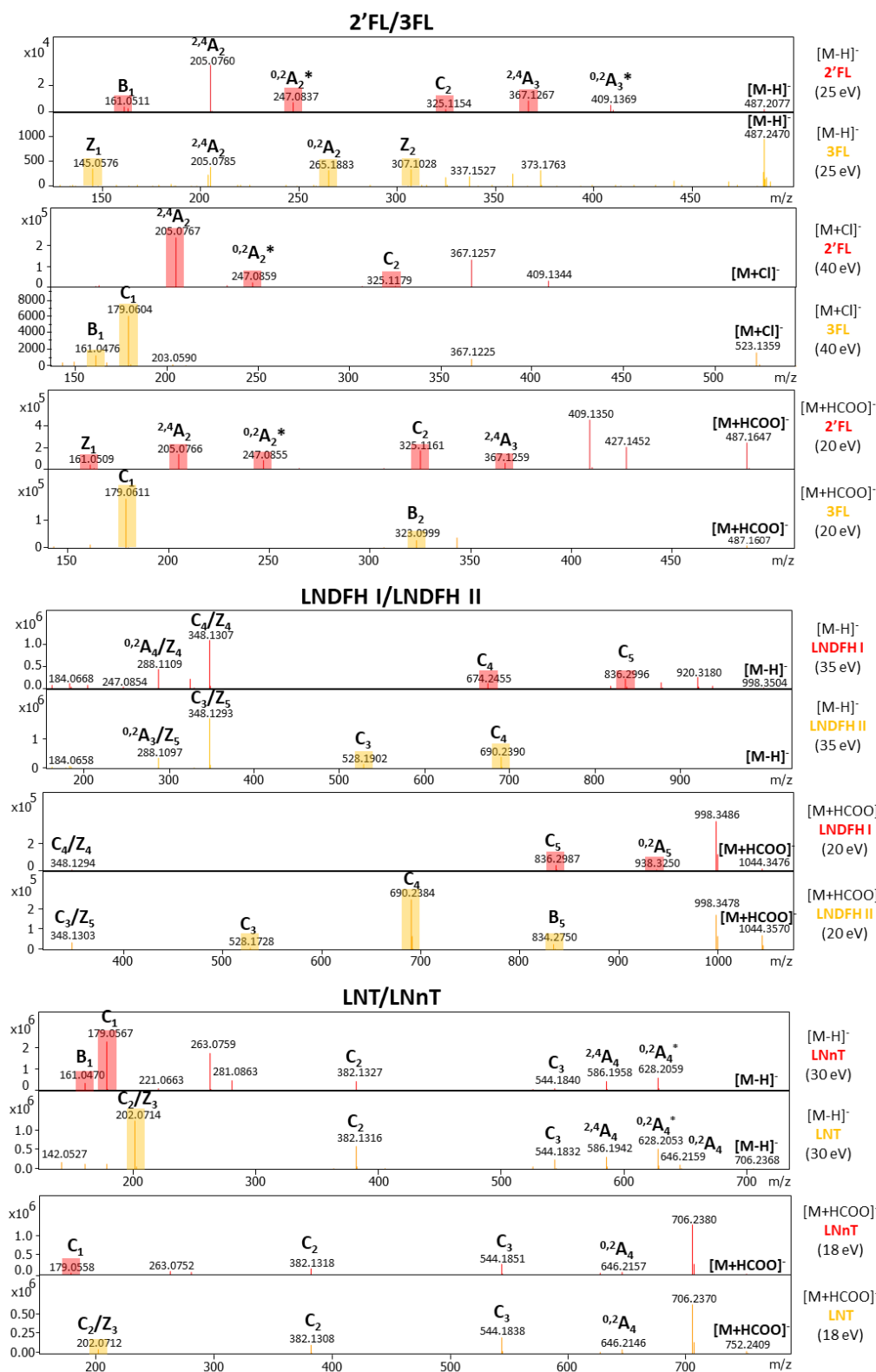


Figure II-2B.8. Spectres de mobilité extraits au m/z correspondant aux espèces ioniques isobares $[M+K]^+$ et $[M-H+Ca]^+$ des 18 HMOs étudiés (concentration finale de $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) en utilisant le mode IM-MS global. Chacun des pics de mobilité est annoté avec l'espèce ionique isobare correspondante après analyse des spectres de masse extraits et des expériences IM-MS avec ajout de sels.



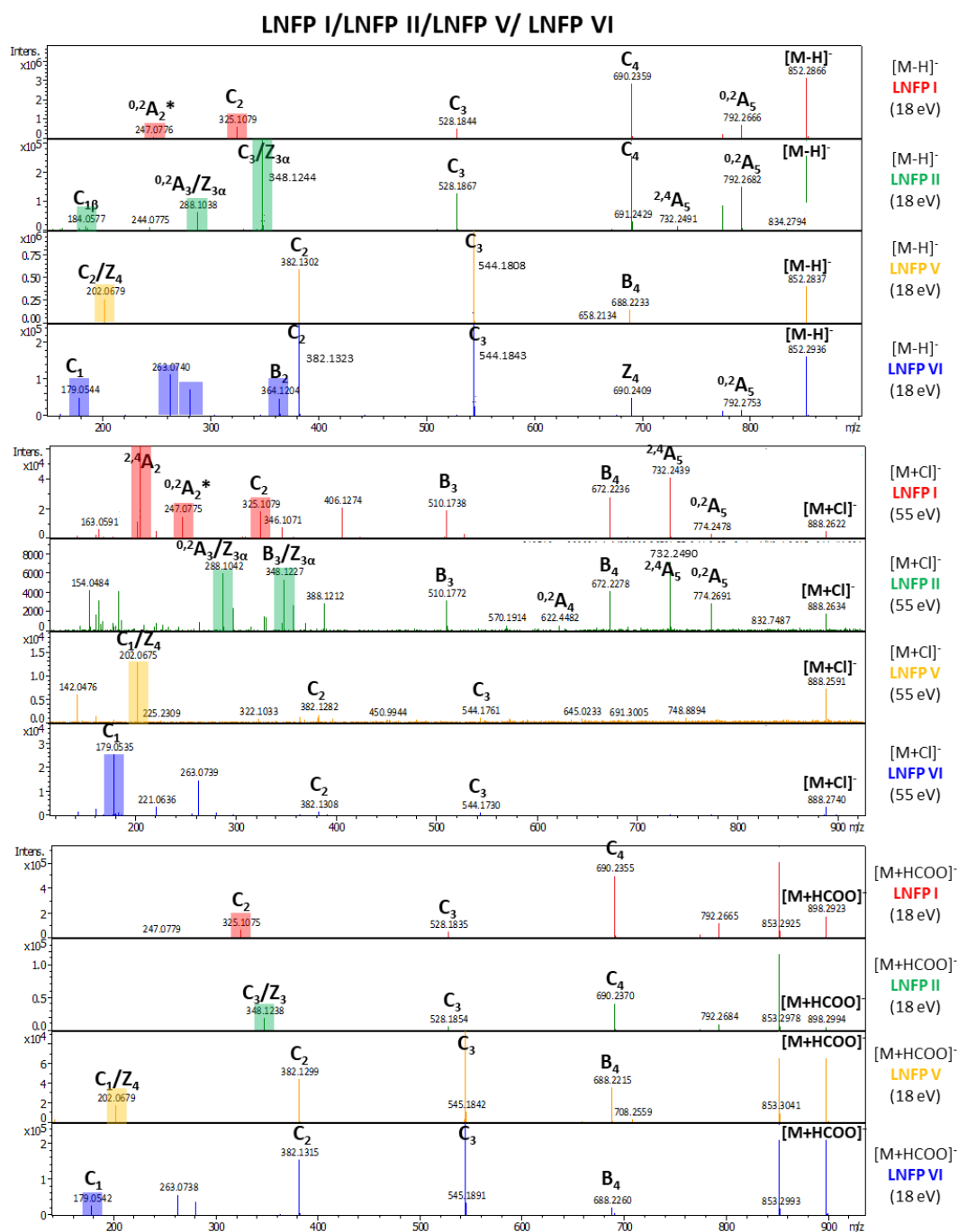


Figure II-2B.9. Spectres MS/MS des HMO isomères en mode ESI négatif menant à la detection des ions diagnostiques pour la distinction des isomères. Chaque composé a été analysé seul à $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ par IM-MS/MS en mode de detection IM-MS global.

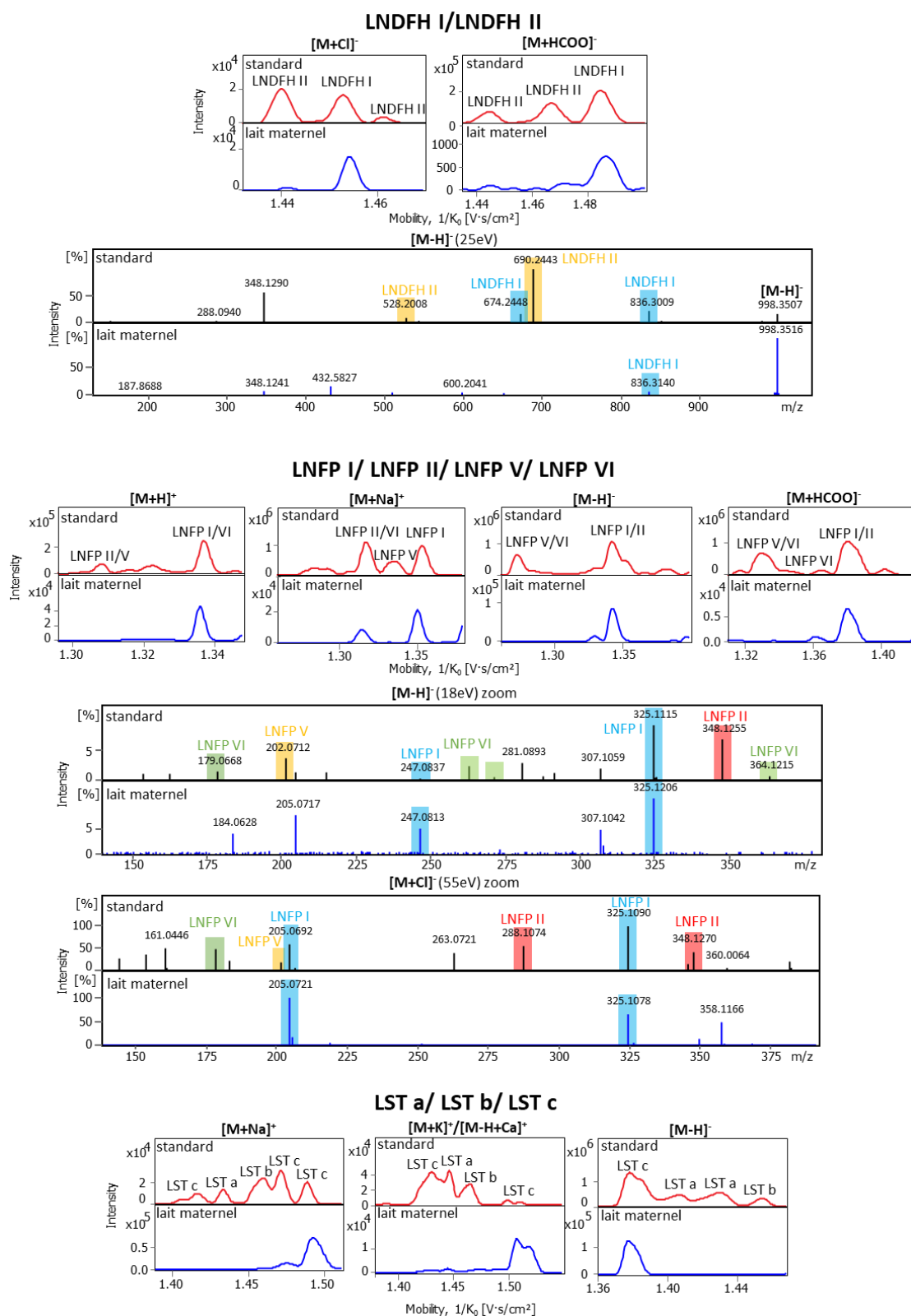


Figure II-2B.10. Caractérisation des isomères présents dans le lait maternel grâce à des analyses en mode IM-MS ciblé et des analyses IM-MS/MS en mode IM-MS global. Chaque spectre de mobilité extrait à partir du lait délipidé (dilution 1 :2000) est comparé avec celui du groupe d'isomères en mélange (concentration finale 1 ng.µL-1). Grâce à la séparation en mobilité et à la détection des ions diagnostiques des spectres MS/MS, il apparaît que LNDFH I, LNFP I et LSTc sont présents en quantité plus importante par rapport à leurs isomères respectifs.

Conclusion du Chapitre II

Dans ce chapitre, nous avons montré le potentiel du couplage IM-MS, tout particulièrement avec une cellule de mobilité TIMS pour la distinction et caractérisation de composés isomères en matrice complexe. De manière générale, nous avons tout d'abord mené des analyses de composés standards avec une large gamme de mobilité et une résolution en mobilité moyenne. Dans ces conditions, une empreinte globale de l'échantillon est acquise mais seul un nombre limité d'isomères ont pu être séparés (voir $E_2\beta$ -3G/ $E_2\beta$ -17G sous forme $[M-H]^-$ ou LNT/LNnT sous forme $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$), soulignant la difficulté d'analyser des composés de structures similaires. Néanmoins, nous avons montré que, cas échéant, différentes solutions analytiques peuvent être déployées afin de distinguer un groupe d'isomères : des analyses ciblées à plus haute résolution peuvent être menées (voir les exemples des isomères LSTa, b et c sous forme $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+/[M-H+Ca]^+$), la formation d'ions adduits peut, dans certains cas, améliorer la séparation par mobilité ionique (voir forme $[M+Li]^+$ pour les composés $E_2\alpha/E_2\beta$ et 2-MeO- $E_2\beta$ /4-MeO- $E_2\beta$) ou encore via la formation de multimères non-covalents (voir forme $[2M+Li]^+$ pour les composés $E_2\alpha/E_2\beta$ et 2-MeO- $E_2\beta$ /4-MeO- $E_2\beta$). Enfin, des analyses de type IM-MS/MS ont permis d'obtenir des ions fragments diagnostiques (voir 2'FL/3FL; LNDFH I/II; LNT/LNnT et LNFP I/II/V/VI en ionisation négative) facilitant la distinction d'isomères non ou partiellement séparés par mobilité ionique. Toutes ces solutions analytiques ont été employées avec succès dans l'analyse d'échantillons biologiques (urine humaine et lait maternel) à l'exception de la formation de dimères qui reste défavorisée en matrice complexe. Nous avons, notamment, pu attribuer à l'échantillon de lait maternel étudié le statut sécréteur grâce à une analyse directe IM-MS de quelques minutes.

En conclusion, l'analyse directe à l'aide de l'instrument TIMS-TOF apparaît être très prometteuse pour la caractérisation de matrices biologiques à haut débit et à large échelle, sans préparation d'échantillon extensive.

CHAPITRE III: CRÉATION D'UNE BASE DE DONNÉES DE VALEURS CCS DE MÉTABOLITES STANDARDS

Introduction du Chapitre III

Dans ce dernier chapitre, nous présentons la création d'une base de données de valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ produite à partir de métabolites standards afin d'améliorer l'étape d'identification du workflow métabolomique. En effet, cette étape reste un des principaux freins aux études métabolomiques (Viant et al., 2017). Cela est dû au fait que le métabolome est composé d'un grand nombre de composés et que peu d'entre eux sont disponibles commercialement en tant que standards, limitant la production de données spectrales de référence utilisées pour l'identification structurale. Les études métabolomiques utilisant l'approche IM-MS étant, de plus, en cours d'expansion depuis seulement quelques années, il existe à l'heure actuelle peu de bases de données de valeurs CCS pour les métabolites (voir **Tableau 2** du **Chapitre I**).

Ces travaux sont reportés sous forme d'un article intitulé « *Creation of a Collisional Cross Section database to support metabolomics analyses and identification using trapped ion mobility-mass spectrometry* » en cours de rédaction.

Dans cet article, nous présentons la création d'une base de données de valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ à partir d'analyse de plusieurs centaines de métabolites standards, disponibles dans le cadre de l'infrastructure nationale MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010). Plus de 1300 valeurs expérimentales pour environ 400 métabolites ont ainsi été acquises au cours de mes travaux. Cependant, certains composés standards n'ont pu être détectés. Cela peut s'expliquer par la discrimination de la cellule TIMS pour le piègeage des ions de basse masse mais également par la possible dégradation de certains composés. Cette étude a également porté sur l'évaluation de la répétabilité des mesures afin de déterminer le biais à prendre en compte lors de l'étape d'identification basée sur le paramètre $^{TIMS}CCS_{N_2}$. Nous avons, également, comparé notre librairie à trois autres bases de données publiées afin d'évaluer la corrélation de nos valeurs avec celles reportées et acquises sur des instruments utilisant des cellules de mobilité de type DTIMS. Enfin, une étude de principe a été menée sur un échantillon d'urine humaine analysé par FIA-IM-MS et LC/IM-MS. Ces deux approches nous permettent de comparer et déterminer les avantages respectifs de l'annotation d'un même échantillon dans le cadre d'une technique à haut débit et d'une méthode multidimensionnelle.

Creation of a Collisional Cross Section database to support metabolomics analyses and identification using trapped ion mobility-mass spectrometry

Aurélie Delvaux¹, Estelle Rathahao-Paris^{1,2*} Sandra Alves^{1*}

¹ Sorbonne Université, Faculté des Sciences et de l'Ingénierie, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), 75005 Paris, France

² Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Abstract

Ion mobility-mass spectrometry (IM-MS) has been proposed as a new approach for metabolomics studies as a high throughput and large scale technique, having the main advantage of enhanced isomer separation. Nevertheless despite great promise, the use of such platform for untargeted analyses remains compromise due to the identification step. Indeed, accurate and confident metabolite identification remains one of the major bottleneck in metabolomics studies. Here, the first metabolomics database using TIMS technology is reported. It is comprised of more than 1300 ^{TIMS}CCS_{N2} values for about 400 metabolites with more than 1000 ^{TIMS}CCS_{N2} not published yet. A very good correlation with other published ^{DTIMS}CCS_{N2} values was obtained with few exceptions. Comparison with other DTIMS databases suggested that the most important criterion for interplatform studies should be the calibration procedure and the choice of calibrant ions. Indeed, better repeatability was obtained between calibration-dependant databases regardless of the mobility cell geometry. Alternatively, the resolving power of TIMS should allow to distinguish a large part (72%) of studied isomeric metabolites demonstrating the importance of ion mobility separation capacity to provide an accurate molecular descriptor. Finally, a proof of principle for the use of ^{TIMS}CCS_{N2} as a molecular descriptor in metabolomics was performed by comparing the direct FIA-IM-MS and LC/IM-MS analyses of a human urine sample.

1. Introduction

Metabolomics is considered to be at the end of the omics trilogy: genomics, proteomics and metabolomics and the best representation of the phenotype expression as the metabolites synthesized by cells represent a direct signature of the cellular state. Hence, studying the metabolome, the collection of small size compounds (< 1kDa) produced from a biological system can be a very effective way to detect physiological and pathological changes (Fiehn, 2002; Patti et al., 2012). Two main approaches can be conducted, untargeted analyses allow to produce metabolomic fingerprints (Alonso et al., 2015) while targeted analyses follow a particular set of metabolites (or a family of compounds) which can be indicator of a certain condition/disease. In untargeted studies, a significant number of metabolites with a large chemical diversity and range of concentrations, need to be detected and characterized, which in itself represent an analytical challenge. In addition, analyses are conducted in complex samples

that are generally not heavily prepped to avoid information' losses which then lead to large and complex data sets. Finally, the detection of the low-concentration compounds can be hindered by other major components. To handle these limitations, mass spectrometry (MS) approaches are widely employed due to their high sensitivity and their potential for structural characterization using tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments. In addition, Liquid Chromatography (LC) is often coupled with MS to enhance the metabolome coverage (Haggarty and Burgess, 2017). Nevertheless, LC/MS approach can be time-consuming and restrained for isobaric and isomeric compounds that often coelute, despite various chromatographic conditions such as different type of columns or solvents.

In this context, ion mobility - mass spectrometry (IM-MS) appears as a promising and complementary technique as it allows the enhanced separation of isomer compounds without adding analysis time, nor sample preparation (Wu et al., 2020). Ion mobility cells can also be implemented in classical LC/MS platform to produce multidimensional data to increase the number of detected signals (D'atri et al., 2018; Morrison and Clowers, 2019). In ion mobility devices, the generated ions (after the ionization step) are separated accordingly to their size, shape and charge in the gaseous phase under the applications of an electric field. Over the past decades, IM-MS has been extensively employed for the analysis of small size molecules (Laphtorn et al., 2013b) in various fields such as forensics, environmental sciences, pharmaceuticals or detection of chemical warfare agents and explosives (Eiceman et al., 2013) leading to its increasing interest for metabolomics studies (Burnum-Johnson et al., 2019; Delvaux et al., 2021a; Levy et al., 2019; Luo et al., 2020). In addition, recent IM-MS instruments with innovative cell geometries, such as drift tube ion mobility spectrometry (DTIMS), traveling wave ion mobility spectrometry (TWIMS) or trapped ion mobility spectrometry (TIMS) are nowadays commercially available, increasing their availability to the metabolomics community (Dodds and Baker, 2019).

Alternatively, the accurate and confident metabolite identification remains one of the main bottleneck of untargeted metabolomics analyses (Viant et al., 2017). Indeed, the Metabolomics Standards Initiative (MSI) recommend matching data with at least two orthogonal features from authentic standards analyzed under identical experimental conditions to identify a compound at the first level of confidence (Sumner et al., 2007). Using conventional LC/MS analyses, the identification of coeluting compounds may not be straightforward. Furthermore, most metabolite isomers present similar fragmentation patterns which prevent their full identification. Faced with such limitations, adding an ion mobility cell enables to obtain a supplementary feature of identification which is the Collisional Cross Section (CCS). This

criterion is of great interest, as it is considered as a physicochemical property of the ionized compounds, only depending on experimental parameters such as the nature of the drift gas. Therefore, it is not instrument-dependent and could be compared between instruments and laboratories. In addition, CCS measurements were shown to be highly repeatable and much less impacted by matrix effects, in comparison to retention times (Paglia et al., 2014), making CCS a molecular descriptor which could potentially be standardized among analytical platforms.

In that respect, more and more CCS databases have been recently shared within the metabolomics community to help the metabolite identification. Some databases were created for certain class of compounds such as steroids (Hernández-Mesa et al., 2018), drugs and drug like compounds (Hines et al., 2017b) or wastewater products (Stephan et al., 2016a). Several metabolomics databases have also been produced including primary, secondary metabolites as well as xenobiotics. We can cite here the recently established databases by (Zhou et al., 2016), (Zheng et al., 2017a) and (Nichols et al., 2018) using a DTIMS instrumentation and the ones from (Paglia et al., 2014) and (Nye et al., 2019) built with TWIMS instruments. To the best of our knowledge, only one TIMS database has been reported by (Schroeder et al., 2019) for natural plant compounds. In addition to the creation of CCS libraries, efforts were made to provide CCS compendiums (May et al., 2017; Picache et al., 2019; Zhou et al., 2020) such as the proposal of AllCCS which include more than 5000 experimental CCS and also millions of calculated CCS values using machine learning method (Zhou et al., 2020). But, a critical interrogation remains about the data inter-operability of these databases and compendiums. Indeed, interplatform studies demonstrated that despite overall good agreement, more or less large bias between mobility measurements can be observed both when using different instruments of the same geometry (Hernández-Mesa et al., 2020; Paglia et al., 2014; Stow et al., 2017) as well as from different ion mobility technologies (Hinnekamp et al., 2018).

We report here the creation of the first TIMS database for metabolomics. More than 400 metabolite standards were analyzed under both positive and negative ion modes. Different ionic species were considered leading to the acquisition of 1348 experimental $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values. A very high repeatability with an averaged relative standard deviation (RSD) of 0.15% was observed across batch analyses. We, also, compared our experimental values to published $^{DTIMS}CCS_{N_2}$ values. This comparison enlightened the inherent difficulty within shared CCS databases linked to the necessary calibration step of secondary ion mobility techniques such as TIMS and TWIMS (Gabelica et al., 2019). Alternatively, the isomer separation capacity of the TIMS-TOF instrument was evaluated through CCS difference calculations (as $\Delta CCS\%$) from all CCS measurements. 72% of the isomer pairs found in our database can be separated with

the TIMS cell thanks to its flexible resolution ability showing the advantages of such high-resolution ion mobility cell for isomer distinction. Finally, the potential of $^{TIMS}CCS_{N_2}$ as a molecular descriptor in untargeted metabolomic analyses was checked on a human urine sample as a complex matrix. 56 metabolites could be identified through the combination of CCS and m/z criteria in the human urine sample analyzed by direct FIA-IM-MS method, using positive and negative ESI ion mode.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Ultrapure water (specific resistance of $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) was produced by a Select HP water purification system (Purite France eau, Lormont, France). Methanol (UHPLC grade) was purchased from VWR Chemicals (Fontenay sous Bois, France), formic acid from Sigma (St Louis, MO, USA). ESI-L Low Concentration Tuning Mix (G1969-85000) was obtained from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Authentic standards were acquired from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) as well as Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) and Steraloids (Newport, USA) for the lipid compounds. They were analyzed at $0.5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

2.2. Ion mobility – mass spectrometry

All experiments were performed through flow injection analysis (FIA) using an Elute HPLC instrument with no chromatographic column. $20 \mu\text{L}$ of sample is injected at a $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ flow rate. Each FIA-IM-MS analysis are acquired during 3.5 min. Negative ion mode analyses were conducting with a mobile phase $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (50/50 v/v) and positive ion mode analyses with $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (50/50 v/v) + 0.1% AF.

The Elute HPLC instrument is connected to a trapped ion mobility spectrometer - quadrupole time-of-flight Bruker timsTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A detailed overview of the TIMS device and its operation of principle can be found elsewhere (Ridgeway et al., 2018). Ions are generated in positive and negative electrospray ionization modes. The capillary temperature of the ion source was maintained at 250°C , the dry gas was set at $6.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, and the nebulizer gas at 20 psi for both polarities. The end plate offset and the electrospray voltage were set at 500 V and 3500 V respectively. Nitrogen was used as spray and drift gas. TIMS inverse reduced mobility ($1/K_0$) were collected on the $0.45\text{-}1.80 \text{ V}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$ mobility range with a ramp time of 100 ms and a scanning rate of 9.43 Hz. A funnel 1 RF and a collision cell in of 250 Vpp and of $\pm 140 \text{ V}$ (positive/negative ion mode) were applied. To prevent TIMS saturation, the ion charge control (ICC) was set at 2 Mio. Mass spectra were acquired in the 50-

1050 m/z range with a transfer time of 65 μ s and a pre-pulse storage of 5 μ s. All the parameters are controlled through the otof Control software (Bruker Daltonics).

2.3. Calibration step

Ion mobility and m/z measurements were both externally calibrated using the ESI-L Low Concentration Tuning Mix solution in linear calibration mode before every batch analyses. In positive ion mode, three calibration points at m/z 322, m/z 622, and m/z 922 are used, characterized by reduced mobilities, $1/K_0$ of 0.736, 0.991 and 1.199 V.s.cm⁻², respectively. In negative mode, calibrant ions at m/z 302, m/z 602, and m/z 1034 are detected at $1/K_0$ of 0.669, 0.882 and 1.258 V.s.cm⁻², respectively. In addition, the tuning mix solution was co-injected during FIA-IM-MS analysis, to allow an internal recalibration during the data processing.

2.4. Standard batch analyses

Authentic standard pools were analyzed in mixes of 7 to 20 compounds, in triplicate batches in positive and negative ionization modes. The ion source was cleaned and the external calibration was conducted between every batch. All batch sequence started with the injection of blank sample followed by the injection of a quality control (QC) sample. Here, a mix of authentic standards was used as the QC sample: theobromine, trigonelline, hippuric acid, pseudouridine and desoxycorticosterone at 0.2 ng. μ L⁻¹ were employed in positive ionization mode and hippuric acid at 0.2 ng. μ L⁻¹, theobromine, trigonelline, pseudouridine and desoxycorticosterone at 2 ng. μ L⁻¹ in negative ionization mode. Repeated QC sample injections were used to check the repeatability of the CCS and m/z measurements and to look for eventual signal drifts as well as for potential clogging of the ionization source or memory effects. After this first injection of QC, blank and sample are alternated with the injection of the QC sample every 10 pools, i.e. every 20 analyses. The batch finishes with the injections of the QC sample and blank samples (see **Figure S1**).

2.5. Urine sample analyses

A urine sample was collected from a healthy volunteer and stored at -20°C until analysis. Then, it was centrifugated and the supernatant was diluted with H₂O/MeOH (50/50 v/v) to a 1:100 ratio for LC/IM-MS and 1:2000 for FIA-IM-MS analyses. Two other samples composed of the corresponding diluted urine spiked with one standard pool at 0.5 ng. μ L⁻¹ and 0.1 ng. μ L⁻¹ for, LC/IM-MS and FIA-IM-MS analyses respectively, were also prepared and analysed using the same conditions. FIA-IM-MS conditions were as described for standard pools (see above). LC/IM-MS was performed using C₁₈ chromatography conditions (column Intensity Solo 2 C18, 100 x 2.1 mm). Under these conditions, 20 μ L of urine sample was injected onto the column,

the elution was conducted with mobile phase A and B being H₂O/MeOH 95/5 (v/v) and MeOH, respectively and 0.1% of formic acid was added to each mobile phases in positive ion mode. The mobile phase flow rate was set at 50 μ L/min. The gradient was initially held at 100% A from 0 to 1 min, it was then increased to 5% A between 1 and 11 min, held at 5% until 14 min, decreased at 100% A in 1 min and kept in these conditions until 24 min.

2.6. Data treatment

Data were processed with DataAnalysis 5.3 (Bruker Daltonics) and/or Metaboscape 5.0 (Bruker Daltonics). Using Data Analysis software, mobilities and m/z were internally calibrated for every FIA analysis using at least 3 calibration points (from co-injected tuning mix solution during FIA-IM-MS analyses). The ionic species $[M+H]^+$, $[M-H_2O+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ and $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M-H_2O-H]^-$, $[M-CO_2-H]^-$ were considered for every authentic standard under positive and negative ion modes, respectively. The T-ReX 4D algorithm was, in parallel, used with Metaboscape software to analyze the triplicate measurements from standard pools. A relative intensity threshold of 100 counts and an EIC correlation of 0.8 were applied to generate a data matrix of features (m/z, CCS, intensity). Mass and mobility recalibration was performed for all analyses. If multiple mobility peaks are observed, they are all reported in the database. Similarly, FIA-IM-MS and LC/IM-MS analyses of urine samples were proceed using Metaboscape 5.0 (Bruker Daltonics) to extract a list of data features based on m/z, CCS and optionally RT. The same extraction parameters used for the standard pools were employed: T-ReX 4D algorithm with an intensity threshold of 100 counts, an EIC correlation of 0.8 and a mass and mobility recalibration performed. Compound annotation was performed using $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ and $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ ionic species in positive and negative ion mode, respectively with tolerances of 5 ppm, 0.5% and 2 min on the m/z, ^{TIMS}CCS_{N2} and RT, respectively.

3. Results and discussion

3.1. ^{TIMS}CCS_{N2} database

In the present study, 407 metabolite standards with masses ranging from 111 to 774 Da were analyzed by FIA-IM-MS from which a library of 1349 ^{TIMS}CCS_{N2} values ranging from 116 to 270 Å² were obtained. The ^{TIMS}CCS_{N2} library can be found in the supplementary information as **Table S1**. All metabolite standards were analyzed in triplicates on different days in positive and negative ion modes and average experimental ^{TIMS}CCS_{N2} values were measured for different ionic species (see experimental section). Indeed, contrary to conventional LC/MS

analyses, where adduct ions are usually post-processed eliminated as redundant signals to facilitate the complex data set treatment, during an identification step considering multiple ionic species, and thus multiple CCS values, is a great way to confirm a putative identification. Note that multiple peaks can be detected for a given specie which probably rely on multiple conformers and/or charged species with different charge location sites. Such phenomenon has been extensively reported, especially for oligosaccharides compounds (Nagy et al., 2018; Wei et al., 2020). But, multiple mobility signals can be useful for isomer distinction purposes (Delvaux et al., 2021b; Oranzi et al., 2019). For example, (Oranzi et al., 2019) reported the detection of open conformer of 25-hydroxyvitamin D3 which allows its separation from its epimer. Note that multiple ion structures, due to variable charge locations should only originate from ionization processes for a given structure (Gabelica and Marklund, 2018). In the present study, all mobility signals (even multiple mobility signals for a given specie) are kept in the final CCS database. Overall, our database contains 237 $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values for the $[M+H]^+$ form, 293 for $[M+Na]^+$, 116 for $[M+K]^+$, 150 for $[M-H_2O+H]^+$, 391 for $[M-H]^-$, 32 for $[M+Cl]^-$, 67 for $[M-CO_2-H]^-$ and 63 for $[M-H_2O-H]^-$, respectively. We can note that $[M-H]^-$ is the major ionic form observed in negative ESI mode (Schroeder et al., 2019). In contrast, the large number of $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values for positively-charged adduct ion species shows the importance to also report these values in the final database for an enhanced identification. The sugar family is, for example, mostly only detected as $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ (and $[M+Cl]^-$ in negative polarity) adduct ions and not as protonated species.

3.2. Reproducibility

The reproducibility of our experiments was evaluated using repeated QC sample injections along batch analyses (see experimental section). Those QC samples are composed of authentic standards. The intra-day batch reproducibility was evaluated from the $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values extracted from the QC samples considering each batch analysis at a time. Taking into account both the positive and negative ion modes, the average intra-day batch relative standard deviation (RSD) is 0.14% with a minimum at 0.05% and a maximum value at 0.34% (see **Figure 1**). The inter-day batch reproducibility was also evaluated considering all $^{TIMS}CCS_{N_2}$ extractions from the different batches. For the inter-day batch reproducibility an average RSD of 0.14% was determined with a minimum RSD of 0.08% and a maximum of 0.27%. Hence, RSD values are overall below 0.3% and more likely range around 0.15% which demonstrated the high precision of $^{TIMS}CCS_{N_2}$ measurements, facilitating the identification step based on CCS measurements. Such reproducibility is an important criterion as it allows to increase the level of confidence in

the identification step. In comparison, LC retention times usually present higher RSD values for batch analyses and, hence, lower reproducibility (Paglia et al., 2014).

A CCS data query tolerance much lower than the 2% of bias, value currently advised (Paglia et Astarita, 2017; Paglia et al., 2015), could then be applied, when using a home-built database. Otherwise, a data query of 2% should probably be retained as few interplatform studies reported a bias lower than 2% for most of the CCS measurements when using different operating mode on a same instrument (stepped field versus single field methods on DTIMS) (Stow et al., 2017), different instruments with the same cell geometry (Hernández-Mesa et al., 2020; Paglia et al., 2014) or different ion mobility instrumentation (DTIMS versus TWIMS) (Hinnekamp et al., 2018). However, unexpected larger bias (up to 6%) were also reported for some tested standard compounds (Hinnekamp et al., 2018).

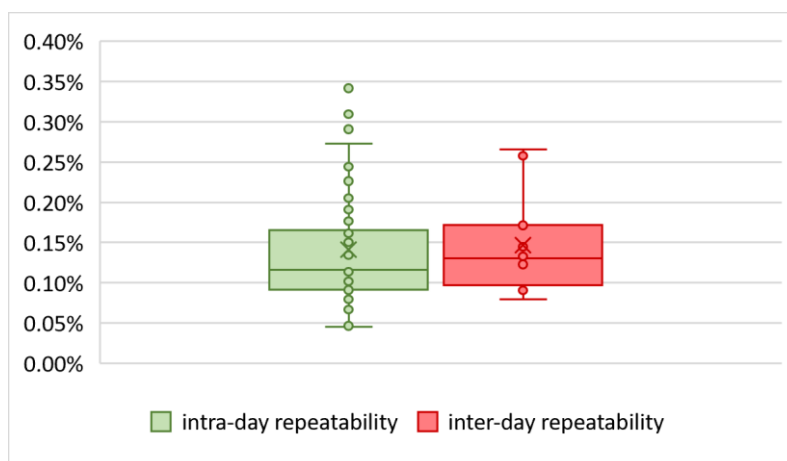


Figure 1: Evaluation of the intra and inter-day batch repeatability. QC samples are injected 8 times per batch and 7 and 5 CCS measurements are done in positive and negative ionization mode, respectively. Hence, the intra-day repeatability of one ion is evaluated as the RSD of the 8 CCS measurements for one batch and the inter-day as the RSD for all the CCS measurements of this ion (over 3 batch analyses).

It is worth noting that all measures where, here, conducted with a large mobility range presenting moderate resolving powers ranging from 50 to 80 using TIMS device. But the mobility separation resolving power can be changed on a TIMS device by modifying the scanning rate and the mobility range studied (Ridgeway et al., 2018). Hence, targeted analyses with higher resolving powers, up to 180, on smaller mobility detection ranges can also be performed and this type of analysis is highly interesting to separate isobar/isomer compounds with very close CCS values (see discussion below). Previous results demonstrate that the ion mobility detection mode do not influence the mobility measurement accuracy (Delvaux et al.,

2020a, 2021b) which means that targeted analyses could be conducted with this same high reproducibility.

3.3. Comparison of $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values with $^{DTIMS}CCS_{N_2}$ published data

We compared our $^{TIMS}CCS_{N_2}$ database to other published values : the experimental measurements from MetCCS (Zhou et al., 2016) and the databases from the Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) (Zheng et al., 2017a) and the Vanderbilt Institute of Chemical Biology (VIBC) using a multiple-field i.e. stepped-field mode (VIBC MF) and/or a single field mode (VIBC SF) (Nichols et al., 2018). They all used DTIMS instrument (Agilent DTIM-QTOF-MS 6560, Agilent Technologies, Santa Clara) but $^{DTIMS}CCS_{N_2}$ measurements, were either acquired with a calibrant-independent method (stepped-field or multiple field mode) allegedly providing the most precise measurements as $^{DTIMS}CCS_{N_2}$ values are directly calculated from fundamental low field ion mobility equation and/or using single-field experiments which means that the $^{DTIMS}CCS_{N_2}$ values were obtained using a calibration step. Interestingly, both databases based on stepped-field method used the same calibration solution, which is the ESI-L Low Concentration Tuning Mix (see experimental section). Nevertheless, (Nichols et al., 2018) (VIBC) and us used the reevaluated CCS values of the tuning mix calibrant ions (Stow et al., 2017) while (Zhou et al., 2016) (MetCCS) used the previously reported values for the tuning mix ion calibrants which can yield bias up to 2.5% for calibrant ions (see **Table S1**).

We, first, compared the common CCS values to check the overlap among these CCS libraries (see **Figure 2**). Overall, our database is complementary to the other considered as only 361 $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values are reported in at least one of the published database (see **Figure 2**). Indeed, thousands of experimental CCS values for metabolites and lipids have been reported over the past years but, the entire metabolome is still incomplete mainly due to the lack of chemical standards but also due to the large number of compounds constituting it. Indeed, only 64 species are reported in the four databases considered here. Hence, our work will provide the metabolomic community with a large number of unpublished and complementary $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values.

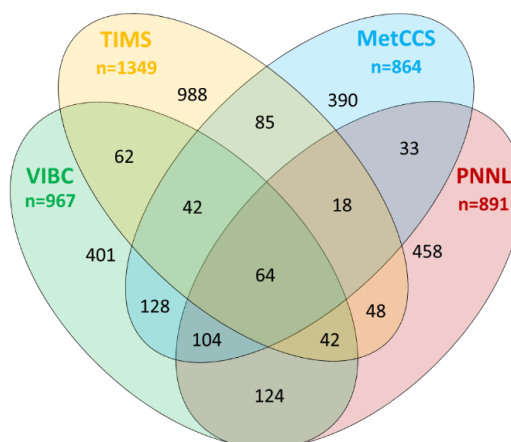


Figure 2 : Overlap of the $TIMS CCS_{N2}$ values with three reported DTIMS databases (Nichols et al., 2018; Zheng et al., 2017a; Zhou et al., 2016)

However, data sharing should require to ensure the interoperability of CCS measurements. To evaluate the correlation between all databases, we plotted our CCS values, reported as $TIMS CCS_{N2}$ versus the published $DTIMS CCS_{N2}$ values (see **Figure 3A**) and calculated the bias between CCS measurements from different databases as RSD values (see **Figure 3B and 3C**). Note that values with a RSD > 5% were not taken into account for the calculation of the linear regression, but these outlier values were nevertheless plotted in the **Figure 3A**. Those values represent between 9 to 12% of the values according to the studied DTIMS databases (see **Figure 3B**). Finally, a good linear correlation is obtained between our database and the DTIMS databases (see **Figure 3A**) with relatively high correlation coefficient ($R^2 > 0.99$).

Manual curation shows that most outlier values are observed in negative ionization mode and display a much higher $TIMS CCS_{N2}$ values compared to the $DTIMS CCS_{N2}$ ones (see encircled zone in **Figure 3A**, and the **Figures S2 and S3**). One hypothesis may be that they are likely due to metastable dissociations of large masses and weak noncovalent multimer ions resulting in uncorrelated measures (see the **Figures S4**) (Hinnekamp et al., 2018). When these noncovalent species (characterized by higher $TIMS CCS_{N2}$) leave the TIMS cell and pass through the quadrupole to the TOF-analyzer, fast metastable ion decompositions can occur leading to their m/z detection as monomeric (fragment) species (Morsa et al., 2020). Alternatively, their occurrence in negative ion mode could be explained by the smaller number of ionic species formed (in comparison to positive ion mode) which favors the non-covalent cluster ion formation during ESI processes.

We also compared the bias between our $TIMS CCS_{N2}$ values and the published $DTIMS CCS_{N2}$ values (see **Figure 3B**) as RSD values. Our values display relatively high discrepancies compared to the PNNL database (only 51% of the $TIMS CCS_{N2}$ values present a RSD < 2% in comparison with the $DTIMS CCS_{N2}$ values) while a better correlation is obtained with the MetCCS database and

the VIBC measurements (for both stepped-field as VIBC MF and single-field methods, as VIBC SF) with 87%, 84% and 87% of $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values with a RSD <2%, respectively. Moreover, the PNLL and MetCCS databases also exhibit a poor correlation as only 35% of their jointed values have a RSD < 2%, while the PNLL and the VIBC MF databases as well as the MetCCS and the VIBC SF databases show better correlations with 72 and 92% of their values presenting a RSD < 2% (see **Figure 3C**).

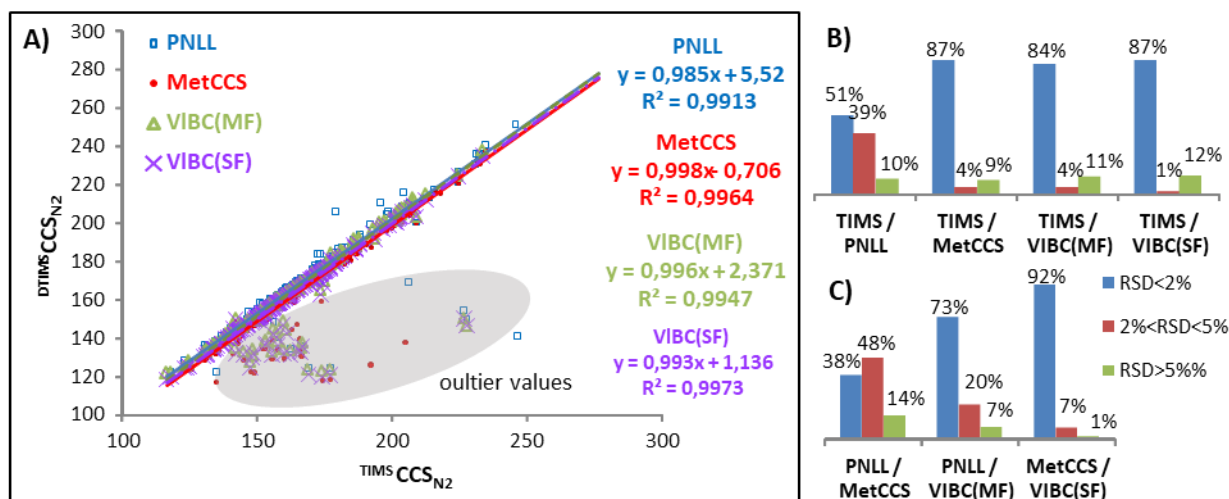


Figure 3: Comparison of TIMS database with three published DTIMS databases as A) correlation linear regression and B) bias RSD values. We also evaluate the bias between the three DTIMS databases in the panel C)

Interestingly, PNLL and VIBC MF databases were obtained from stepped-field method and the fundamental low field ion mobility equation was applied to determine CCS values, whereas our database and the MetCCS and VIBC SF databases were all produced using calibrant-dependent method, and above all, using the same calibration solution (i.e., ESI-L Low Concentration Tuning Mix solution). Hence, larger discrepancies of inter-platform approaches appear here, to originate from the choice of the calibrant ions, which has a significant impact on the CCS measurements (Hines et al., 2017). In the present study, CCS values produced with the same calibration solution were well correlated and comparable despite the use of different ion mobility cell geometries and enlighten the need to find a of consensual calibration procedure among the scientific community, all the more that most commercial IM-MS instruments (TWIMS, TIMS and also single-step DTIMS) are based on calibrant-dependent methods (Dodds and Baker, 2019; Gabelica et al., 2019).

3.4. Isomer distinction

Isomer distinction is one of the primary motivations for the inclusion of ion mobility in metabolomics platform. Indeed, a large number of known metabolites are isomeric compounds and their full 3D structure identification is critical, representing the final level 0 of identification recently introduced by the metabolomics community (Blaženović et al., 2018b). The TIMS analyzer could be an interesting cell for this purpose as its resolving power can be tuned to higher mobility resolution by modifying its elution scanning rate and mobility range of ion mobility analysis (Ridgeway et al., 2018).

Previous works on small mass molecules (Delvaux et al., 2020a, 2021b) reported the use of $\Delta\text{CCS}\%$ (see **Equation 1**) calculated between two close mobility peaks, as the most robust criterion for comparing relative separation capacity (Dodds et al., 2017). Previous works using TIMS device (Delvaux et al., 2021b), reported that isomer compound baseline separation can be obtained with a $\Delta\text{CCS}\% \geq 3.5\%$ using a fingerprint mode with a large mobility range detection while compounds with a $1.5\% \leq \Delta\text{CCS}\% < 3.5\%$ can be well-separated using a targeted mode (smaller mobility range and slower scanning rate). Finally, compounds with a $1.0\% \leq \Delta\text{CCS}\% < 1.5\%$ can be partially resolved using the latter mode and compounds with $\Delta\text{CCS}\% < 1.0\%$ cannot be separated. For comparison, when using a TWIMS instrument, the full isomer mobility separation has been reported for $\Delta\text{CCS}\%$ larger than 4% (Sinclair et al., 2018; Hernández-Mesa et al., 2019).

$$\Delta\text{CCS}\% = \frac{\text{CCS}_B - \text{CCS}_A}{\text{average CCS}_{B,A}} \times 100 \quad (1)$$

To enlighten the ability of the TIMS cell for the isomer distinction, and the importance of mobility resolution for such purpose in untargeted metabolomics, we calculated the $\Delta\text{CCS}\%$ values for all detected ion isomers found in TIMS database (see **Figure 4A**). To do so, metabolites with identical chemical formulas were grouped into isomeric sets and arranged in a pairwise manner (484 pairs) before calculation of $\Delta\text{CCS}\%$ values. Finally, 72% of the isomer pairs can be well or at least partially separated using the TIMS-TOF analyzer whereas only 137 out of 484 isomer sets cannot be resolved using TIMS ($\Delta\text{CCS}\% < 1.0\%$). Nevertheless, recent technical advances such as cyclic TWIMS (Giles et al., 2019) or Structure for Lossless Ion Manipulation (SLIM) devices (Deng et al., 2017; Hollerbach et al., 2020) (which are now commercially available at Waters Corporation and MOBILion Systems Inc. respectively) enable to reach resolving powers exceeding 300. With such enhanced resolving powers, mobility separation of compounds with $\Delta\text{CCS}\%$ around 0.5% can be expected (Dodds et al.,

2017). Hence, these innovations should greatly pave the way for the characterization of the very close structurally compounds.

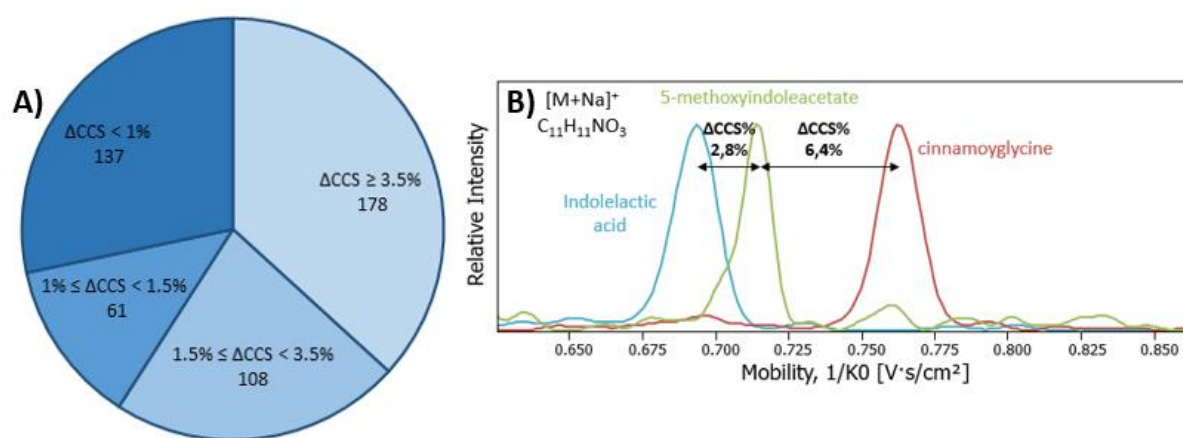


Figure 4: Evaluation of the isomer separation using a TIMS cell. A) Calculated $\Delta\text{CCS}\%$ of all isomers present in the TIMS database which were sorted in pairwise matches B) Separation of three isomers, i.e., indolelactic acid, 5-methoxyindoleacetate and cinnamoyglycine as $[\text{M}+\text{Na}]^+$ adduct ions. Note that large mobility mode is used here.

As an example, **Figure 4B** shows the mobility separation of three structural isomer compounds: indolelactic acid, 5-methoxyindoleacetate and cinnamoyglycine detected as $[\text{M}+\text{Na}]^+$ adducts. We can see that the 5-methoxyindoleacetate and the cinnamoyglycine compounds which present a $\Delta\text{CCS}\% \geq 3.5\%$, are well-separated using the large ion mobility detection mode. On the contrary, indolelactic acid and 5-methoxyindoleacetate can be distinguished using the large mobility mode but not baseline resolved as they present a $1.5\% \leq \Delta\text{CCS}\% < 3.5\%$. Nevertheless, well-resolved detection of these two compounds could be obtained using the more resolute TIMS mode (see experimental section). It should be noted here, that these compounds are detected as $[\text{M}+\text{Na}]^+$ and $[\text{M}-\text{H}]^-$ species with only two of them also detected as $[\text{M}+\text{H}]^+$. Hence, in positive ion mode only the $[\text{M}+\text{Na}]^+$ adduct specie allow their distinction highlighting the importance to include adduct ions in the final database.

3.5. Application of the ^{TIMS}CCS_{N2} database to metabolomics studies

To further demonstrate the utility and application of our library, we first checked the reproducibility of the ^{TIMS}CCS_{N2} values in complex matrix, here in human urine. The ^{TIMS}CCS_{N2} values, manually extracted from a standard pool analysed alone and spiked in urine were compared. A shift of 0.2% and 0.4% could be observed from the FIA-IM-MS and LC/IM-MS analyses, respectively. This shift is below the level of reproducibility reported in the **section**

3.2, which evidence the robustness of $^{TIMS}CCS_{N2}$ measurements, even for complex matrix analyses.

From these previous results, a low dataquery tolerance of 0.5% for the metabolite annotation could be employed in our study, allowing to decrease the number of false positives. We first annotated the standard pool sample and the spiked urine with a 2% and a 0.5% tolerance on the $^{TIMS}CCS_{N2}$ criterion. In both cases, the same compounds were annotated. Hence, the tolerance of 0.5% on the $^{TIMS}CCS_{N2}$ annotation was further applied in our study to process the urine sample analyses.

We, then, analyzed and processed a human urine sample analyzed by both FIA and LC/IM-MS approaches. Usually, CCS values are employed as a way to reduce false positive identifications and are, hence, only used in a second step to confirm or deny annotations based on m/z and/or RT (Paglia et al., 2015). Here, signals were annotated based on m/z and $^{TIMS}CCS_{N2}$ (as well as RT) for FIA (and LC)/IM-MS experiments using Metaboscape software.

A total of 56 and 99 compounds in urine sample were matched based on the m/z, and $^{TIMS}CCS_{N2}$ parameters with tolerances of 5ppm and 0.5%, for the FIA and LC/IM-MS analyses, respectively. A higher number of hits is obtained from the LC/IM-MS analysis in comparison to the FIA-IM-MS analysis which was expected as the chromatographic separation enables less matrix effects, a phenomenon inherent to all direct method such as FIA-IM-MS, and hence an enhanced sample coverage.

Finally, according to (Nye et al., 2019), m/z and CCS measurement alone will be insufficient for unequivocal identification and chromatographic retention time data will remain key for the metabolite annotation step. Nevertheless, note that, here, only a small decrease of annotated compounds was obtained by adding the RT data feature to the identification step, which is certainly due to the elimination of false positives. 84 compounds were annotated from the urine LC/IM-MS analysis based on m/z, $^{TIMS}CCS_{N2}$ and RT with tolerances of 5ppm, 0.5% and 2 min, respectively. This enlightens the advantage of multidimensional data acquisition for proper identification (D'Atri et al., 2018; Morrison and Clowers, 2019; Zheng et al., 2017b) as adding, RT for the annotation, increased the level of confidence in the identification step.

4. Conclusion

We report here a $^{TIMS}CCS_{N2}$ library devoted to metabolomics. Using the TIMS technology more than 1000 unpublished CCS values from IM-MS analyses of 407 metabolite standards were provided. All measurements were performed in triplicate with both positive and negative polarities and a very good precision is obtained with an averaged RSD of 0.15% and a maximum

of 0.35 % for the intra and inter-day repeatability. The ^{TIMS}CCS_{N2} values are in good agreement with published data from other (DTIMS) platforms especially when the experiments are conducted in single-field mode using a calibration step with the same calibration solution as ours. This study enlightens the need to standardize the calibration step procedure among the scientific community in order to share and use data from other laboratories as well as other ion mobility technology, with a high level of confidence. Finally, ^{TIMS}CCS_{N2} as molecular descriptor is a valuable resource for the metabolomic community since 56 endogeneous metabolites were annotated within an m/z and CCS tolerance of 5 ppm and 0.5%, respectively for a human urine analyzed by direct FIA-IM-MS approach.

Acknowledgment

We thank the MetaboHUB infrastructure (ANR-AA-INBS-0010 grant) for the funding and for providing the standard compounds. We would also like to thank Céline Xu for her help in the data treatment of the urine sample.

Supporting Information

“Creation of a Collisional Cross Section database to support metabolomics analyses and identification using trapped ion mobility-mass spectrometry”

Aurélie Delvaux¹, Estelle Rathahao-Paris^{1,2}, Sandra Alves¹

¹ Sorbonne Université, Faculté des Sciences et de l'Ingénierie, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), 75005 Paris, France

² Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Summary of contents

Table S1. Comparison of the CCS values employed for the calibration step for the TIMS, the single-field experiment of VIBC (Nichols et al., 2018) and the MetCCS (Zhou et al., 2016) databases. TIMS and VIBC employed the reevaluated CCS values reported by (Stox et al., 2017).

Figure S1. Description of our batch analyses

Figure S2. RSD values calculated from the comparison of different databases, obtained in positive and negative mode, respectively

Figure S3. Mass-Mobility Correlation Curves for all the ^{TIMS}CCS_{N2} as well as the ones detected in positive and negative ion mode respectively.

Figure S4. Extracted ion mobility spectra for the [M+Li]⁺ and [2M+Li]⁺ of 4-MeO-E₂β at 0.5 ng.μL⁻¹ with 5 ng.μL⁻¹ of LiCl in MeOH/H₂O 50/50 (v/v)

Table S1. Comparison of the CCS values of calibrant ions used for the TIMS, the single-field experiment of VIBC (Nichols et al., 2018) and the MetCCS (Zhou et al., 2016) databases. Note that both TIMS and VIBC employed the reevaluated CCS values reported by (Stow et al., 2017).

POSITIVE IONIZATION			
m/z	CCS(TIMs, VIBC)	CCS(MetCCS)	Δ CCS%
322	153.73	153.4	0.2%
622	202.96	202.4	0.3%
922	243.64	242.7	0.4%
1222	282.20	280.9	0.5%
1522	316.96	315.7	0.4%

NEGATIVE IONIZATION			
m/z	CCS(TIMs, VIBC)	CCS(MetCCS)	Δ CCS%
302	140.04	136.6	2.5%
602	180.77	178.4	1.3%
1034	255.34	251.2	1.6%
1334	284.76	280.9	1.4%
1634	319.03	315.8	1.0%

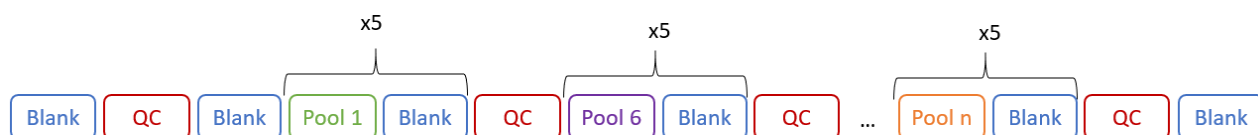


Figure S1. Description of batch analyses

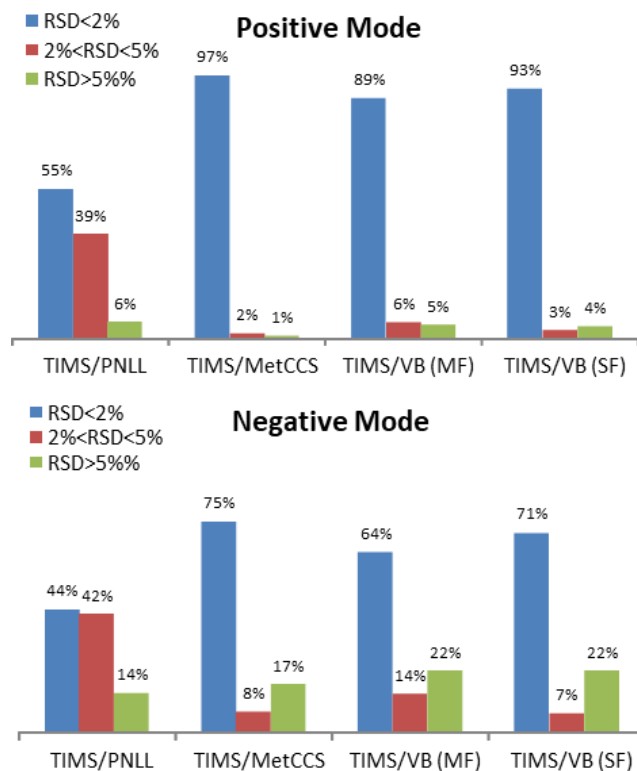


Figure S2. RSD values calculated from the comparison of different databases, obtained in positive and negative mode, respectively.

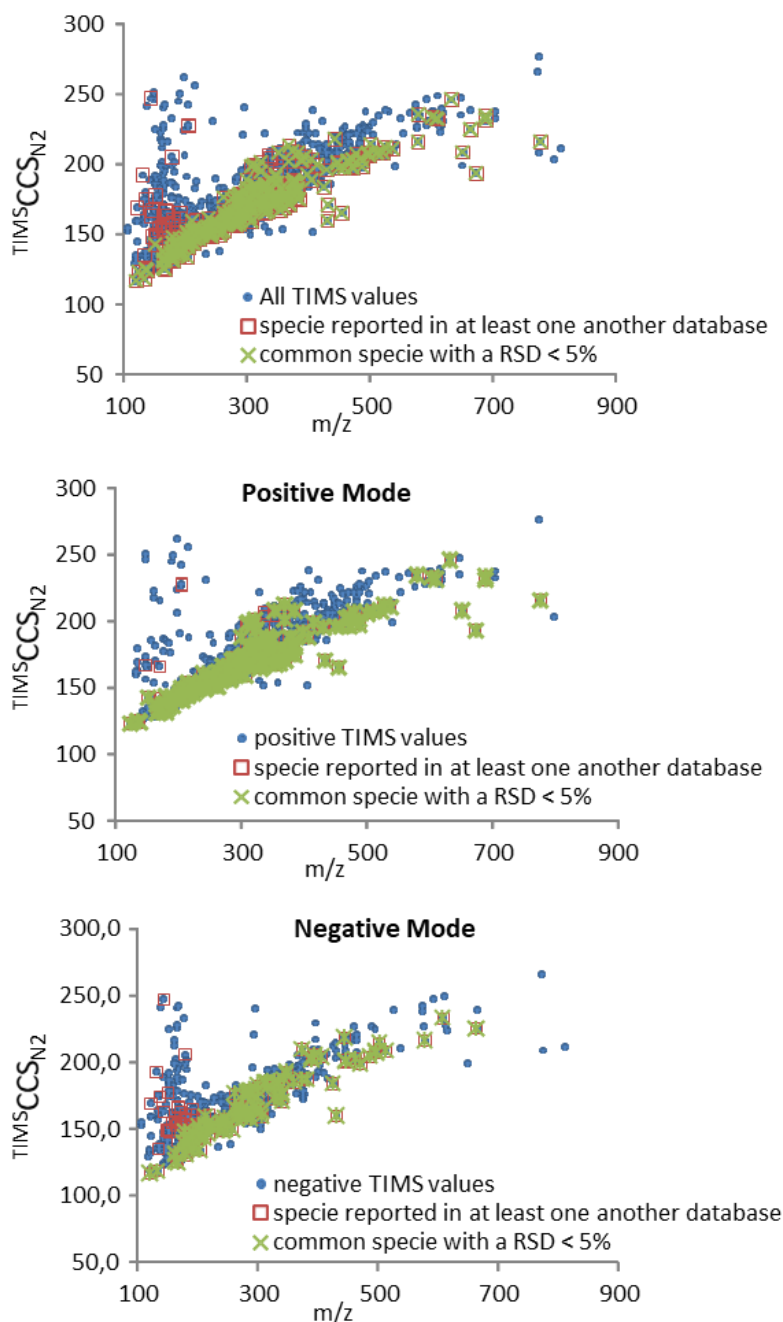


Figure S3 Mass-Mobility Correlation Curves for all the $^{TIMS}CCS_{N2}$ as well as the ones detected in positive and negative ion mode respectively. The $^{TIMS}CCS_{N2}$ are plotted in blue, if the corresponding species is reported in at least one another published database it is encircled in red and if the RSD between the TIMS and the published database is lower than 5%, it is plotted in green.

Figure S3 demonstrated that outlier values mainly correspond to compounds displaying low m/z ratios and high CCS s which can be observed on the different MMCC plots. Interestingly, they are mostly negatively charged species (also see the RSD values calculated in positive and negative mode, respectively in **Figure S2**). We can suppose that outlier values may be explained by metastable fragmentations of high mass noncovalent clusters which fragment after passing the TIMS cell and are mostly detected under negative ion mode as there are less ionized species using this ion polarity.

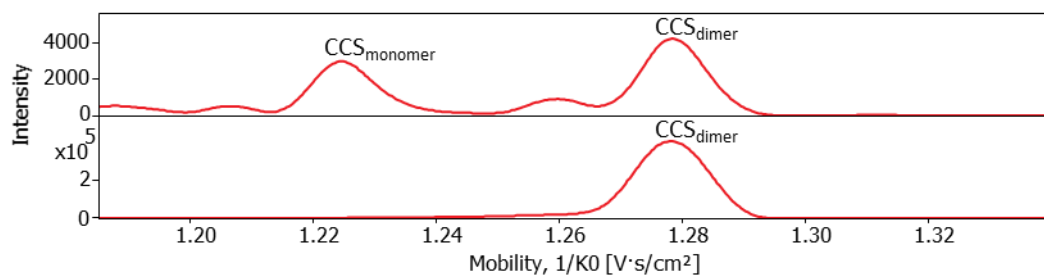


Figure S4 Extracted ion mobility spectra for the $[M+Li]^+$ (top panel) and $[2M+Li]^+$ (bottom panel) of 4-MeO-E₂β at 0.5 ng.μL⁻¹ with 5 ng.μL⁻¹ of LiCl in MeOH/H₂O 50/50 (v/v). Here, the ion mobility spectra of the monomeric specie (top panel) displays two mobility peaks: one for the monomeric specie and another one corresponding to the dimeric specie as confirmed by the ion mobility spectra of the dimeric compound (bottom panel). These ion mobility spectra were obtained from a previous study.

Conclusion du Chapitre III

Dans ce chapitre, nous rapportons la création d'une base de données contenant 1349 valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ pour 407 métabolites. Cette dernière, a été créée en prenant en compte pour l'ionisation positive les ions $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ et $[M-H_2O+H]^+$ et pour l'ionisation négative les espèces $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M-H_2O-H]^-$ et $[M-CO_2]^-$. Nous avons choisi d'étudier toutes ces formes ioniques car la multiplication de valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ pour un même composé donné permet de confirmer son identification mais également car elle est nécessaire pour certaines classes de composés qui ne se sont pas avérées ionisables sous les formes protonées ou déprotonées. Pour la même raison, nous avons décidé de conserver les multiples pics de mobilité éventuellement observés pour une espèce donnée. Ces multiples pics sont, en effet, probablement dû à l'existence de conformères où la localisation de la charge sur l'espèce ionisée varie. La présence de ces différents conformères est dépendante des paramètres analytiques, notamment de ceux de la source et de ceux de la préparation d'échantillon (Gabelica et al., 2019 ; Oranzi et al., 2019). Ainsi, reporter l'ensemble des valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ observées permet d'augmenter les probabilités d'identification. La comparaison de notre base de données avec trois autres librairies de valeurs $^{DTIMS}CCS_{N_2}$ publiées nous a permis de constater que nous avons produit presque 1000 nouvelles valeurs encore non reportées. Cette comparaison, nous a également permis de mettre en évidence une bonne corrélation avec les autres bases de données et en particulier avec celles utilisant le mode single-field, qui est un mode d'analyse qui doit être calibré. En effet, les deux études utilisant le mode single-field ont utilisé la même solution de calibration que nous et il semblerait que cela permettent de diminuer les biais entre bases de données inter-plateformes même équipées de cellules de mobilité différentes. Des valeurs non conformes avec celles issues des autres de base de données ont été observées, elles sont majoritairement obtenues pour des composés ayant des bas m/z et grands $^{TIMS}CCS_{N_2}$ et sont principalement détectées en ionisation négative. Une hypothèse qui expliquerait ces observations serait que ces pics de mobilité correspondent, en réalité, à des multimères non covalents labiles qui traversent la cellule de TIMS mais se fragmentent lors du transfert vers le TOF, conduisant ainsi à un pic de mobilité élevé pour un faible m/z .

Finalement, nos mesures se sont révélées très reproductibles (RSD intra et inter-journalier inférieur à 0.5%) et robustes (décalage inférieur à 0.5% pour l'analyse de matrices complexes), nous permettant de procéder à une annotation basée sur les valeurs de $^{TIMS}CCS_{N_2}$ avec un biais de 0.5% beaucoup plus faible que celui de 2% actuellement recommandé (Paglia and Astarita, 2017; Paglia et al., 2015). Cette limite appliquée pour l'annotation nous permet, ainsi,

d'atteindre un niveau de confiance plus élevé dans l'identification et d'éviter les faux positifs. Enfin, comme preuve de concept, une étude a été menée sur un échantillon d'urine humaine et a permis d'annoter 56 et 84 composés à partir d'analyses FIA-IM-MS et LC/IM-MS, respectivement en appliquant des tolérances sur les m/z , CCS et RT de 5 ppm, 0.5% et 2 min, respectivement.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'est intéressé au développement d'approches basées sur le couplage de la spectrométrie de mobilité ionique à la spectrométrie de masse (IM-MS) pour des analyses métabolomiques à large spectre. En particulier, ce travail a porté sur l'utilisation de cette technique combinée à l'introduction directe (DI) des échantillons afin de pouvoir réaliser des analyses à haut débit pour faciliter l'étude de cohortes, par exemple. L'approche DI-IM-MS a été développée sur un instrument TIMS-TOF commercialisé par Bruker Daltonics. L'avantage de cette récente technologie par rapport aux autres cellules de mobilité disponibles à l'heure actuelle est sa capacité à faire varier son pouvoir résolutif. Cette capacité permet, ainsi, avec un seul et même instrument de réaliser des analyses de type globales pour la détection exhaustive (ou du moins la plus large possible) des composés présents dans un échantillon mais également de mener des analyses ciblées pour améliorer la séparation des espèces similaires telles que les isobares ou les isomères.

Afin d'évaluer la capacité de l'instrumentation TIMS-TOF à séparer les composés isomères par analyse directe, plusieurs études ont été menées sur divers composés standards modèles tels que des métabolites d'estradiol ainsi qu'une variété d'oligosaccharides du lait maternel. Ces études ont permis de mettre en évidence la robustesse des mesures réalisées par mobilité ionique et la possibilité de séparer des composés structuralement très proches tels que les stéréoisomères, en optimisant entre-autres les conditions analytiques: via la formation d'adduits ou encore celle de dimères non-covalents, par exemple. En outre, des analyses de type IM-MS/MS ont parfois été mises en oeuvre pour caractériser certains isomères grâce à la détection d'ions fragments diagnostiques.

Un autre intérêt majeur de l'approche par mobilité ionique est d'accéder à un paramètre d'identification : le Collisional Cross Section (CCS). Ce paramètre est primordial pour les analyses IM-MS par introduction directe car il permet de caractériser et d'annoter les signaux avec deux paramètres (CCS et m/z). Même si les mesures par spectrométrie de mobilité ionique (CCS) et spectrométrie de masse (m/z) suivent généralement une même tendance par famille de composés et sont donc liées par principe, le CCS reste un paramètre de choix pour l'étape d'identification des approches métabolomiques, étant donné qu'il est pas (ou peu) impacté par les effets matrices (notamment en comparaison avec le temps de rétention). De plus, ce paramètre est indépendant du type de cellule de mobilité ionique employé, il peut donc être utilisé dans les études inter-plateformes impliquant différents laboratoires et/ou différentes technologies de mobilité ionique.

Dans ce contexte, nous avons menés plusieurs études qui ont prouvé que les mesures de CCS n'étaient pas significativement impactées en matrice complexe ($RSD < 0.5\%$). En effet, via la comparaison de la réponse analytique de standards en solution pure ou présents dans une matrice biologique (urine humaine ou lait maternel), un faible biais a été systématiquement déterminé. Quant à l'interopérabilité des valeurs CCS vis-à-vis de la cellule employée, nos travaux ont mis en évidence que l'étape d'étalonnage utilisée pour déterminer les valeurs CCS et nécessaire dans la plupart des cellules de mobilité ionique (notamment pour le TIMS), constitue le facteur critique qui peut entraîner des biais dans les mesures expérimentales. Nous avons, en effet, observé que les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ après étalonnage avec une solution de calibration ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent) étaient globalement en accord avec des valeurs publiées par d'autres groupes utilisant une instrumentation DTIMS mais les écarts (entre valeurs de CCS) les moins importants étaient obtenus entre nos mesures et celles effectuées sur des DTIMS en mode single-field étalonnés avec la même solution de calibration que la notre. Nous avons, également, ponctuellement observé des écarts importants pour certains composés et tout particulièrement dans l'étude des estradiols pour les formes dimériques : les espèces monomériques présentaient des $^{TIMS}CCS_{N_2}$ cohérents avec ceux reportés sur des instrumentations TWIMS mais de grandes erreurs ont été observées pour les composés dimériques. Ces biais sont probablement liés au choix des composés étalons, les ions de la solution étalon étant eux-mêmes des ions monomériques. Il faut souligner que certains écarts observés étaient dû à des fragmentations métastables induisant des mesures erronées comme nous l'avons vu lors de la création de la base de données. Ainsi, dans l'ensemble, nos travaux démontrent de l'importance de définir une procédure de calibration universelle, afin que les valeurs CCS enregistrées sur un instrument donné puissent être partagées avec la communauté sans dépendre de la cellule employée.

Au vu de la robustesse de nos analyses ($RSD < 0.5\%$) et du besoin d'identifier correctement les signaux à partir d'une prise d'empreintes métabolomiques, nous avons décidé de construire une base de données $^{TIMS}CCS_{N_2}$ à partir de métabolites standards. Ce travail a permis de rassembler plus de 1300 valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ pour plus de 400 métabolites. Une annotation sur les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ avec une erreur de 2% peut être appliquée pour une étude inter-plateforme et pour des analyses issues de notre laboratoire, i.e. sur notre instrument avec les mêmes conditions analytiques, nous avons montré qu'il est même possible d'annoter un échantillon complexe avec une tolérance bien inférieure de 0.5%. Nous avons, ainsi, pu identifier 56 composés sur la

base des valeurs m/z (tolérance de 5ppm) et CCS (tolérance de 0.5%) pour l'analyse d'une urine humaine par FIA-IM-MS.

L'ensemble de mes travaux de recherches a permis d'évaluer les avantages et les limites d'une approche directe FIA-TIMS-TOF pour des analyses métabolomiques. Une telle approche permet de réaliser des analyses à haut débit tout en fournissant deux paramètres d'identification, le m/z et le $^{TIMS}CCS_{N_2}$. Les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ étant très reproductibles et robustes et peu ou pas impactées par les effets de matrice, elles représentent un critère d'identification de choix. Cependant, le TIMS étant un instrument pour lequel la calibration des valeurs CCS est essentielle, il est primordial de développer un protocole commun au sein de la communauté scientifique afin de pouvoir réutiliser les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ expérimentales entre laboratoires utilisant différentes cellules de mobilité. Comme, pour toute méthode par introduction directe, les analyses FIA-TIMS-TOF subissent des effets matrices qui peuvent impacter l'empreinte spectrale acquise. Il est possible d'utiliser une technique chromatographique pour réduire ces effets et fournir un troisième facteur d'identification (temps de rétention) mais cet ajout se fait au détriment du caractère haut débit de l'analyse. Pour des analyses FIA-IM-MS, l'utilisation de cellules de mobilité à haute résolution s'avère primordiale. Elles permettent, en effet, d'identifier un maximum de composés notamment via la distinction des composés isomères présentant des mobilités très proches. Dans ce contexte, seuls les instruments plus récents présentant des capacités de séparation élevées, tels que le TIMS (en mode ciblé), le TWIMS cyclique ou le SLIM, peuvent être employés pour des approches directes. Enfin, le couplage de la MS/MS à une analyse FIA-TIMS-TOF s'avère extrêmement utile pour la distinction de certains groupes d'isomères et permet d'apporter un troisième facteur d'identification tout en conservant une analyse à haut débit.

Les travaux de cette thèse ont permis de démontrer le potentiel du couplage IM-MS pour des prises d'empreintes métabolomiques mais également pour des études ciblées. Les analyses non-ciblées sont désormais possible grâce au développement de méthodes d'analyse IM-MS globale et à la création d'une base de données de valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$. Pour les analyses ciblées, la séparation et caractérisation des isomères de valeurs CCS très proches ont pu être obtenues notamment via l'optimisation des conditions analytiques. Cependant, d'autres investigations sont à poursuivre afin d'évaluer le potentiel de l'instrumentation TIMS-TOF en termes de mesures quantitatives ou tout du moins relatives des composés présents dans les matrices biologiques afin d'obtenir des analyses métabolomiques plus complètes.

RÉFÉRENCES

- Adams KJ**, Montero D, Aga D, Fernandez-Lima F. 2016. Isomer separation of polybrominated diphenyl ether metabolites using nanoESI-TIMS MS. *Int J Mobil Spectrom* 19:69-76.
- Adams KJ**, Ramirez CE, Smith NF, Muñoz-Muñoz AC, Andrade L, Fernandez-Lima FA. 2018. Analysis of isomeric opioids in urine using LCTIMS-TOF MS. *Talanta* 183:177-183.
- Ahonen L**, Fasciotti M, af Gennäs GB, Kotiaho T, Daroda RJ, Eberlin M, Kostianen R. 2013. Separation of steroid isomers by ion mobility mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1310:133-137.
- Alonso A**, Marsal S, Julia A. 2015. Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015. *Front Bioeng Biotechnol* 3.
- Amicucci MJ**, Nandita E, Lebrilla CB. 2019. Function without Structures: The Need for In-Depth Analysis of Dietary Carbohydrates. *J Agric Food Chem* 67:4418-4424.
- Asbury GR**, Hill HH. 2000. Using different drift gases to change separation factors (α) in ion mobility spectrometry. *Anal Chem* 72:580-584.
- Armenta S**, Alcalá M, Blanco M. 2011. A review of recent, unconventional applications of ion mobility spectrometry (IMS). *Anal Chim Acta* 703:114-123.
- Azad MB**, Robertson B, Atakora F, Becker AB, Subbarao P, Moraes TJ, Mandhane PJ, Turvey SE, Lefebvre DL, Sears MR, Bode L. 2018. Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. *J Nutr* 148:1733-1742.
- Baglai A**, Gargano AFG, Jordens J, Mengerink Y, Honing M, van der Wal S, Schoenmakers PJ. 2017. Comprehensive lipidomic analysis of human plasma using multidimensional liquid- and gas-phase separations: Two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry vs. liquid chromatography-trapped-ion-mobility-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1530:90-103.
- Beach DG**, Gabryelski W. 2011. Nontarget analysis of urine by electrospray ionization-high field asymmetric waveform ion mobility-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 83: 9107-9113.
- Benigni P**, Thompson CJ, Ridgeway ME, Park MA, Fernandez-Lima F. 2015. Targeted high-resolution ion mobility separation coupled to ultrahigh-resolution mass spectrometry of endocrine disruptors in complex mixtures. *Anal Chem* 87:4321-4325.
- Benigni P**, Fernandez-Lima F. 2016. Oversampling selective accumulation trapped ion mobility spectrometry coupled to FT-ICR MS: Fundamentals and applications. *Anal Chem* 88:7404-7412.
- Benigni P**, Sandoval K, Thompson CJ, Ridgeway ME, Park MA, Gardinali P, Fernandez-Lima F. 2017. Analysis of photoirradiated water accommodated fractions of crude oils using tandem TIMS and FT-ICR MS. *Environ Sci Technol* 51:5978-5988.
- Benigni P**, Porter J, Ridgeway ME, Park MA., Fernandez-Lima F. 2018. Increasing analytical separation and duty cycle with nonlinear analytical mobility scan functions in TIMS-FT-ICR MS. *Anal Chem* 90:2446-2450.
- Bennett RV**, Gamage CM, Galhena AS, Fernández FM. 2014. Contrast-enhanced differential mobility-desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging of biological tissues. *Anal Chem* 86:3756-3763.
- Berant Z**, Karpas Z, Shahal O. 1989. Effects of temperature and clustering on mobility of ions in CO₂. *J Phys Chem* 93:7529-7532.
- Bernard H**, Ah-Leung S, Drumare M-F, Feraudet-Tarisse C, Verhasselt V, Wal J-M, Créminon C, Adel-Patient K. 2014. Peanut Allergens Are Rapidly Transferred in Human Breast Milk and Can Prevent Sensitization in Mice. *Allergy* 69:888-897.
- Beucher L**, Dervilly-Pinel G, Cesbron N, Penot M, Gicquiau A, Monteau F, Le Bizec B. 2017. Specific characterization of nonsteroidal selective androgen receptor modulators using supercritical fluid chromatography coupled to ion-mobility mass spectrometry: application to the detection of enobosarm in bovine urine: Hyphenation of SFC and IM-MS for growth promoters' detection. *Drug Test Anal* 9:179-187.
- Blaženović I**, Shen T, Mehta SS, Kind T, Ji J, Piparo M, Cacciola F, Mondello L, Fiehn O. 2018. Increasing compound identification rates in untargeted lipidomics research with liquid chromatography drift time-ion mobility mass spectrometry. *Anal Chem* 90:10758-10764.
- Blaženović I**, Kind T, Ji J, Fiehn O. 2018b. Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. *Metabolites* 8:31.
- Bode L**. 2015. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum Dev* 91:619-622.
- Boschmans J**, Jacobs S, Williams JP, Palmer M, Richardson K, Giles K, Laphorn C, Herrebout WA, Lemièrre F, Sobott F. 2016. Combining density functional theory (DFT) and collision cross-section (CCS) calculations to analyze the gasphase behaviour of small molecules and their protonation site isomers. *The Analyst* 141:4044-4054.

- Burnum-Johnson KE**, Zheng X, Dodds JN, Ash J, Fourches D, Nicora CD, Wendler JP, Metz TO, Waters KM, Jansson JK, Smith RD, Baker ES. 2019. Ion mobility spectrometry and the omics: Distinguishing isomers, molecular classes and contaminant ions in complex samples. *TrAC Trends Anal Chem* 116:292–299.
- Bush MF**, Campuzano IDG, Robinson CV. 2012. Ion Mobility mass spectrometry of peptide ions: Effects of drift gas and calibration strategies. *Anal Chem* 84:7124–7130.
- Campuzano I**, Bush MF, Robinson CV, Beaumont C, Richardson K, Kim H, Kim HI. 2012. Structural characterization of drug-like compounds by ion mobility mass spectrometry: Comparison of theoretical and experimentally derived nitrogen collision cross sections. *Anal Chem* 84:1026–1033.
- Campuzano IDG**, Giles K. 2019. Historical, current and future developments of travelling wave ion mobility mass spectrometry: A personal perspective. *TrAC Trends Anal Chem* 120:115620.
- Castellanos A**, Benigni P, Hernandez DR, DeBord JD, Ridgeway ME, Park MA, Fernandez-Lima F. 2014. Fast screening of polycyclic aromatic hydrocarbons using trapped ion mobility spectrometry–mass spectrometry. *Anal Methods* 6:9328–9332.
- Causon TJ**, Hann S. 2015. Theoretical evaluation of peak capacity improvements by use of liquid chromatography combined with drift tube ion mobility-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1416:47–56.
- Chouinard CD**, Cruzeiro VWD, Roitberg AE, Yost RA. 2017a. Experimental and theoretical investigation of sodiated multimers of steroid epimers with ion mobility-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 28:323–331.
- Chouinard CD**, Beekman CR, Kemperman RHJ, King HM, Yost RA. 2017b. Ion mobility-mass spectrometry separation of steroid structural isomers and epimers. *Int J Ion Mobil Spectrom* 20:31–39.
- Chouinard CD**, Nagy G, Webb IK, Garimella SVB, Baker ES, Ibrahim YM, Smith RD. 2018. Rapid ion mobility separations of bile acid isomers using cyclodextrin adducts and structures for lossless ion manipulations. *Anal Chem* 90:11086–11091.
- Chouinard CD**, Nagy G, Smith RD, Baker ES. 2019. Ion mobility-mass spectrometry in metabolomic, lipidomic, and proteomic analyses. In: Donald WA, Prell JS, editors. *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, pp. 123–159.
- Clemmer DE**, Hudgins RR, Jarrold MF. 1995. Naked Protein Conformations: Cytochrome c in the Gas Phase. *J Am Chem Soc* 117:10141–10142.
- Colby SM**, Thomas DG, Nuñez JR, Baxter DJ, Glaesemann KR, Brown JM, Pirrung MA, Govind N, Teeguarden JG, Metz TO, Renslow RS. 2019. ISiCLE: A quantum chemistry pipeline for establishing in silico collision cross section libraries. *Anal Chem* 91:4346–4356.
- Crawford CL**, Graf S, Gonin M, Fuhrer K, Zhang X, Hill HH. 2011. The novel use of gas chromatography-ion mobility-time of flight mass spectrometry with secondary electrospray ionization for complex mixture analysis. *Int J Ion Mobil Spectrom* 14:23–30.
- Crowell KL**, Slys GW, Baker ES, LaMarche BL, Monroe ME, Ibrahim YM, Payne SH, Anderson GA, Smith RD. 2013. LCIMS-MS feature finder: detecting multidimensional liquid chromatography, ion mobility and mass spectrometry features in complex datasets. *Bioinformatics* 29:2804–2805.
- Csernák O**, Rácz B, Alberti Á, Béni S. 2020. Quantitative Analysis of 3'- and 6'-Sialyllactose in Human Milk Samples by HPLC-MS/MS: A Validated Method for the Comparison of Two Consecutive Lactation Periods in the Same Woman. *J Pharm Biomed Anal* 184:113184.
- Cui M**, Song F, Liu Z, Liu S. 2001. Metal ion adducts in the structural analysis of ginsenosides by electrospray ionization with multi-stage mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15:586–595.
- D'Atri V**, Causon T, Hernandez-Alba O, Mutabazi A, Veuthey JL, Cianferani S, Guilleme D. 2018. Adding a new separation dimension to MS and LC-MS: What is the utility of ion mobility spectrometry? *J Sep Sci* 41:20–67.
- Delvaux A**, Rathahao-Paris E, Alves S. 2020a. An Emerging Powerful Technique for Distinguishing Isomers: Trapped Ion Mobility Spectrometry Time-of-flight Mass Spectrometry for Rapid Characterization of Estrogen Isomers. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 34:8928.
- Delvaux A**, Rathahao-Paris E, Alves S. 2021a. Different ion mobility-mass spectrometry coupling techniques to promote metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 1–27.
- Delvaux A**, Rathahao-Paris E, Guillon B, Cholet S, Adel-Patient K, Fenaille F, Junot C, Alves S. 2021b. Trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for high throughput and high resolution characterization of human milk oligosaccharide isomers. *Analytica Chimica Acta* 338878.
- Delvaux C**, Massonnet P, Kune C, Haler JRN, Upert G, Mourier G, Gilles N, Quinton L, De Pauw E, Far J. 2020b. Combination of capillary zone electrophoresis-mass spectrometry, ion mobility-mass spectrometry, and theoretical calculations for cysteine connectivity identification in peptides bearing two intramolecular disulfide bonds. *Anal Chem* 92:2425–2434.
- Deng L**, Ibrahim YM, Baker ES, Aly NA, Hamid AM, Zhang X, Zheng X, Garimella SVB, Webb IK, Prost SA, Sandoval JA, Norheim RV, Anderson GA, Tolmachev AV, Smith RD. 2016. Ion mobility separations of isomers based upon long path length structures for lossless ion manipulations combined with mass spectrometry. *Chemistry Select* 1:2396–2399.

- Deng L**, Webb IK, Garimella SVB, Hamid AM, Zheng X, Norheim RV, Prost SA, Anderson GA, Sandoval JA, Baker ES, Ibrahim YM, Smith RD. 2017. Serpentine ultralong path with extended routing (SUPER) high resolution traveling wave ion mobility-MS using structures for lossless ion manipulations. *Anal Chem* 89:4628–4634.
- Díaz-Cruz MS**, López de Alda MJ, López R, Barceló D. 2003. Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *J Mass Spectrom* 38:917–923.
- Dodds JN**, May JC, McLean JA. 2017. Correlating resolving power, resolution, and collision cross section: Unifying cross-platform assessment of separation efficiency in ion mobility spectrometry. *Anal Chem* 89:12176–12184.
- Dodds JN**, Baker ES. 2019. Ion mobility spectrometry: Fundamental concepts, instrumentation, applications, and the road ahead. *J Am Soc Mass Spectrom* 30:2185–2195.
- Domalain V**, Hubert-Roux M, Tognetti V, Joubert L, Lange CM, Rouden J, Afonso C. 2014. Enantiomeric differentiation of aromatic amino acids using traveling wave ion mobility-mass spectrometry. *Chem Sci* 5:3234–3239.
- Domon B**, Costello CEA. 1988. Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates. *Glycoconj J* 5:397–409.
- Dwivedi P**, Wu C, Matz LM, Clowers BH, Siems WF, Hill HH. 2006. Gas-phase chiral separations by ion mobility spectrometry. *Anal Chem* 78:8200–8206.
- Dwivedi P**, Wu P, Klopsch SJ, Puzon GJ, Xun L, Hill HH. 2008. Metabolic profiling by ion mobility mass spectrometry (IMMS). *Metabolomics* 4:63–80.
- Dwivedi P**, Schultz AJ, Hill HH. 2010. Metabolic profiling of human blood by high-resolution ion mobility mass spectrometry (IM-MS). *Int J Mass Spectrom* 298:78–90.
- Eatherton RL**, Morrissey MA, Siems WF, Hill HH. 1986. Ion mobility detection after supercritical fluid chromatography. *J High Resolut Chromatogr* 9:154–160.
- Eiceman GA**. 2002. Ion-mobility spectrometry as a fast monitor of chemical composition. *TrAC Trends Anal Chem* 21:259–275.
- Eiceman GA**, Karpas Z, Hill HH. 2013. Ion Mobility Spectrometry. 3rd ed.. CRC Press, pp. 400.
- Ewing RG**, Atkinson DA, Eiceman GA, Ewing GJ. 2001. A critical review of ion mobility spectrometry for the detection of explosives and explosive related compounds. *Talanta* 54:515–529.
- Ewing SA**, Donor MT, Wilson JW, Prell JS. 2017. Collidoscope: An improved tool for computing collisional cross-section with the trajectory method. *J Am Soc Mass Spectrom* 28:587–596.
- Fenn LS**, McLean JA. 2011. Structural Resolution of Carbohydrate Positional and Structural Isomers Based on Gas-Phase Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Phys Chem Chem Phys* 13:2196–2205.
- Fernandez-Lima FA**, Kaplan DA, Park MA. 2011a. Note: Integration of trapped ion mobility spectrometry with mass spectrometry. *Rev Sci Instrum* 82:126106.
- Fernandez-Lima FA**, Kaplan DA, Suetering J, Park MA. 2011b. Gas-phase separation using a trapped ion mobility spectrometer. *Int J Ion Mobil Spectrom* 14:93–98.
- Fernández-Maestre R**, Wu C, Hill HH. 2012. Buffer gas modifiers effect resolution in ion mobility spectrometry through selective ion-molecule clustering reactions: Buffer gas modifiers effect resolution in IMS by clustering. *Rapid Commun Mass Spectrom* 26:2211–2223.
- Fiehn O**. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. In *Functional Genomics*. Springer Netherlands: Dordrecht, pp 155–171.
- Gabelica V**, Marklund E. 2018. Fundamentals of ion mobility spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* 42:51–59.
- Gabelica V**, Shvartsburg AA, Afonso C, Barran P, Benesch JLP, Bleiholder C, Bowers MT, Bilbao A, Bush MF, Campbell JL, Campuzano IDG, Causon T, Clowers BH, Creaser CS, Pauw ED, Far J, Fernandez-Lima F, Fjeldsted JC, Giles K, Groessl M, Hogan CJ, Hann S, Kim HI, Kurulugama RT, May JC, McLean JA, Pagel K, Richardson K, Ridgeway ME, Rosu F, Sobott F, Thalassinou K, Valentine SJ, Wytenbach T. 2019. Recommendations for reporting ion mobility mass spectrometry measurements. *Mass Spectrom Rev* 38:291–320.
- Gaye MM**, Nagy G, Clemmer DE, Pohl NLB. 2016. Multidimensional analysis of 16 glucose isomers by ion mobility spectrometry. *Anal Chem* 88:2335–2344.
- Giles K**, Ujma J, Wildgoose J, Pringle S, Richardson K, Langridge D, Green M. 2019. A cyclic ion mobility-mass spectrometry system. *Anal Chem* 91:8564–8573.
- Glaskin RS**, Ewing MA, Clemmer DE. 2013. Ion trapping for ion mobility spectrometry measurements in a cyclical drift tube. *Anal Chem* 85:7003–7008.
- Gonzalez TL**, Rae JM, Colacino JA. 2019. Implication of environmental estrogens on breast cancer treatment and progression. *Toxicology* 421:41–48.
- Gourmel C**, Grand-Guillaume Perrenoud A, Waller L, Reginato E, Verne J, Dulery B, Veuthey JL, Rudaz S, Schappler J, Guilleme D. 2013. Evaluation and comparison of various separation techniques for the analysis of closely-related compounds of pharmaceutical interest. *J Chromatogr A* 1282:172–177.

- Gray N**, Adesina-Georgiadis K, Chekmenova E, Plumb RS, Wilson ID, Nicholson JK. 2016. Development of a rapid microbore metabolic profiling ultraperformance liquid chromatography–mass spectrometry approach for high-throughput phenotyping studies. *Anal Chem* 88:5742–5751.
- Groessl M**, Graf S, Knochenmuss R. 2015. High resolution ion mobility-mass spectrometry for separation and identification of isomeric lipids. *The Analyst* 140:6904–6911.
- Guddat S**, Thevis M, Kapron J, Thomas A, Schänzer, W. 2009. Application of FAIMS to anabolic androgenic steroids in sport drug testing. *Drug Test Anal* 1:545–553.
- Guillarme D**, Schappler J, Rudaz S, Veuthey JL. 2010. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 29:15–27.
- Habchi B**, Alves S, Paris A, Rutledge DN, Rathahao-Paris E. 2016. How to really perform high throughput metabolomic analyses efficiently? *TrAC Trends Anal Chem* 85:128–139.
- Habchi B**, Alves S, Jouan-Rimbaud Bouveresse D, Appenzeller B, Paris A, Rutledge DN, Rathahao-Paris E. 2018. Potential of dynamically harmonized Fourier transform ion cyclotron resonance cell for high-throughput metabolomics fingerprinting: control of data quality. *Anal Bioanal Chem* 410:483–490.
- Haggarty J**, Burgess KE. 2017. Recent advances in liquid and gas chromatography methodology for extending coverage of the metabolome. *Curr Opin Biotechnol* 43:77–85.
- Harris RA**, Leaptrot KL, May JC, McLean JA. 2019. New frontiers in lipidomics analyses using structurally selective ion mobility-mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 116: 316–323.
- Harvey DJ**, Sobott F, Crispin M, Wrobel A, Bonomelli C, Vasiljevic S, Scanlan CN, Scarff CA, Thalassinou K, Scrivens JH. 2011. Ion Mobility Mass Spectrometry for Extracting Spectra of N-Glycans Directly from Incubation Mixtures Following Glycan Release: Application to Glycans from Engineered Glycoforms of Intact, Folded HIV Gp120. *J Am Soc Mass Spectrom* 22:568–581.
- Hernandez DR**, DeBord JD, Ridgeway ME, Kaplan DA, Park MA, Fernandez-Lima F. 2014. Ion dynamics in a trapped ion mobility spectrometer. *Analyst* 139:1913–1921.
- Hernández - Mesa M**, Le Bizec B, Monteau F, García - Campaña AM, Dervilly - Pinel G. 2018. Collision cross section (CCS) database: An additional measure to characterize steroids. *Anal Chem* 90:4616–4625.
- Hernández-Mesa M**, Monteau F, Le Bizec B, Dervilly-Pinel G. 2019. Potential of ion mobility-mass spectrometry for both targeted and non-targeted analysis of phase II steroid metabolites in urine. *Anal Chim Acta X* 1:100006.
- Hernández-Mesa M**, D'Atri V, Barknowitz G, Fanuel M, Pezzatti J, Dreolin N, Ropartz D, Monteau F, Vigneau E, Rudaz S, Stead S, Rogniaux H, Guillarme D, Dervilly G, Le Bizec B. 2020. Interlaboratory and interplatform study of steroids collision cross section by traveling wave ion mobility spectrometry. *Anal Chem* 92:5013–5022.
- Higgins Keppler EA**, Jenkins CL, Davis TJ, Bean HD. 2018. Advances in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. *TrAC Trends Anal Chem* 109:275–286.
- Hines KM**, May JC, McLean JA, Xu L. 2016. Evaluation of collision cross section calibrants for structural analysis of lipids by traveling wave ion mobility-mass spectrometry. *Anal Chem* 88:7329–7336.
- Hines KM**, Herron J, Xu L. 2017a. Assessment of altered lipid homeostasis by HILIC-ion mobility-mass spectrometry-based lipidomics. *J Lipid Res* 58:809–819.
- Hines KM**, Ross DH, Davidson KL, Bush MF, Xu L. 2017b. Large scale structural characterization of drug and drug-like compounds by high-throughput ion mobility-mass spectrometry. *Anal Chem* 89:9023–9030.
- Hinnenkamp V**, Klein J, Meckelmann SW, Balsaa P, Schmidt TC, Schmitz OJ. 2018. Comparison of CCS values determined by traveling wave ion mobility mass spectrometry and drift tube ion mobility mass spectrometry. *Anal Chem* 90:12042–12050.
- Hinz C**, Liggi S, Griffin JL. 2018. The potential of ion mobility mass spectrometry for high-throughput and high-resolution lipidomics. *Curr Opin Chem Biol* 42:42–50.
- Hofmann J**, Hahn HS, Seeberger PH, Pagel K. 2015. Identification of Carbohydrate Anomers Using Ion Mobility–Mass Spectrometry. *Nature* 526:241–244.
- Hofmann J**, Pagel K. 2017. Glycan Analysis by Ion Mobility–Mass Spectrometry. *Angew Chem Int Ed* 56:8342–8349.
- Hofmann J**, Stuckmann A, Crispin M, Harvey DJ, Pagel K, Struwe WB. 2017. Identification of Lewis and Blood Group Carbohydrate Epitopes by Ion Mobility-Tandem-Mass Spectrometry Fingerprinting. *Anal Chem* 89:2318–2325.
- Hollerbach AL**, Li A, Prabhakaran A, Nagy G, Harrilal CP, Conant CR, Norheim RV, Schimelfenig CE, Anderson GA, Garimella SVB, Smith RD, Ibrahim YM. 2020. Ultra-high-resolution ion mobility separations over extended path lengths and mobility ranges achieved using a multilevel structures for lossless ion manipulations module. *Anal Chem* 92:7972–7979.
- Huang Y**, Dodds ED. 2013. Ion mobility studies of carbohydrates as group I adducts: Isomer specific collisional cross section

dependence on metal ion radius. *Anal Chem* 85:9728–9735.

Huang Y, Dodds ED. 2015. Discrimination of isomeric carbohydrates as the electron transfer products of group II cation adducts by ion mobility spectrometry and tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 87:5664–5668.

Hughes C, Vissers JPC, Richardson K, Wildgoose J, Grzyb A, Langridge JI. Travelling wave ion mobility assisted duty cycle enhancements for non-targeted and targeted proteomics experiments. Proceedings of the 61st ASMS conference on Mass

Spectrometry and Allied Topics, June 9–13, 2013, Minneapolis.

Ibrahim YM, Garimella SVB, Prost SA, Wojcik R, Norheim RV, Baker ES, Rusyn I, Smith RD. 2016. Development of an ion mobility spectrometry-orbitrap mass spectrometer platform. *Anal Chem* 88:12152–12160.

Ichou F, Schwarzenberg A, Lesage D, Alves S, Junot C, Machuron-Mandard X, Tabet JC. 2014. Comparison of the activation time effects and the internal energy distributions for the CID, PQD and HCD excitation modes. *J Mass Spectrom* 49:498–508.

Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. 2019. Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 191:105375.

Jackson SN, Ugarov M, Post JD, Egan T, Langlais D, Schultz JA, Woods AS. 2008. A study of phospholipids by ion mobility TOFMS. *J Am Soc Mass Spectrom* 19:1655–1662.

Jeanne Dit Fouque K, Ramirez CE, Lewis RL, Koelmel JP, Garrett TJ, Yost RA, Fernandez-Lima F. 2019. Effective liquid chromatography-trapped ion mobility spectrometry-mass spectrometry separation of isomeric lipid species. *Anal Chem* 91:5021–5027.

Jin C, Harvey DJ, Struwe WB, Karlsson NG. 2019. Separation of Isomeric O-Glycans by Ion Mobility and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal Chem* 91:10604–10613.

Kailemia MJ, Ruhaak LR, Lebrilla CB, Amster IJ. 2014. Oligosaccharide Analysis by Mass Spectrometry: A Review of Recent Developments. *Anal Chem* 86:196–212.

Kaplan K, Dwivedi P, Davidson S, Yang Q, Tso P, Siems W, Hill HH. 2009. Monitoring dynamic changes in lymph metabolome of fasting and fed rats by electrospray ionization-ion mobility mass spectrometry (ESI-IMMS). *Anal Chem* 81:7944–7953.

Kaszycki JL, La Rotta A, Colsch B, Fenaille F, Daully C, Kamleh A, Wu C. 2019. Separation of biologically relevant isomers on an orbitrap mass spectrometer using high-resolution drift tube ion mobility and varied drift gas mixtures. *Rapid Commun Mass Spectrom* 33:3–10.

Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Walker S, Widmer M. 2020. Does the ion mobility resolving power as provided by commercially available ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry instruments permit the unambiguous identification of small molecules in complex matrices? *Anal Chim Acta* 1107:113–126.

King AM, Mullin LG, Wilson ID, Coen M, Rainville PD, Plumb RS, Gethings LA, Maker G, Trengove R. 2019. Development of a rapid profiling method for the analysis of polar analytes in urine using HILIC–MS and ion mobility enabled HILIC–MS. *Metabolomics* 15, 17

Koeniger SL, Merenbloom SI, Valentine SJ, Jarrold MF, Udseth HR, Smith RD, Clemmer DE. 2006. An IMS–IMS analogue of MS–MS. *Anal Chem* 78:4161–4174.

Kolakowski BM, Mester Z. 2007. Review of applications of highfield asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS). *The Analyst* 132:842.

Kunz C, Meyer C, Collado MC, Geiger L, García-Mantrana I, Bertua-Ríos B, Martínez-Costa C, Borsch C, Rudloff S. 2017. Influence of Gestational Age, Secretor, and Lewis Blood Group Status on the Oligosaccharide Content of Human Milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 64:789–798.

Kurulugama RT, Darland E, Kuhlmann F, Stafford G, Fjeldsted J. 2015. Evaluation of drift gas selection in complex sample analyses using a high performance drift tube ion mobility-QTOF mass spectrometer. *The Analyst* 140:6834–6844.

Kyle JE, Casey CP, Stratton KG, Zink EM, Kim YM, Zheng X, Monroe ME, Weitz KK, Bloodsworth KJ, Orton DJ, Ibrahim YM, Moore RJ, Lee CG, Pedersen C, Orwoll E, Smith RD, Burnum-Johnson KE, Baker ES. 2017. Comparing identified and statistically significant lipids and polar metabolites in 15-year old serum and dried blood spot samples for longitudinal studies: Comparing lipids and metabolites in serum and DBS samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 31:447–456.

Lalli PM, Corilo YE, Fasciotti M, Riccio MF, de Sa GF, Daroda RJ, Souza GHMF, McCullagh M, Bartberger MD, Eberlin MN, Campuzano DG. 2013. Baseline resolution of isomers by traveling wave ion mobility mass spectrometry: investigating the effects of polarizable drift gases and ionic charge distribution: Polarizable drift gases and isomer separation. *J Mass Spectrom* 48:989–997.

Lanucara F, Holman SW, Gray CJ, Evers CE. 2014. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nat Chem* 6:281–294.

Lapthorn C, Dines TJ, Chowdhry BZ, Perkins GL, Pullen FS. 2013a. Can ion mobility mass spectrometry and density functional theory help elucidate protonation sites in “small” molecules?: IMS and DFT help elucidate protonation sites in “small” molecules? *Rapid Commun Mass Spectrom* 27:2399–2410.

- Laphorn C**, Pullen F, Chowdhry BZ. 2013b. Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: Separating and assigning structures to ions. *Mass Spectrom Rev* 32:43–71.
- Lareau NM**, May JC, McLean JA. 2015. Non-Derivatized Glycan Analysis by Reverse Phase Liquid Chromatography and Ion Mobility-Mass Spectrometry. *The Analyst* 140:3335–3338.
- Leaptrot KL**, May JC, Dodds JN, McLean JA. 2019. Ion mobility conformational lipid atlas for high confidence lipidomics. *Nat Commun*, 10 10.
- Levy AJ**, Oranzi NR, Ahmadireskety A, Kemperman RHJ, Wei MS, Yost RA. 2019. Recent progress in metabolomics using ion mobility-mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 116:274–281.
- Li H**, Bendiak B, Siems WF, Gang DR, Hill HH. 2013. Ion Mobility Mass Spectrometry Analysis of Isomeric Disaccharide Precursor, Product and Cluster Ions: Analysis of Isomeric Disaccharide Precursor, Product and Cluster Ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 27:2699–2709
- Li L**, McKenna KR, Li Z, Yadav M, Krishnamurthy R, Liotta CL, Fernández FM. 2018. Rapid resolution of carbohydrate isomers via multi-site derivatization ion mobility-mass spectrometry. *The Analyst* 143:949–955.
- Lintonen TPI**, Baker PRS, Suoniemi M, Ubhi BK, Koistinen KM, Duchoslav E, Campbell JL, Ekroos K. 2014. Differential mobility spectrometry-driven shotgun lipidomics. *Anal Chem* 86:9662–9669.
- Lipok C**, Hippler J, Schmitz OJ. 2018. A four dimensional separation method based on continuous heart-cutting gas chromatography with ion mobility and high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1536:50–57.
- Liu FC**, Ridgeway ME, Park MA, Bleiholder C. 2018. Tandem trapped ion mobility spectrometry. *The Analyst* 143:2249–2258.
- Lobo RA**. 1995. Benefits and risks of estrogen replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 173:982–989.
- Lu Y**, O'Donnell RM, Harrington PB. 2009. Detection of cocaine and its metabolites in urine using solid phase extraction-ion mobility spectrometry with alternating least squares. *Forensic Sci Int* 189:54–59.
- Luo MD**, Zhou ZW, Zhu ZJ. 2020. The application of ion mobility mass spectrometry in untargeted metabolomics: From separation to identification. *J Anal Test* 4:163–174.
- Lv W**, Shi X, Wang S, Xu G. 2019. Multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry for metabolomic and lipidomic analyses. *TrAC Trends Anal Chem* 120:115302.
- Mairinger T**, Causon TJ, Hann S. 2018. The potential of ion mobility-mass spectrometry for non-targeted metabolomics. *Curr Opin Chem Biol* 42:9–15.
- Mäkinen MA**, Anttalainen OA, Sillanpää MET. 2010. Ion Mobility Spectrometry and Its Applications in Detection of Chemical Warfare Agents. *Anal Chem* 82:9594–9600.
- Malkar A**, Devenport NA, Martin HJ, Patel P, Turner MA, Watson P, Maughan RJ, Reid HJ, Sharp BL, Thomas CLP, Reynolds JC, Creaser CS. 2013. Metabolic profiling of human saliva before and after induced physiological stress by ultrahigh performance liquid chromatography-ion mobility-mass spectrometry. *Metabolomics* 9:1192–1201.
- Mank M**, Welsch P, Heck AJR, Stahl B. 2018. Label-Free Targeted LC-ESI-MS² Analysis of Human Milk Oligosaccharides (HMOS) and Related Human Milk Groups with Enhanced Structural Selectivity. *Anal Bional Chem* 411:231–250.
- Mantovani V**, Galeotti F, Maccari F, Volpi N. 2018. Recent Advances in Capillary Electrophoresis Separation of Monosaccharides, Oligosaccharides, and Polysaccharides. *Electrophoresis* 39:179–189.
- Martínez-Lozano P**, Criado E, Vidal G, Cristoni S, Franzoso F, Piatti M, Brambilla P. 2013. Differential mobility analysis-mass spectrometry coupled to XCMS algorithm as a novel analytical platform for metabolic profiling. *Metabolomics* 9:30–43.
- Mason EA**, Schamp HW. 1958. Mobility of gaseous ions in weak electric fields. *Ann Phys* 4:233–270.
- May JC**, Goodwin CR, Lareau NM, Leaptrot KL, Morris CB, Kurulugama RT, Mordehai A, Klein C, Barry W, Darland E, Overney G, Imatani K, Stafford GC, Fjeldsted JC, McLean JA. 2014. Conformational ordering of biomolecules in the gas phase: nitrogen collision cross sections measured on a prototype high resolution drift tube ion mobility-mass spectrometer. *Anal Chem* 86:2107–2116.
- May JC**, McLean JA. 2015. Ion mobility-mass spectrometry: time dispersive instrumentation. *Anal Chem* 87:1422–1436.
- May JC**, Morris CB, McLean JA. 2017. Ion mobility collision cross section compendium. *Anal Chem* 89:1032–1044.
- May JC**, Jurneczko E, Stow SM, Kratochvil I, Kalkhof S, McLean JA. 2018. Conformational landscapes of ubiquitin, cytochrome c, and myoglobin: Uniform field ion mobility measurements in helium and nitrogen drift gas. *Int J Mass Spectrom* 427:79–90.
- May JC**, Knochenmuss R, Fjeldsted JC, McLean JA. 2020. Resolution of isomeric mixtures in ion mobility using a combined demultiplexing and peak deconvolution technique. *Anal Chem* 92:9482–9492.
- Mechref Y**, Novotny MV. 2009. Glycomic Analysis by Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 28:207–222.
- Mehra R**, Kelly P. 2006. Milk Oligosaccharides: Structural and Technological Aspects. *Int Dairy J* 7.

- Meier F**, Brunner AD, Koch S, Koch H, Lubeck M, Krause M, Goedecke N, Deckers J, Kosinski T, Park MA, Bache N, Hoerning O, Cox J, Rather O, Mann M. 2018. Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. *Mol Cell Proteomics* 17:2534-2545
- Merenbloom SI**, Bohrer BC, Koeniger SL, Clemmer DE. 2007. Assessing the peak capacity of IMS-IMS separations of tryptic peptide ions in He at 300 K. *Anal Chem* 79:515-522.
- Merenbloom SI**, Glaskin RS, Henson ZB, Clemmer DE. 2009. High-resolution ion cyclotron mobility spectrometry. *Anal Chem* 81:1482-1487.
- Metz TO**, Baker ES, Schymanski EL, Renslow RS, Thomas DG, Causon TJ, Webb IK, Hann S, Smith RD, Teeguarden JG. 2017. Integrating ion mobility spectrometry into mass spectrometry-based exposome measurements: What can it add and how far can it go? *Bioanalysis* 9:81-98.
- Miura D**, Fujimura Y, Wariishi H. 2012. In situ metabolomic mass spectrometry imaging: Recent advances and difficulties. *J Proteomics* 75:5052-5060.
- Mirgorodskaya E**, Karlsson NG, Sihlbom C, Larson G, Nilsson CL. 2018. Cracking the Sugar Code by Mass Spectrometry: An Invited Perspective in Honor of Dr. Catherine E. Costello, Recipient of the 2017 ASMS Distinguished Contribution Award. *J Am Soc Mass Spectrom* 29:1065-1074.
- Mollerup CB**, Mardal M, Dalsgaard PW, Linnet K, Barron LP. 2018. Prediction of collision cross section and retention time for broad scope screening in gradient reversed-phase liquid chromatography-ion mobility-high resolution accurate mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1542:82-88.
- Morrison KA**, Clowers BH. 2018. Contemporary Glycomic Approaches Using Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* 42:119-129.
- Morrison KA**, Clowers BH. 2019. Fundamentals and applications of incorporating chromatographic separations with ion mobilitymass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 119:115625.
- Morsa D**, Hanozin E, Eppe G, Quinton L, Gabelica V, Pauw ED. 2020. Effective Temperature and Structural Rearrangement in Trapped Ion Mobility Spectrometry. *Anal Chem* 92:4573-4582.
- Mu Y**, Schulz B, Ferro V. 2018. Applications of Ion Mobility-Mass Spectrometry in Carbohydrate Chemistry and Glycobiology. *Molecules* 23:2557.
- Munisamy SM**, Chambliss CK, Becker C. 2012. Direct infusion electrospray ionization-ion mobility-high resolution mass spectrometry (DIESI-IM-HRMS) for rapid characterization of potential bioprocess streams. *J Am Soc Mass Spectrom* 23:1250-1259.
- Nagy G**, Attah IK, Garimella SVB, Tang K, Ibrahim YM, Baker ES, Smith RD. 2018. Unraveling the Isomeric Heterogeneity of Glycans: Ion Mobility Separations in Structures for Lossless Ion Manipulations. *Chem. Commun.* 54:11701-11704.
- Naylor CN**, Reinecke T, Clowers BH. 2020. Assessing the impact of drift gas polarizability in polyatomic ion mobility experiments. *Anal Chem* 92:4226-4234.
- Neelamegham S**, Aoki-Kinoshita K, Bolton E, Frank M, Lisacek F, Lütke T, O'Boyle N, Packer NH, Stanley P, Toukach P, Varki A, Woods RJ, The SNFG Discussion Group, Darvill A, Dell A, Henrissat B, Bertozzi C, Hart G, Narimatsu H, Freeze H, Yamada I, Paulson J, Prestegard J, Marth J, Vliegthart JFG, Etzler M, Aebi M, Kanehisa M, Taniguchi N, Edwards N, Rudd P, Seeberger P, Mazumder R, Ranzinger R, Cummings R, Schnaar R, Perez S, Kornfeld S, Kinoshita T, York W, Knirel Y. 2019. Updates to the Symbol Nomenclature for Glycans Guidelines. *Glycobiology* 29:620-624.
- Nichols CM**, Dodds JN, Rose BS, Picache JA, Morris CB, Codreanu SG, May JC, Sherrod SD, McLean JA. 2018. Untargeted molecular discovery in primary metabolism: Collision cross section as a molecular descriptor in ion mobility-mass spectrometry. *Anal Chem* 90:14484-14492.
- Nye LC**, Williams JP, Munjoma NC, Letertre MPM, Coen M, Bouwmeester R, Martens L, Swann JR, Nicholson JK, Plumb RS, McCullagh M, Gethings LA, Lai S, Langridge JI, Vissers JPC, Wilson ID. 2019. A comparison of collision cross section values obtained via travelling wave ion mobility-mass spectrometry and ultra high performance liquid chromatography-ion mobility-mass spectrometry : Application to the characterisation of metabolites in rat urine. *J Chromatogr A* 1602:386-396.
- Odenkirk MT**, Baker ES. 2020. Utilizing drift tube ion mobility spectrometry for the evaluation of metabolites and xenobiotics. In: Paglia G, Astarita G, editors. *Ion Mobility-Mass Spectrometry: Methods and Protocols. Springer Protocols*, pp. 35-54.
- Oursel S**, Cholet S, Junot C, Fenaille F. 2017. Comparative Analysis of Native and Permethylated Human Milk Oligosaccharides by Liquid Chromatography Coupled to High Resolution Mass Spectrometry. *J Chromatogr B* 1071:49-57.
- Oranzi NR**, Kemperman RHJ, Wei MS, Petkovska VI, Granato SW, Rochon B, Kaszycki J, La Rotta A, Jeanne Dit Fouque K, Fernandez-Lima F, Yost RA. 2019. Measuring the integrity of gas-phase conformers of sodiated 25-hydroxyvitamin d3 by drift tube, traveling wave, trapped, and high-field asymmetric ion mobility. *Anal Chem* 91:4092-4099.

- Pacini T**, Fu W, Gudmundsson S, Chiaravalle AE, Brynjolfsson S, Palsson BO, Astarita G, Paglia G. 2015. Multidimensional analytical approach based on UHPLC-UV-ion mobility-MS for the screening of natural pigments. *Anal Chem* 87:2593–2599.
- Pagel K**, Harvey DJ. 2013. Ion mobility-mass spectrometry of complex carbohydrates: collision cross sections of sodiated N-linked glycans. *Anal Chem* 85:1538–1545.
- Paglia G**, Williams JP, Menikarachchi L, Thompson JW, Tyldesley-Worster R, Halldórsson S, Rolfsson O, Moseley A, Grant D, Langridge J, Palsson BO, Astarita G. 2014. Ion mobility derived collision cross sections to support metabolomics applications. *Anal Chem* 86:3985–3993.
- Paglia G**, Angel P, Williams JP, Richardson K, Olivos HJ, Thompson JW, Menikarachchi L, Lai S, Walsh C, Moseley A, Plumb RS, Grant DF, Palsson BO, Langridge J, Geromanos S, Astarita G. 2015. Ion mobility-derived collision cross section as an additional measure for lipid fingerprinting and identification. *Anal Chem* 87:1137–1144.
- Paglia G**, Stocchero M, Cacciatore S, Lai S, Angel P, Alam MT, Keller M, Ralser M, Astarita G. 2016. Unbiased metabolomic investigation of alzheimer's disease brain points to dysregulation of mitochondrial aspartate metabolism. *J Proteome Res* 15:608–618.
- Paglia G**, Astarita G. 2017. Metabolomics and lipidomics using traveling-wave ion mobility mass spectrometry. *Nat Protoc* 12: 797–813.
- Patti GJ**, Yanes O, Siuzdak G. 2012. Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:263–269.
- Picache JA**, Rose BS, Balinski A, Leaptrot KL, Sherrod SD, May JC, McLean JA. 2019. Collision Cross Section Compendium to Annotate and Predict Multi-Omic Compound Identities. *Chem Sci* 10:983–993.
- Plante PL**, Francovic-Fontaine E, May JC, McLean JA, Baker ES, Laviolette F, Marchand M, Corbeil J. 2019. Predicting ion mobility collision cross-sections using a deep neural network : DeepCCS. *Anal Chem* 91:5191–5199.
- Plaza-Díaz J**, Fontana L, Gil A. 2018. Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. *Nutrients* 10:1038.
- Plumb RS**, Johnson KA, Rainville PD, Smith BW, Wilson ID, Castro-Perez JM, Nicholson JK. 2006. UPLC/MSE; A new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:1989–1994.
- Porfirio S**, Archer-Hartmann S, Moreau GB, Ramakrishnan G, Haque R, Kirkpatrick BD, Petri WA, Azadi P. 2020. New Strategies for Profiling and Characterization of Human Milk Oligosaccharides. *Glycobiology* 30:774–786.
- Porta T**, Varesio E, Hopfgartner G. 2013. Gas-phase separation of drugs and metabolites using modifier-assisted differential ion mobility spectrometry hyphenated to liquid extraction surface analysis and mass spectrometry. *Anal Chem* 85:11771–11779.
- Prell JS**. 2019. Modelling collisional cross sections. In: Donald WA, Prell JS, editors. *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, pp. 1–22.
- Pringle SD**, Giles K, Wildgoose JL, Williams JP, Slade SE, Thalassinou K, Bateman RH, Bowers MT, Scrivens JH. 2007. An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-TOF instrument. *Int J Mass Spectrom* 261:1–12.
- Przybylski C**, Bonnet V. 2021. Discrimination of Isomeric Trisaccharides and Their Relative Quantification in Honeys Using Trapped Ion Mobility Spectrometry. *Food Chem* 341:128182.
- Purves RW**. 2018. Enhancing biological LC-MS analyses using ion mobility spectrometry. In: Donald WA, Prell JS, editors. *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, pp. 205–240.
- Quin C**, Vicaretti SD, Mohtarudin NA, Garner AM, Vollman DM, Gibson DL, Zandberg WF. 2020. Influence of Sulfonated and Diet-Derived Human Milk Oligosaccharides on the Infant Microbiome and Immune Markers. *J Biol Chem* 295:4035–4048.
- Rainville PD**, Wilson ID, Nicholson JK, Isaac G, Mullin L, Langridge JI, Plumb RS. 2017. Ion mobility spectrometry combined with ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry for metabolic phenotyping of urine: Effects of column length, gradient duration and ion mobility spectrometry on metabolite detection. *Anal Chim Acta* 982:1–8.
- Ramautar R**, Somsen GW, de Jong GJ. 2017. CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2014–2016: CE and CEC. *Electrophoresis* 38:190–202.
- Ray JA**, Kushnir MM, Yost RA, Rockwood AL, Wayne MA. 2015. Performance enhancement in the measurement of 5 endogenous steroids by LC–MS/MS combined with differential ion mobility spectrometry. *Clin Chim Acta* 438:330–336.
- Reading E**, Munoz-Muriedas J, Roberts AD, Dear GJ, Robinson CV, Beaumont C. 2016. Elucidation of drug metabolite structural isomers using molecular modeling coupled with ion mobility mass spectrometry. *Anal Chem* 88:2273–2280.

- Remoroza CA**, Mak TD, De Leoz MLA, Mirokhin YA, Stein SE. 2018. Creating a Mass Spectral Reference Library for Oligosaccharides in Human Milk. *Anal Chem* 12.
- Ridgeway ME**, Wolff JJ, Silveira JA, Lin C, Costello CE, Park MA. 2016. Gated trapped ion mobility spectrometry coupled to fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Int J Ion Mobil Spectrom* 19:77–85.
- Ridgeway ME**, Lubeck M, Jordens J, Mann M, Park MA. 2018. Trapped ion mobility spectrometry: A short review. *Int J Mass Spectrom* 425:22–35.
- Rister AL**, Martin TL, Dodds ED. 2019a. Application of group I metal adduction to the separation of steroids by traveling wave ion mobility spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 30:248–255.
- Rister AL**, Martin TL, Dodds ED. 2019b. Formation of multimeric steroid metal adducts and implications for isomer mixture separation by traveling wave ion mobility spectrometry. *J Mass Spectrom* 54:429–436.
- Rister AL**, Dodds ED. 2019. Ion mobility spectrometry and tandem mass spectrometry analysis of estradiol glucuronide isomers. *J Am Soc Mass Spectrom* 30:2037–2040.
- Ritamo I**, Råbinä J, Natunen S, Valmu L. 2013. Nanoscale Reversed-Phase Liquid Chromatography–Mass Spectrometry of Permethylated N-Glycans. *Anal Bioanal Chem* 405:2469–2480.
- Rižner TL**. 2013. Estrogen biosynthesis, phase I and phase II metabolism, and action in endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol* 381:124–139.
- Robinson EW**, Garcia DE, Leib RD, Williams ER. 2006. Enhanced mixture analysis of poly(ethylene glycol) using high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry combined with fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem* 78:2190–2198.
- Rodriguez-Aller M**, Gurny R, Veuthey JL, Guilleme D. 2013. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. *J Chromatogr A* 1292:2–18.
- Rodriguez C**, Patel AV, Calle EE, Jacob EJ, Thun MJ. 2001. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. *J Am Med Assn* 285:1460–1465.
- Rokushika S**, Hatano H, Hill HH. 1987. Ion mobility spectrometry after supercritical fluid chromatography. *Anal Chem* 59:8–12.
- Ropartz D**, Fanuel M, Ujma J, Palmer M, Giles K, Rogniaux H. 2019. Structure Determination of Large Isomeric Oligosaccharides of Natural Origin through Multipass and Multistage Cyclic Traveling-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal Chem* 91:12030–12037.
- Ruhaak LR**, Lebrilla CB. 2012. Advances in Analysis of Human Milk Oligosaccharides. *Adv Nutr* 3:406S–414S.
- Ruotolo BT**, Gillig KJ, Stone EG, Russell DH. 2002. Peak capacity of ion mobility mass spectrometry: Separation of peptides in helium buffer gas. *J Chromatogr B* 782:385–392.
- Saba J**, Bonneil E, Pomiès C, Eng K, Thibault P. 2009. Enhanced sensitivity in proteomics experiments using FAIMS coupled with a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *J Proteome Res* 8:3355–3366.
- Sahil K**, Prashant B, Akanksha M, Premjeet S, Devashish R. 2011. Gas chromatography–mass spectrometry: Applications. *Int J Pharm Biol Arch* 2:1544–1560.
- Sans M**, Feider CL, Eberlin LS. 2018. Advances in mass spectrometry imaging coupled to ion mobility spectrometry for enhanced imaging of biological tissues. *Curr Opin Chem Biol* 42:138–146.
- Santos F**, Magalhaes S, Henriques MC, Fardilha M, Nunes A. 2018. Spectroscopic features of cancer cells: FTIR spectroscopy as a tool for early diagnosis. *Curr Metabolomics* 6:103–111.
- Saunders KC**, Ghanem A, Boon Hon W, Hilder EF, Haddad PR. 2009. Separation and sample pre-treatment in bioanalysis using monolithic phases: A review. *Anal Chim Acta* 652:22–31.
- Schneider BB**, Covey TR, Coy SL, Krylov EV, Nazarov EG. 2010. Chemical effects in the separation process of a differential mobility/mass spectrometer system. *Anal Chem* 82:1867–1880.
- Schroeder M**, Meyer SW, Heyman HM, Barsch A, Sumner LW. 2019. Generation of a collision cross section library for multidimensional plant metabolomics using UHPLC-trapped ion mobility-MS/MS. *Metabolites* 10:13.
- Shulaev V**, Isaac G. 2018. Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry—A metabolomics perspective. *J Chromatogr B* 1092:499–505.
- Shvartsburg AA**, Fumin L, Tang K, Smith RD. 2006. High-resolution field asymmetric waveform ion mobility spectrometry using new planar geometry analyzers. *Anal Chem* 78:3706–3714.
- Shvartsburg AA**, Seim TA, Danielson WF, Norheim R, Moore RJ, Anderson GA, Smith RD. 2013. High-definition differential ion mobility spectrometry with resolving power up to 500. *J Am Soc Mass Spectrom* 24:109–114.
- Silveira JA**, Ridgeway ME, Laukien FH, Mann M, Park MA. 2017. Parallel accumulation for 100% duty cycle trapped ion mobility mass spectrometry. *Int J of Mass Spectrom* 413:168–175.
- Sinclair E**, Hollywood KA, Yan C, Blankley R, Breitling R, Barran P. 2018. Mobilising ion mobility mass spectrometry for metabolomics. *The Analyst* 143:4783–4788.

- Smith CA**, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. 2006. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 78:779–787.
- Smolinska A**, Blanchet L, Buydens LMC, Wijmenga SS. 2012. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Anal Chim Acta* 750:82–97.
- Soldin SJ**, Soldin OP. 2009. Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 55:1061–1066.
- Soltwisch J**, Heijs B, Koch A, Vens-Cappell S, Höhndorf J, Dreisewerd K. 2020. MALDI-2 on a Trapped Ion Mobility Quadrupole Time-of-Flight Instrument for Rapid Mass Spectrometry Imaging and Ion Mobility Separation of Complex Lipid Profiles. *Anal Chem* 92:8697–8703
- Spraggins JM**, Djambazova KV, Rivera ES, Migas LG, Neumann EK, Fuetterer A, Suetering J, Goedecke N, Ly A, Van de Plas R, Caprioli RM. 2019. High-Performance Molecular Imaging with MALDI Trapped Ion-Mobility Time-of-Flight (timsTOF) Mass Spectrometry. *Anal Chem* 91:14552–14560
- Stephan S**, Hippler J, Köhler T, Deeb AA, Schmidt TC, Schmitz OJ. 2016a. Contaminant screening of wastewater with HPLC-IMqTOF-MS and LC+LC-IM-qTOF-MS using a CCS database. *Anal Bioanal Chem* 408:6545–6555.
- Stephan S**, Jakob C, Hippler J, Schmitz OJ. 2016b. A novel four dimensional analytical approach for analysis of complex samples. *Anal Bioanal Chem* 408:3751–3759.
- Stow SM**, Causon TJ, Zheng X, Kurulugama RT, Mairinger T, May JC, Rennie EE, Baker ES, Smith RD, McLean JA, Hann S, Fjeldsted JC. 2017. An interlaboratory evaluation of drift tube ion mobility–mass spectrometry collision cross section measurements. *Anal Chem* 89:9048–9055.
- Struwe WB**, Pagel K, Benesch JLP, Harvey DJ, Campbell MP. 2016a. GlucoMob: an ion mobility-mass spectrometry collision cross section database for glycomics. *Glycoconj J* 33:399–404.
- Struwe WB**, Baldauf C, Hofmann J, Rudd PM, Pagel K. 2016b. Ion Mobility Separation of Deprotonated Oligosaccharide Isomers – Evidence for Gas-Phase Charge Migration. *Chem. Commun.* 52:12353–12356.
- Sumner LW**, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Fan TWM, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL, Hankemeier T, Hardy N, Harnly J, Higashi R, Kopka J, Lane AN, Lindon JC, Marriott P, Nicholls AW, Reilly MD, Thaden JJ, Viant MR. 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 3:211–221.
- Swearingen KE**, Moritz RL. 2012. High field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) for mass spectrometry based proteomics. *Expert Rev Proteomics* 9:505–517.
- Tian H**, Li S, Wen H, Zhang X, Li J. 2020. Volatile organic compounds fingerprinting in faeces and urine of Alzheimer's disease model SAMP8 mice by headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry and headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1614:460717.
- Tolmachev AV**, Webb IK, Ibrahim YM, Garimella SVB, Zhang X, Anderson GA, Smith RD. 2014. Characterization of ion dynamics in structures for lossless ion manipulations. *Anal Chem* 86:9162–9168.
- Tose LV**, Benigni P, Leyva D, Sundberg A, Ramírez CE, Ridgeway ME, Park MA, Romão W, Jaffé R, Fernandez-Lima F. 2018. Coupling trapped ion mobility spectrometry to mass spectrometry: Trapped ion mobility spectrometry-time-of-flight mass spectrometry versus trapped ion mobility spectrometry-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 32:1287–1295.
- Ujma J**, Ropartz D, Giles K, Richardson K, Langridge D, Wildgoose J, Green M, Pringle S. 2019. Cyclic ion mobility mass spectrometry distinguishes anomers and open-ring forms of pentasaccharides. *J Am Soc Mass Spectrom* 30:1028–1037.
- Viant MR**, Kurland IJ, Jones MR, Dunn WB. 2017. How close are we to complete annotation of metabolomes? *Curr Opin Chem Biol* 36, 64–69.
- Wang Q**, Rangiah K, Mesaros C, Snyder NW, Vachani A, Song H, Blair IA. 2015. Ultrasensitive quantification of serum estrogens in postmenopausal women and older men by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Steroids* 96:140–152.
- Wang M**, Zhao Z, Zhao A, Zhang J, Wu W, Ren Z, Wang P, Zhang Y. 2020. Neutral Human Milk Oligosaccharides Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal and Infant Characteristics. *Nutrients* 12:826.
- Waraksa E**, Perycz U, Namieśnik J, Sillanpää M, Dymerski T, Wójtowicz M, Puton J. 2016. Dopants and gas modifiers in ion mobility spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 82:237–249.
- Wei J**, Tang Y, Ridgeway ME, Park MA, Costello CE, Lin C. 2020. Accurate Identification of Isomeric Glycans by Trapped Ion Mobility Spectrometry-Electronic Excitation Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* 92:13211–13220.
- Whitehouse CM**, Dreyer RN, Yamashita M., Fenn JB. 1985. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* 57:675–679.
- Wu Q**, Wang JY, Han DQ, Yao ZP. 2020. Recent advances in differentiation of isomers by ion mobility mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 124:115801.
- Wu S**, Tao N, German JB, Grimm R, Lebrilla CB. 2010. Development of an Annotated Library of Neutral Human Milk Oligosaccharides. *J Proteome Res* 9: 4138–4151.

- Wuhrer M**, Deelder AM, van der Burgt YEM. 2011. Mass Spectrometric Glycan Rearrangements. *Mass Spectrom Rev* 30:664–680.
- Xian F**, Hendrickson CL, Marshall AG. 2012. High resolution mass spectrometry. *Anal Chem* 84:708–719.
- Xiao JF**, Zhou B, Ransom HW. 2012. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *TrAC Trends Anal Chem* 32:1–14.
- Xie C**, Wu Q, Zhang S, Wang C, Gao W, Yu J, Tang K. 2020. Improving Glycan Isomeric Separation via Metal Ion Incorporation for Drift Tube Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Talanta* 211:120719.
- Yamaguchi Y**, Nishima W, Re S, Sugita Y. 2012. Confident Identification of Isomeric *N*-Glycan Structures by Combined Ion Mobility Mass Spectrometry and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography: Identification of Isomeric *N*-Glycans by IM-MS and HILIC. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 26:2877–2884.
- Yamashita M**, Fenn JB. 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem* 88:4451–4459.
- Yu X**, Yao ZP. 2017. Chiral recognition and determination of enantiomeric excess by mass spectrometry: A review. *Anal Chim Acta* 968:1–20.
- Zandkarimi F**, Brown LM. 2019. Application of ion mobility mass spectrometry in lipidomics. In: Woods AG, Darie CC, editors. *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*. Springer, pp. 317–326.
- Zang X**, Monge ME, Gaul DA, Fernández FM. 2018. Flow injection–traveling-wave ion mobility–mass spectrometry for prostate-cancer metabolomics. *Anal Chem* 90:13767–13774.
- Zhang X**, Ibrahim YM, Chen TC, Kyle JE, Norheim RV, Monroe ME, Smith RD, Baker ES. 2015. Enhancing biological analyses with three dimensional field asymmetric ion mobility, low field drift tube ion mobility and mass spectrometry (uFAIMS/IMS-MS). *The Analyst* 140:6955–6963.
- Zhang X**, Romm M, Zheng X, Zink EM, Kim YM, Burnum-Johnson KE, Orton DJ, Apffel A, Ibrahim YM, Monroe ME, Moore RJ, Smith JN, Ma J, Renslow RS, Thomas DG, Blackwell AE, Swinford G, Sausen J, Kurulugama RT, Eno N, Darland E, Stafford G, Fjeldsted J, Metz TO, Teeguarden JG, Smith RD, Baker ES. 2016. SPE-IMS-MS: An automated platform for sub-sixty second surveillance of endogenous metabolites and xenobiotics in biofluids. *MClin Mass Spectrom* 2:1–10.
- Zhang X**, Quinn K, Cruickshank-Quinn C, Reisdorph R, Reisdorph N. 2018. The application of ion mobility mass spectrometry to metabolomics. *Curr Opin Chem Biol* 42:60–66.
- Zheng X**, Aly NA, Zhou Y, Dupuis KT, Bilbao A, Paurus VL, Orton DJ, Wilson R, Payne SH, Smith RD, Baker ES. 2017a. A structural examination and collision cross section database for over 500 metabolites and xenobiotics using drift tube ion mobility spectrometry. *Chem Sci* 8:7724–7736.
- Zheng X**, Wojcik R, Zhang X, Ibrahim YM, Burnum-Johnson KE, Orton DJ, Monroe ME, Moore RJ, Smith RD, Baker ES. 2017b. Coupling front-end separations, ion mobility spectrometry, and mass spectrometry for enhanced multidimensional biological and environmental analyses. *Annu Rev Anal Chem* 10:71–92.
- Zheng X**, Zhang X, Schocker NS, Renslow RS, Orton DJ, Khamsi J, Ashmus RA, Almeida IC, Tang K, Costello CE, Smith RD, Michael K, Baker ES. 2017c. Enhancing glycan isomer separations with metal ions and positive and negative polarity ion mobility spectrometry-mass spectrometry analyses. *Anal Bioanal Chem* 409:467–476.
- Zhong X**, Chen Z, Snovida S, Liu Y, Rogers JC, Li L. 2015. Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry for quantitative analysis of glycans labeled with multiplex carbonyl-reactive tandem mass tags. *Anal Chem* 87:6527–6534.
- Zhong Y**, Hyung SJ, Ruotolo BT. 2012. Ion mobility–mass spectrometry for structural proteomics. *Expert Rev Proteomics* 9:47–58.
- Zhou Z**, Shen X, Tu J, Zhu ZJ. 2016. Large-scale prediction of collision cross-section values for metabolites in ion mobility-mass spectrometry. *Anal Chem* 88:11084–11091.
- Zhou Z**, Tu J, Xiong X, Shen X, Zhu ZJ. 2017. LipidCCS: Prediction of collision cross-section values for lipids with high precision to support ion mobility–mass spectrometry-based lipidomics. *Anal Chem* 89:9559–9566.
- Zhou Z**, Luo M, Chen X, Yin Y, Xiong X, Wang R, Zhu ZJ. 2020. Ion mobility collision cross-section atlas for known and unknown metabolite annotation in untargeted metabolomics. *Nat Commun* 11:4334.
- Zietek BM**, Mengerink Y, Jordens J, Somsen GW, Kool J, Honing M. 2018. Adduct-ion formation in trapped ion mobility spectrometry as a potential tool for studying molecular structures and conformations. *Int J Ion Mobil Spectrom* 21:19–32.
- Zivkovic AM**, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. 2011. Human Milk Glycobiome and Its Impact on the Infant Gastrointestinal Microbiota. *Proc Natl Acad Sci* 108:4653–4658.

ANNEXE

Principe de fonctionnement de la cellule TIMS (Trapped Ion Mobility Spectrometry)

1. Introduction

Initialement connue comme la chromatographie ionique, la mobilité ionique s'est beaucoup développée ces dernières décennies de par ses capacités d'analyse à haut débit ainsi que sa haute sensibilité et sélectivité (Dodds and Baker, 2019). Cette technique consiste à séparer des composés ionisés à l'état gazeux en fonction de leur forme et de leur charge. Elle est encore aujourd'hui beaucoup utilisée en tant qu'appareil autonome et portable pour la détection de composés à des niveaux de traces dans des échantillons gazeux. Elle est notamment employée en routine pour la détection d'explosifs (Ewing et al., 2001) ou d'agents chimiques dans des opérations militaires (Mäkinen et al., 2010), des événements sportifs ou encore des aéroports (Eiceman et al., 2002). Ce principe de séparation d'ions se prête également facilement au couplage avec la spectrométrie de masse pour des analyses plus spécifiques, ce qui permet d'utiliser le couplage mobilité ionique - spectrométrie de masse dans d'autres domaines que ceux précédemment cités, tels que l'environnement, les analyses métabolomiques ou encore les diagnostics cliniques (Eiceman et al., 2013).

Le principe général de la mobilité ionique et les différents types de cellules sont décrits dans le **Chapitre I** du manuscrit. Nous présentons, ici, la cellule de mobilité TIMS (Trapped Ion Mobility Spectrometry-Time of Flight) développée relativement récemment (Fernandez-Lima et al., 2011b; Hernandez et al., 2014) et implémentée dans l'instrument timsTOF commercialisé par Bruker Daltonics (Silveira et al., 2017). Le principe de fonctionnement de ce type de technologie est inversé par rapport à celui de la mobilité classique. En effet, dans la cellule TIMS les ions sont maintenus stationnaires dans un gaz tampon en mouvement grâce à un champ électrique qui compense leur force de dérive. Selon leur taille et leur charge, chaque ion est alors piégé à un endroit donné sur le gradient de champ électrique. Une élution progressive permet de séparer ces différents ions.

2. Principe de fonctionnement

La cellule TIMS est divisée en 3 sections : la zone d'entrée, la zone d'analyse en mobilité et la zone de sortie. Ces sections sont constituées d'un ensemble d'électrodes circulaires chacune divisée en 4 segments électriquement isolés les uns des autres. Ces électrodes ont toutes le même diamètre extérieur, seul leur diamètre intérieur varie. Il passe de 20 à 8 mm dans la zone d'entrée, reste constant dans la zone d'analyse et enfin diminue de 8 à 1 mm dans la zone de sortie (pour le prototype d'origine). Dans la région d'entrée et de sortie, le potentiel RF (Radio Frequency) appliqué aux électrodes est déphasé de 180° les unes des autres, créant un champ dipolaire qui éloigne les ions de la paroi de la cellule. Dans la région d'analyse en mobilité, la phase du potentiel RF alterne non pas entre les électrodes adjacentes mais entre les segments adjacents, ce qui crée un champ quadripolaire permettant de confiner radialement les ions et d'éviter leur perte due à la diffusion. Ce confinement conduit à une meilleure transmission des ions et donc à une meilleure sensibilité.

La vitesse du gaz est régulée par la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la cellule. Cette différence de quelques mbars produit des vitesses de l'ordre de 150 m.s^{-1} . La plupart du temps, le diazote est utilisé comme gaz dans les cellules de mobilité et c'est notamment le cas dans l'instrument commercial timsTOF (Bruker Daltonics), dont le schéma est représenté en

Figure 1.

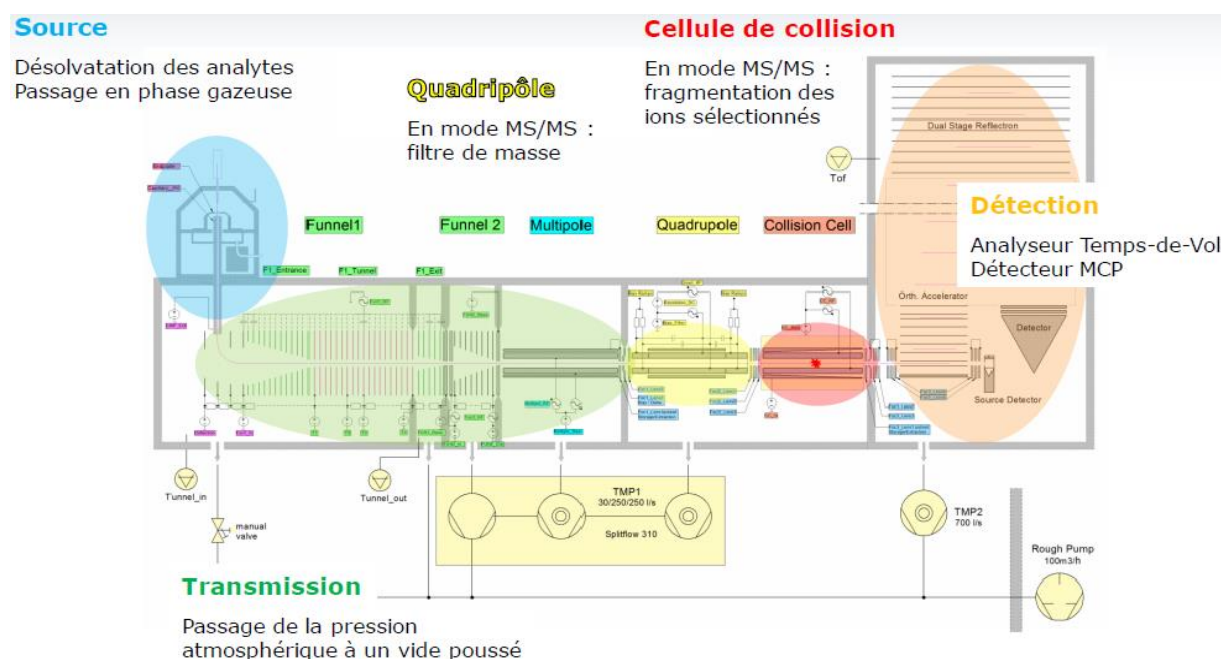


Figure 1. Schéma de l'instrument TIMS TOF (Bruker Daltonics) adapté du manuel timsTOF, Bases et théorie présenté par Aurélie Mème et Alexandre Verdu.

Les ions sont produits par une source d'ionisation électrospray (ESI) puis se dirigent à travers un capillaire en verre dans l'interface de la source où ils sont réfléchis vers la zone d'entrée de la cellule grâce à une plaque déflectrice répulsive. Le TIMS peut, alors, être utilisé dans plusieurs modes de fonctionnement.

Il peut opérer en mode transmission seule, dans ce cas les ions sont transmis à l'analyseur en masse sans séparation en mobilité en appliquant des potentiels plus élevés aux électrodes d'entrée que celles de sortie pour être plus répulsives. Dans ce mode, des spectres de masse classiques sont produits.

En mode mobilité (voir **Figure 2a**), la séparation se déroule en plusieurs étapes. Les ions sont injectés par le flux de gaz dans la zone d'analyse où règne un faible gradient de champ électrique axial ($E/p < 10 \text{ V.cm}^{-1}.\text{Torr}^{-1}$) créé par l'application sur les électrodes de courants DC (Direct Current) variables. La différence de tension entre les électrodes d'entrée et de sortie crée un champ électrique croissant le long de l'analyseur. Les ions ayant des mobilités situées dans une gamme de mobilité choisie seront donc retenus par le champ électrique tandis que le gaz les empêche de reculer et que le champ quadripolaire les empêche de s'échapper radialement. Les ions se retrouvent ainsi « piégés ». Le temps de remplissage de la cellule peut varier selon le nombre d'ions étudiés (il faudra faire attention aux effets de charge d'espace résultants, voir **partie 5**). Le temps de remplissage typique est de l'ordre de 10 ms. Les différents ions qui pénètrent dans la zone d'analyse ont des positions différentes dans le gradient de champ électrique en fonction de leur mobilité. Les ions de faible mobilité seront maintenus dans les régions où la force électrique est la plus élevée (vers la sortie) tandis que les ions de mobilités supérieures seront plutôt retenus vers l'entrée de l'analyseur où le champ électrique est le plus faible. Il est à noter que les ions de mobilités trop faibles ne sont pas piégés. Le champ électrique est ensuite lentement diminué pendant un temps appelé le temps de rampe (t_{ramp}) à une certaine vitesse, la vitesse de rampe ou vitesse de balayage (v_{ramp}), ce qui permet aux ions de sortir successivement de la cellule. Les composés sont progressivement élués selon leur mobilité de plus en plus élevée vers la zone de sortie où ils sont focalisés par les lentilles optiques qui les dirigent vers l'analyseur en masse. Pendant l'élution, des spectres de masse sont acquis et chacun correspond à un voltage d'élution donné et donc à une mobilité ionique donnée. Après avoir vidé la zone de séparation, un nouveau cycle d'analyse recommence. Plusieurs analyses TIMS successives peuvent être cumulées pour produire un spectre TIMS-MS statistiquement cohérent.

Lorsque le temps de remplissage est atteint, un potentiel appliqué sur la plaque déflectrice à l'entrée de la cellule TIMS empêche de nouveaux ions d'entrer dans la cellule. Pendant ce temps, ont lieu les étapes de piégeage et d'éluion. Une partie de l'échantillon est donc perdue lors de la séparation. Le duty cycle, qui est un paramètre lié à la quantité d'ions transmis de la source d'ionisation à l'analyseur, est donc limité à 50% pour des temps de remplissage et de séparation égaux. Grâce à une zone de séparation modifiée dans l'appareil développé par Bruker Daltonics, des duty cycles plus élevés peuvent être atteints (voir **Figure 2b**). Dans cet instrument, la longueur de la zone de séparation a été doublée permettant d'intégrer une zone d'accumulation des ions avant la zone d'analyse. Ainsi, une population d'ions peut être stockée pendant qu'une autre est analysée, permettant d'atteindre un duty cycle allant jusqu'à 100%.

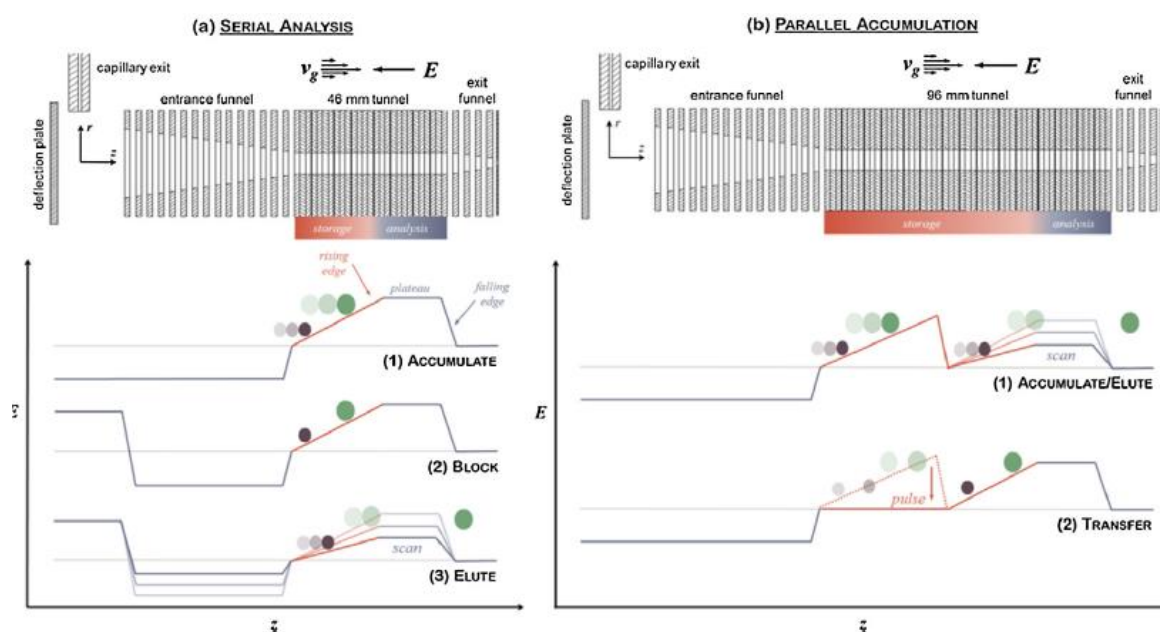


Figure 2. Schéma a) du prototype TIMS et b) du TIMS-TOF développé par Bruker Daltonics. Adapté de Silveira et al. 2017

3. Instruments commerciaux

A la suite de la commercialisation du timsTOF, Bruker Daltonics a depuis développé trois nouveaux instruments appelée timsTOF pro, timsTOF flex et timsTOF flex MALDI-2. Le timsTOF pro est un appareil développé pour des applications de protéomiques qui inclus un nouveau mode de scan en masse. Le mode PASEF (parallel accumulation – serial fragmentation) permet de réaliser plusieurs spectres MS/MS pour un seul spectre de mobilité. La fenêtre d'isolation du quadrupôle varie, en effet, au cours de l'analyse pour adapter le m/z à celui de l'ion sortant du TIMS tout le long de l'analyse en mobilité (Meier et al., 2018). Le

timsTOF flex comprend la technologie timsTOF pro avec une double source d'ionisation ESI-MALDI permettant de réaliser des analyses d'imagerie (Spraggins et al., 2019). Enfin, le timsTOF flex MALDI-2 contient un laser secondaire de post ionisation permettant d'augmenter le nombres de composés détectés d'un ordre 2 à 3 par rapport à un timsTOF flex classique (Soltwisch et al., 2020).

4. Détermination des valeurs ^{TIMS}CCS

Comme toute spectrométrie à mobilité ionique, la technologie TIMS permet d'obtenir la mobilité des ions étudiés (K). En effet, ce paramètre peut être calculé selon l'équation (1) :

$$K = \frac{v_g}{E} = \frac{A}{(V_{out} - V_{elut})} \quad (1)$$

où v_g est la vitesse du gaz, E le champ électrique, V_{elut} le voltage appliqué pour retenir les ions et V_{out} celui sur la dernière électrode de la zone de séparation. A est une constante de calibration qui peut être obtenue expérimentalement à partir de standards connus via une calibration interne ou externe. On peut noter que V_{elut} est indépendant des paramètres de rampe à une vitesse de gaz donnée. A partir des valeurs de mobilités, il est ensuite possible de déterminer les valeurs ^{TIMS}CCS via l'équation (2) :

$$^{TIMS}CCS = \frac{(18\pi)^{0.5}}{16} \frac{z}{(k_B T)^{0.5}} \left(\frac{1}{m_I} + \frac{1}{m_b} \right)^{0.5} \frac{760 T}{273.15 K_0 P N^*} \quad (2)$$

où z correspond à la charge de l'ion, k_B à la constante de Boltzmann, N^* et T au nombre de densité et à la température du gaz, et m_I et m_b sont respectivement les masses des molécules ioniques et du gaz.

Il a été montré que la calibration en mobilité joue un rôle important sur la détermination des valeurs CCS (Collisional Cross Section). En effet, selon les ions calibrants choisis la valeur CCS déterminée pourra être plus ou moins précise. Les meilleurs résultats seraient obtenus en utilisant des ions calibrants structuellement proches aux ions à calibrer (Hines et al., 2017b) et de même charge (Pagel et al., 2013). Le ESI-L Low Concentration Tuning Mix d'Agilent Technologies (G1969-85000) a été utilisé pour l'ensemble des mesures réalisées au cours de cette thèse. Pour évaluer la qualité des valeurs CCS obtenues une étude comparative a été menée au **Chapitre II.1**.

5. Résolution en mobilité

Dans un TIMS vu que les différents composés analysés sont piégés à différentes mobilités pour différentes forces de champ électrique tout en gardant la même vitesse du gaz, chaque pic aura une résolution différente. Cette dernière pour un ion donné s'exprime selon l'équation (3) :

$$R = \frac{K}{\Delta K} = \frac{(V_{out} - V_{elut})}{\Delta V_{elut}} \quad (3)$$

La capacité de séparation dans le TIMS dépend de la vitesse du gaz, du confinement des ions et de la vitesse de balayage. Lorsque la vitesse du gaz augmente, une meilleure résolution peut être obtenue mais cette augmentation requiert également un champ électrique plus intense pour compenser les forces de frottement accrues. Le potentiel RF appliqué sur les électrodes de la zone d'analyse joue également un rôle important sur la résolution des pics de mobilités. En effet, si le potentiel RF est trop faible les ions sont mal confinés, une partie est perdue par neutralisation sur la paroi de la cellule. En revanche, si ce potentiel est trop élevé le nuage d'ions se disperse dans la direction axiale pour compenser la répulsion coulombienne, ce qui entraîne une augmentation de la largeur du pic (FWHM) et donc de la résolution. Il est à noter que cette diffusion axiale est toutefois limitée par la largeur du champ électrique nécessaire pour piéger le nuage d'ions et de ce fait, la largeur du pic est limitée.

Les paramètres d'élution peuvent également être modifiés par l'utilisateur pour changer la résolution d'analyse. En effet, la vitesse de balayage ou vitesse de rampe, v_{ramp} s'exprime selon l'équation (4) :

$$v_{ramp} = \frac{\Delta v_{ramp}}{t_{ramp}} \quad (4)$$

Plus la plage de voltages considérés (Δv_{ramp}) est faible et plus le temps de rampe (t_{ramp}) est long. En d'autres termes, plus la vitesse de balayage (v_{ramp}) est grande, meilleure sera la résolution. Cependant, pour des temps d'analyse supérieurs à 30 ms (pour l'appareil TIMS TOF, Bruker Daltonics), la résolution atteint un plateau et n'augmente plus à cause des effets de charge d'espace (voir partie 5) (Silveira et al., 2017).

Différents modes d'analyse sont, ainsi, disponibles sur l'instrument timsTOF (voir **Figure 3**). Ces différents modes permettent d'atteindre des résolutions plus ou moins élevées sur des gammes plus ou moins larges selon les applications voulues. Il est à noter que les hautes résolutions ne peuvent être obtenues qu'à condition de réduire la largeur de la gamme en mobilité. Le mode Survey (voir **Figure 3a**) permet d'obtenir des résolutions comprises entre 30 et 50 pour des larges gammes de mobilité (largeur maximale de 1.62 V.s.cm⁻²) le mode Detect (voir **Figure 3b**) permet quant à lui d'obtenir des résolutions entre 50 et 90 pour des

gamme plus restreintes (largeur maximale de 1.62 V.s.cm^{-2}) enfin le mode Ultra (voir **Figure 3c**) permet d'atteindre les plus hautes résolutions comprises entre 120 et 180 mais pour des gammes en mobilité beaucoup plus resserrées (largeur maximale de 0.35 V.s.cm^{-2}). Lors de nos analyses, le mode Detect a été employé afin de réaliser des empreintes larges et globales tandis que le mode Ultra a lui été appliqué pour des analyses plus fines et résolues.

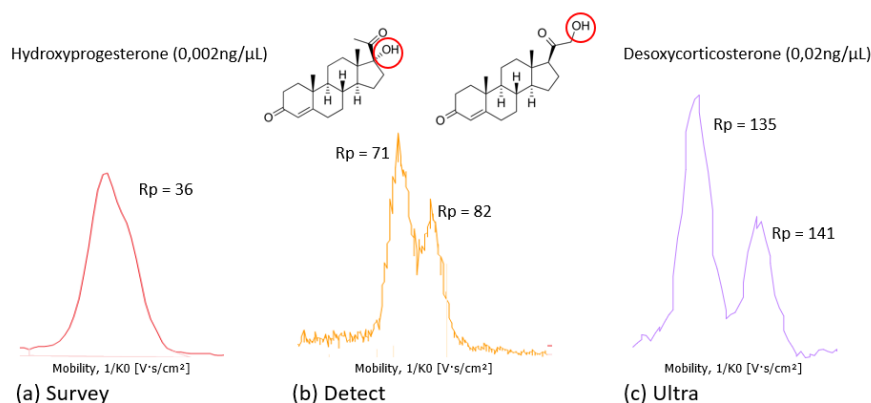


Figure 3. Spectres de mobilité extraits pour l'ion $[M+H]^+$ de m/z 331 pour les composés isomères hydroxyprogesterone et desoxycorticosterone dans les différents mode d'analyse en mobilité disponibles sur l'instrument TIMS TOF (Bruker Daltonics)

6. Effets de charge d'espace

Le TIMS présente des similarités avec un piège à ions, il est donc sensible aux effets de charge d'espace qui résultent de la répulsion coulombienne entre particules de même charge et peuvent avoir un impact sur l'efficacité de la séparation en mobilité. Dans l'instrument développé par Bruker Daltonics, l'évaluation des effets de charge d'espace montre qu'environ $10^6/10^7$ d'espèces formées à partir du Tuning Mix peuvent être analysées sans perte de performance analytique (Silveira et al., 2017). Les effets de charge d'espace sur la résolution selon le duty cycle ont également été évalués. Il a été montré que pour des valeurs de duty cycle compris entre 1 et 10%, la résolution est plutôt constante et il n'y a pas d'élargissement des pics dû aux effets de charge d'espace. En revanche, un duty cycle supérieur à 10% conduit à une diminution de la résolution qui peut aller jusqu'à 30% lorsqu'un duty cycle de 100% est atteint.¹ Il faut donc essayer de limiter le temps d'accumulation pour éviter les effets de charge d'espace. Ainsi, même en utilisant l'appareil TIMS-TOF (Bruker Daltonics) qui permet de stocker une population d'ions en amont de la séparation, il faut limiter le temps d'accumulation des ions, quitte à perdre une partie de l'échantillon au niveau de la plaque déflectrice lorsque l'on souhaite réaliser des analyses à très haute résolution et donc à une vitesse de balayage élevée, ce qui entraînera une diminution du duty cycle.

Titre : Evaluation de l'approche par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse métabolomique : de la séparation de composés isomères en matrices complexes à la création d'une base de données pour une identification accrue

Mots clés : mobilité ionique, spectrométrie de masse, métabolomique, isomères, matrice complexe, base de données

Résumé : Les études métabolomiques sont de plus en plus employées dans de nombreux domaines tels que le diagnostic clinique, la santé humaine ou d'autres questionnements biologiques. Ces études utilisent soit des approches non-ciblées par prises d'empreintes d'un échantillon complexe soit des méthodes qui ciblent un ou plusieurs métabolites d'intérêt.

Cependant, ces dernières restent difficiles en raison du nombre important de composés de structures différentes à identifier. Bien qu'une séparation chromatographique (LC) soit souvent employée, de nombreux composés isomères et isobares restent non résolus. Afin d'essayer de répondre à ce problème, cette thèse propose une approche par mobilité ionique (IM) couplée à la spectrométrie de masse (MS) en introduction directe comme technique alternative à la LC/MS.

Une cellule de type "trapped ion mobility" (TIMS) a été utilisée en couplage avec un temps-de-vol (TOF) pour ces travaux de thèse. Cette cellule de mobilité présente l'avantage de pouvoir régler son pouvoir de résolution selon les expériences à mener et d'atteindre une haute résolution en mobilité.

Nous avons, tout d'abord, évaluer la capacité de l'instrumentation TIMS-TOF à séparer des isomères en matrice complexe sur deux familles de standards : les dérivés d'estradiol dans une urine humaine et les oligosaccharides du lait maternel. Tous les isomères étudiés ont pu être caractérisés grâce à différentes solutions analytiques et la séparation en mobilité n'est pas ou peu impactée par la matrice complexe.

Nous avons, ensuite, créer une base de données de valeurs CCS (Collisional Cross Section) à partir de métabolites standards afin d'améliorer l'étape d'identification structurale. La librairie finale contient plus de 1300 valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ correspondant à plus de 400 métabolites. La comparaison de notre base de données avec 3 autres bases issues de la littérature et produites sur une cellule DTIMS montre une bonne corrélation mais la meilleure est obtenue pour les bases de données produites sur un instrument DTIMS calibré avec la même solution que nous, montrant l'importance de l'étape de calibration dans la détermination des valeurs CCS.

Title: Evaluation of the ion mobility-mass spectrometry approach for metabolomics analysis: from the separation of isomer compounds in a complex matrix to the creation of a database for enhanced identification

Keywords: ion mobility, mass spectrometry, metabolomics, isomers, complex matrix, database

Abstract: Metabolomics is an increasingly employed approach in many fields such as clinical diagnostic, human health or other biological issues. It is either an untargeted approach through metabolomics fingerprints of a complex sample or a targeted method to follow one or a set of metabolites of interest.

Nevertheless, the latter method remains complicated due to the high number of metabolites with very varying structure to be identified. Even if chromatographic separation is most often employed, such as liquid chromatography (LC), many isomers and isobars remain unresolved. To try to overcome this issue, this thesis project proposes an approach using ion mobility (IM) coupled with mass spectrometry (MS) and a direct introduction as an alternative technique to LC/MS.

A trapped ion mobility cell (TIMS) coupled with a time-of-flight (TOF) was employed for our work. This ion mobility cell has the advantage of having an adjustable resolving power and being able to achieve high resolution mobility.

We first evaluated the TIMS-TOF instrumentation capacity to separate isomer compounds in a complex matrix with two families of standards: estradiol derivatives in human urine and oligosaccharides in breastmilk. All the studied isomers were separated through variable analytical solutions and the mobility separation is not or only slightly impacted by the complex matrix.

We then created a CCS (Collisional Cross Section) database from metabolite standards in order to improve the identification step. The final library contains more than 1300 $^{TIMS}CCS_{N_2}$ values corresponding to more than 400 metabolites. The comparison between our database and 3 others from the literature and produced on a DTIMS cell shows a good correlation but the best is obtained for the databases produced on a single-field DTIMS instrument calibrated with the same calibration solution as ours, indicating the importance of the calibration step in determining the CCS values.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 406

Institut Parisien de Chimie Moléculaire

Chimie Structurale Organique et Biologique

RESUME DE THESE

**Evaluation de l'approche par mobilité ionique couplée à la
spectrométrie de masse pour l'analyse métabolomique :**
de la séparation de composés isomères en matrices complexes à la
création d'une base de données pour une identification accrue

Par Aurélie Delvaux

Thèse de doctorat de Chimie

Dirigées par Sandra Alves et Estelle Rathahao-Paris

Présentée et soutenue publiquement le 20 septembre 2021

Introduction

La spectrométrie par mobilité ionique (Ion Mobility Spectrometry, IMS) est une technique de séparation des composés gazeux sous formes chargés qui analyse leur mobilité électrophorétique dans un gaz vecteur sous l'influence d'un faible champ électrique (Eiceman et al., 2013). Cette approche s'est énormément développée depuis les années 1960 pour l'analyse de gaz contenant des agents chimiques (Mäkinen et al., 2010) ou encore des explosifs (Ewing et al., 2001). Cet appareillage permet, en effet, une détection rapide (en quelques minutes) des composés d'intérêt et ce même à l'état de traces grâce à la grande sensibilité de la mobilité ionique (Eiceman, 2002). Des instruments portatifs avec des interfaces simplifiés et des composés de calibrations inclus dans l'appareillage ont ainsi été développés permettant leurs utilisations par des personnels non scientifiques et continuent aujourd'hui encore d'être utilisés dans les aéroports, lors d'événements scientifiques ou même sur des zones de combats. Depuis cette époque, le développement des méthodes d'ionisation dites douces telles que les sources ESI (Electrospray ionization) et MALDI (Matrix assisted laser desorption ionization) ont permis d'étendre les applications de cette technique non plus uniquement à des composés gazeux et volatils mais également à des échantillons plus ou moins complexes à l'état liquide ou solide contenant des composés polaires de hautes masses moléculaires. L'analyse par mobilité ionique a ainsi pu s'ouvrir à d'autres domaines tels que l'étude des systèmes biologiques, le diagnostic clinique ou encore les sciences environnementales (Eiceman et al., 2013).

Le développement de la mobilité ionique a également été rendu plus attractif en intégrant les cellules de mobilité avec des spectromètres de masse (ion mobility-mass spectrometry, IM-MS), où la cellule est implémentée après la source d'ionisation. En effet, la séparation par mobilité ionique s'effectue sur l'échelle de la milliseconde, tandis qu'une séparation par spectrométrie de masse prend quelques microsecondes, rendant le couplage de ces deux techniques idéal. Bien que le principe de séparation de ces deux approches est similaire vu qu'elles utilisent chacune des champs électriques, en spectrométrie de masse elle s'effectue avec des conditions de vide poussé pour éviter tout frottements tandis qu'un gaz vecteur participe à la séparation par mobilité ionique dans des conditions de haute pression. Ainsi, ces deux techniques analytiques bien que similaires restent complémentaires, la spectrométrie de masse séparant les espèces chargées selon le rapport masse sur charge tandis que la mobilité ionique selon la charge, la taille et la forme des ions (Eiceman et al., 2013). L'équipe de (Clemmer et al., 1995) a été la première à démontrer le potentiel du couplage IM-MS via l'analyse de conformères de protéines et depuis ces travaux précurseurs, de nombreux

instruments commerciaux sont apparus ces dernières années, accélérant encore le développement de cette technique. Il est à noter que chacun de ces instruments IM-MS inclus un type de cellule de mobilité donné i.e. une géométrie de cellule permettant d'obtenir des avantages/inconvénients spécifiques (Dodds and Baker, 2019). Par ailleurs, la séparation par chromatographie liquide (LC, liquid chromatography) s'effectuant en quelques secondes, l'instrumentation IM-MS est fréquemment couplée avec (couplage LC/IM-MS) afin d'effectuer une analyse comprenant trois types de séparation complémentaires pour un temps d'analyse équivalent à une approche LC/MS classique (Purves, 2018). Ainsi, l'ajout d'une cellule de mobilité ionique, peut se révéler intéressant car les composés co-élus dans la colonne LC (notamment les composés isomères) peuvent être caractérisés, par mobilité ionique (Wu et al., 2020).

En outre, des développements technologiques et notamment au niveau des capacités de séparation des cellules de mobilité ionique, ont augmenté l'intérêt de cette technique vers les sciences omiques telles que la protéomique (Zhong et al., 2012), lipidomique (Harris et al., 2019) ou métabolomique (Delvaux et al., 2021a).

Mon projet de thèse s'inscrit dans le domaine de la métabolomique qui est l'étude des composés biologiques de petites tailles ($<1\text{kDa}$) produits par les cellules ainsi que l'étude des voies métaboliques associées (Patti et al., 2012). Cette étude permet de s'approcher au plus près de l'expression phénotypique car les changements au niveau métabolique peuvent être reliés à des changements physiologiques ou pathologiques. Ainsi, les études métabolomiques se sont énormément développées au cours de ces dernières années. Elles sont de deux types, les analyses dites non-ciblées (Alonso et al., 2015) permettent d'étudier l'ensemble des métabolites, le métabolome, d'un échantillon donné tandis que les études ciblées permettent de suivre l'évolution d'un ou plusieurs métabolites d'intérêt. A l'heure actuelle, la spectrométrie de masse (MS) est la technique analytique la plus employée avec la Résonnance Magnétique Nucléaire (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) (Smolinska et al., 2012), de par sa très bonne sensibilité qui permet de détecter les métabolites même en faibles concentrations dans des matrices complexes ainsi que de par la possibilité d'études structurales via l'application d'expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Dans ces études, la MS est, généralement, couplée à une technique de séparation de type chromatographique (LC ou GC, gas chromatography) (Haggarty and Burgess, 2017) afin d'améliorer la caractérisation des composés de mélanges complexes ainsi que pour obtenir un deuxième paramètre d'identification : le temps de rétention, en plus du rapport masse sur charge. Dans ce contexte,

l'utilisation d'une approche directe IM-MS est potentiellement intéressante pour des analyses métabolomiques à haut débit, de par son temps d'analyse beaucoup plus court par rapport à une méthode conventionnelle LC/MS, ce qui peut être crucial dans le cas d'analyse de cohortes d'échantillons.

Bien qu'en plein essor, la métabolomique rencontre à l'heure actuelle deux freins majeurs : la caractérisation des composés isomères et l'identification des métabolites. En effet, ces composés biologiques (les métabolites) sont caractérisés par une configuration absolue, et donc caractériser voir séparer des composés isomères est primordial afin d'évaluer leurs rôles. Ces composés sont généralement co-élus en conditions chromatographiques et leurs spectres de fragmentations sont souvent très similaires rendant leur identification très complexe. Or, la mobilité ionique a été montrée comme présentant des capacités de séparation accrue des structures isomères (Wu et al., 2020) vis-à-vis d'autres méthodes séparatives, et cela fait partie des motivations à son utilisation dans les études métabolomiques. Enfin, l'étape d'identification reste ardue à l'heure actuelle (Viant et al., 2017), notamment à cause d'un manque de composés standards mais également à cause de la justesse et de la reproductibilité des paramètres d'identification utilisés tels que le temps de rétention qui peut présenter des dérives selon les conditions expérimentales appliquées. La spectrométrie par mobilité ionique se révèle une nouvelle fois ici prometteuse, car elle permet de fournir un paramètre d'identification, le CCS (Collisional Cross Section), spécifique d'un composé donné (ou plutôt de sa forme chargée), et dont les mesures expérimentales se sont démontrées comme robustes face aux changements de conditions expérimentales (Paglia et al., 2014).

Dans mon projet de thèse, nous avons voulu évaluer le potentiel du couplage IM-MS avec une cellule de mobilité de nouvelle génération, le TIMS (voir le principe de l'appareil TIMS-TOF détaillé en **Annexe**) dans le contexte des approches métabolomiques. Pour ce faire, nous avons développé des méthodes permettant à la fois des analyses de type non-ciblé pour réaliser une empreinte du métabolome par une analyse IM-MS directe ainsi que des méthodes plus spécifiques dédiées à une identification accrue des métabolites et notamment des composés isomères.

Le manuscrit s'est présenté en trois chapitres :

Un état de l'art de l'utilisation de la mobilité ionique pour les analyses métabolomiques a été présenté dans le **Chapitre I**.

L'évaluation de la potentialité de l'instrument TIMS-TOF vis-à-vis de sa capacité à séparer des métabolites isomères a ensuite été discutée dans le **Chapitre II**. Deux familles de composés isomères : dérivées d'estradiols et oligosaccharides du lait maternel, ont été étudiées. Une étude préliminaire a été faite sur des mélanges de standards puis leurs détections par une approche directe IM-MS dans des matrices complexes à savoir des échantillons d'urine humaine et de lait maternel, respectivement a été évaluée,.

Enfin, la construction d'une base de données de valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ de plus de 400 métabolites a été présentée dans le **Chapitre III**.

Chapitre I : Etat de l'art

Dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique sur le potentiel de la spectrométrie par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse pour des analyses métabolomiques, a été présentée. Cette synthèse se présente la forme d'une revue intitulée «*Different ion mobility-mass spectrometry coupling techniques to promote metabolomics*» publiée dans **Mass Spectrometry Reviews** en 2021 (doi : 10.1002/mas.21685).

Les différentes approches métabolomiques : empreinte métabolomique ou étude ciblée, ainsi que les méthodes analytiques couramment employées dans ce domaine de recherches ont tout d'abord été introduites. Le principe général de fonctionnement et les différentes technologies de mobilité ionique ainsi que leurs couplages avec la spectrométrie de masse ont ensuite été décrites (voir **Figure 1**). Un ensemble de techniques analytiques en couplage avec la mobilité ionique proposées pour des études métabolomiques ont ensuite été présentées. A la suite, une discussion des paramètres instrumentaux et méthodologiques influençant la capacité de séparation par mobilité ionique a également été abordée. Enfin, la revue présente les enjeux inhérents au traitement des données spectrales complexes produites par couplage IM-MS incluant l'étape cruciale d'identification structurale des métabolites, nécessitant la création de bases de données de valeurs CCS.

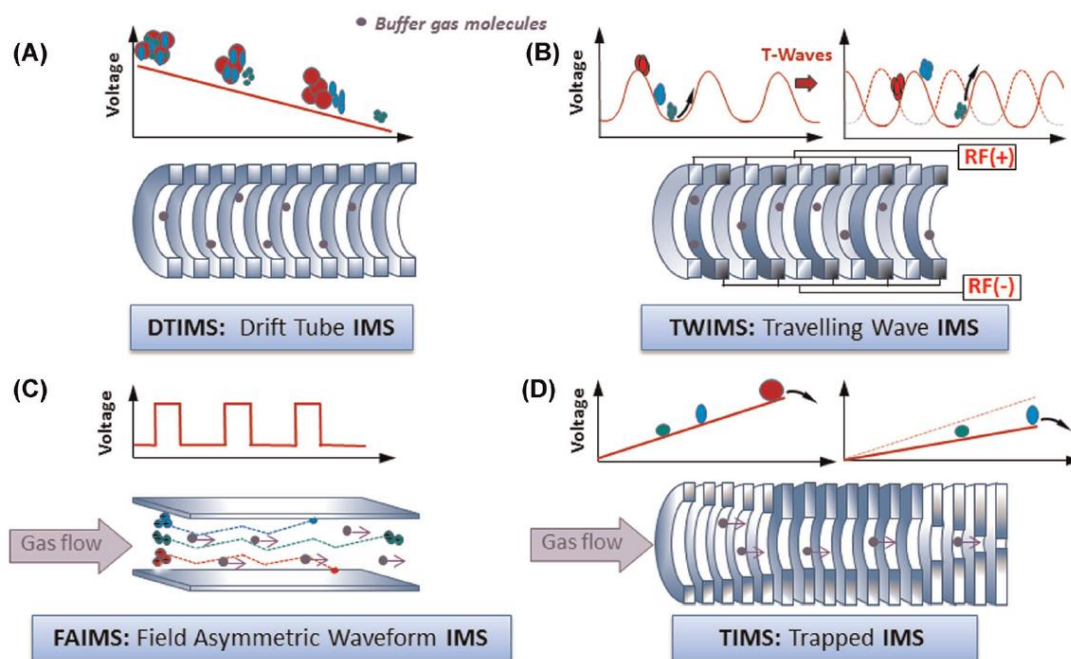


Figure 1. Quatre types de cellule de mobilité ionique.

Dans ce chapitre, nous avons montré l'intérêt du couplage IM-MS pour des applications métabolomiques. Cette technique permet, en effet, de produire des données métabolomiques avec des temps d'acquisition courts, ce qui peut être cruciale pour des études de cohortes d'échantillons, tout en fournissant deux critères d'identification des composés détectés : les mesures de CCS et des rapports m/z (ainsi que la possibilité d'acquérir en parallèle, des spectres MS/MS). Ce couplage combine, ainsi, l'avantage du très haut débit des méthodes DI-MS et des capacités de détection et d'identification des approches multidimensionnelles telles que la LC/MS ou la GC/MS. En outre, par sa capacité à séparer les composés isomères, l'IM-MS est très prometteuse pour une couverture plus complète du métabolome. De nombreuses avancées technologiques réalisées ou encore en cours permettent d'envisager encore plus d'améliorations des capacités d'analyses du couplage IM-MS. Enfin, le CCS s'est révélé être un facteur d'identification très robuste encourageant la création de bases de données CCS en métabolomique.

Chapitre II : Séparation de métabolites isomères et analyse en matrices complexes

Dans ce chapitre, la capacité de l'instrumentation TIMS à analyser et à séparer des métabolites isomères présents en solution de standards purs ou dans des matrices biologiques, a été évaluée. De technologie récente, le principe du TIMS (voir description en **Annexe**) se démarque des instruments de mobilité ionique classiques tels que DTIMS et TWIMS (voir **Figure 1**). Cet instrument piège, en effet, les ions par mobilité décroissante avant de les éluier progressivement afin de les séparer. La résolution en mobilité peut, ainsi, être augmentée mais au détriment de la gamme de détection en mobilité (mode IM-MS global *versus* ciblé). Il faut, également, contrôler le nombre d'ions piégés dans la cellule pour éviter des effets de charge d'espace.

L'instrument TIMS-TOF a été acquis dans notre laboratoire en 2017. Mes travaux de recherches ont débuté par une étude préliminaire menée à partir de composés modèles : l'adénosine monophosphate (AMP) en mode d'ionisation négative et la désoxycorticostérone en mode d'ionisation positive, afin de déterminer les conditions optimales de séparation par mobilité ionique de ces composés de faibles masses moléculaires. Les effets de la concentration (voir **Figure 2**) et de la gamme de détection de mobilités réduites (voir **Figure 4**) sur la résolution ont notamment été testés. Nous avons, ainsi pu observer que lorsque la concentration augmente, l'intensité du pic mobilogramme augmente (voir **Figure 3**) mais qu'en parallèle la résolution en mobilité diminue (voir **Figure 2**). Cette observation démontre l'importance de contrôler le nombre d'ions et donc les potentiels effets de charge d'espace pour obtenir une analyse TIMS optimale. Il est à noter que des mobilogrammes exploitables ont pu être obtenus selon les composés étudiés à partir de concentrations de 1 à $5 \cdot 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Une diminution de l'intensité a pu être constatée en mode ciblé (mode Ultra de la **Figure 3**). Ainsi, afin d'obtenir des mobilogrammes optimaux, de faibles concentrations sont recommandées, ce qui constitue un avantage certain pour les analyses métabolomiques en matrice complexe où les métabolites sont généralement présents à faibles concentrations.

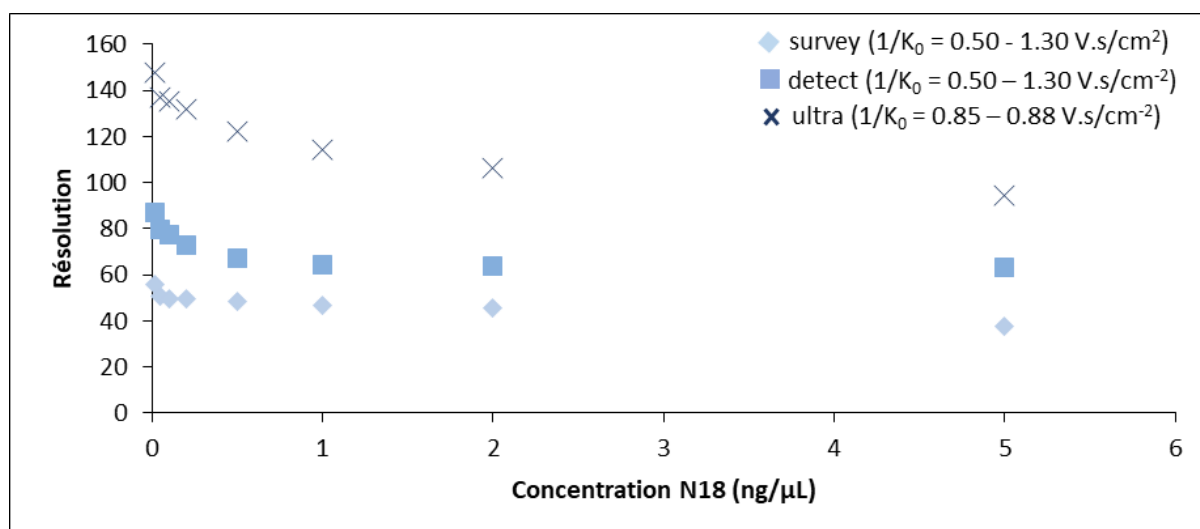


Figure 2. Evolution de la résolution du pic de mobilité en fonction de la concentration du composé analysé dans les différents modes de mobilité (survey, detect, ultra, voir description en *Annexe*). Il faut souligner que les mesures d'intensité ont été effectuées à partir du spectre de mobilité extrait pour une espèce donnée, ici, le $[M+H]^+$ de la désoxycorticostérone mesuré à m/z 331. La désoxycorticostérone a été analysée à des concentrations comprises entre $0.02 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ et $5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$.

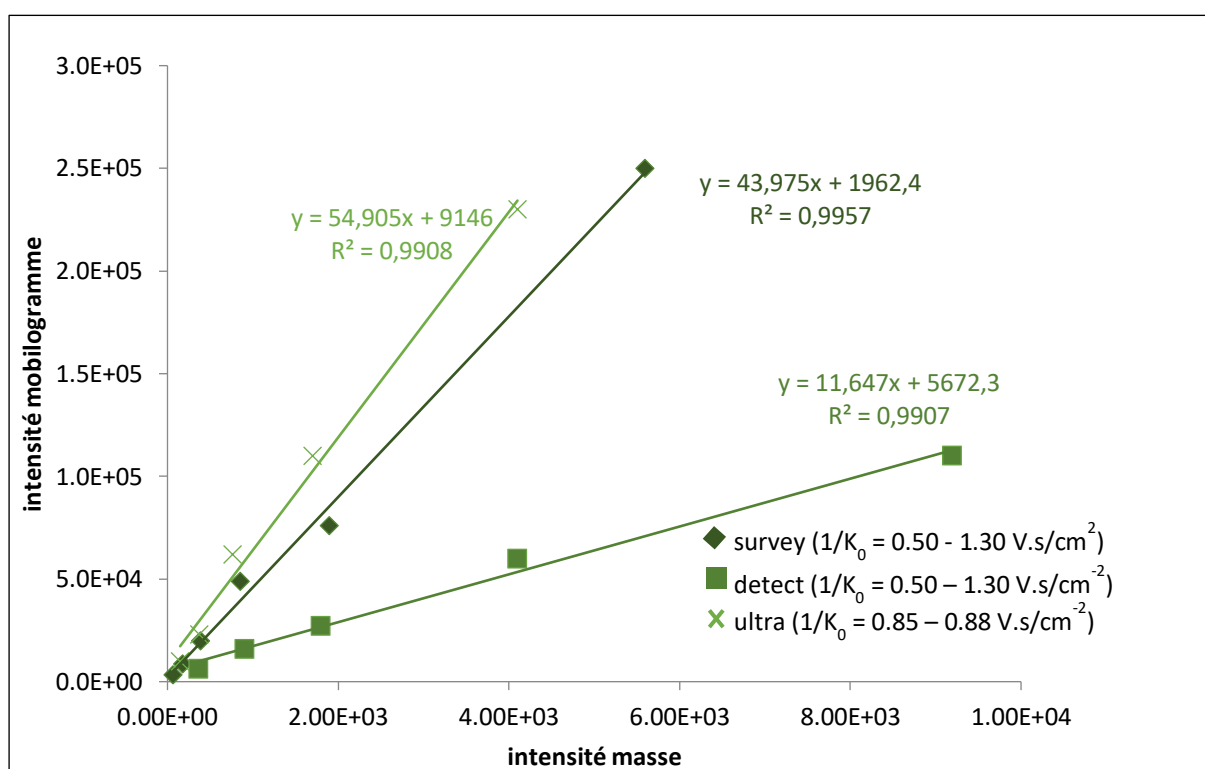


Figure 3. Evolution des intensités (en unités arbitraires) du pic du mobilogramme en fonction de celle du pic du spectre de masse dans les différents modes de mobilité (survey, detect et ultra, voir *Annexe*). Ici, pour le pic de mobilité extrait à m/z 346 pour l'ion $[M-H]^-$ de l'AMP de concentration de 0.02 à $1 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ (chaque point correspond à une concentration différente).

Les effets de la largeur de la gamme (pour un mode de détection donné de l'instrument TIMS) ont ensuite été étudiés. Il apparaît que plus la gamme de mobilité est large plus la résolution diminue (voir **Figure 4**), et ce indépendamment de la vitesse de balayage. Ainsi, afin d'obtenir les meilleures conditions de séparation, la gamme de mobilité doit être optimisée, c'est-à-dire réduite au maximum (surtout en mode ultra).

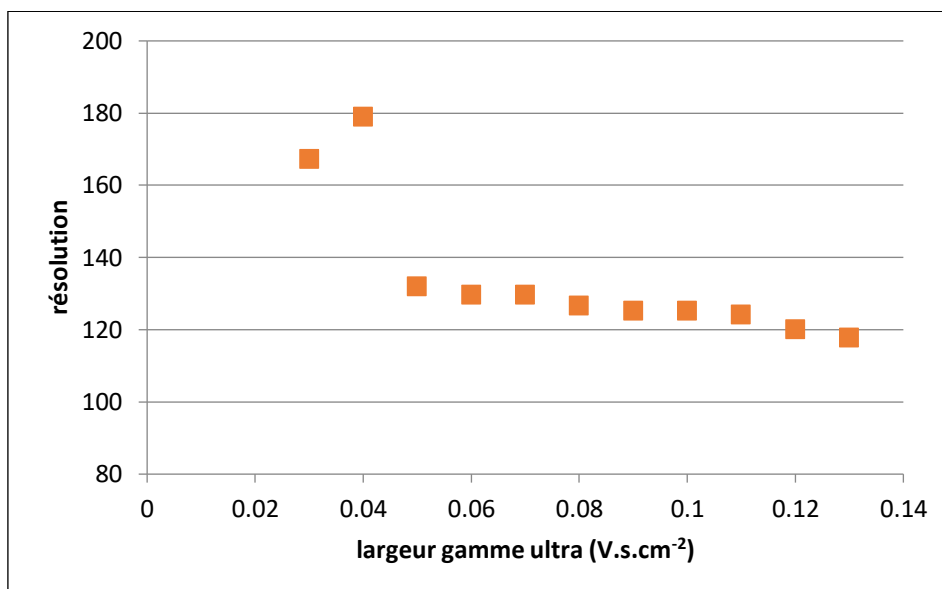


Figure 4. Evolution de la résolution du pic de mobilité en fonction de la largeur de la gamme de mobilité en mode ultra (voir *Annexe*). Ici, pic de mobilité extrait à m/z 331 pour l'ion $[M+H]^+$ de la désocorticoesterone à la concentration $0.2 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$.

Une fois ces paramètres optimisés, des méthodes spécifiques ont été développés pour l'analyse de deux familles d'isomères. Trois couples d'isomères de dérivés d'estradiol ont, tout d'abord, été étudiés. Ils ont été sélectionnés en tant que métabolites isomères modèles au vu de leur relation d'isomérisation variable (régio- et stéréoisomères). L'analyse IM-MS des standards en solution puis surchargés dans l'urine a été réalisée. Les résultats de cette étude sont présentés dans la première partie de ce chapitre. Les oligosaccharides du lait maternels (HMOs) qui constituent une classe chimique très complexe à analyser de par sa grande diversité de composés isobares/isomères ont ensuite été étudiés. La deuxième partie de ce chapitre décrit les résultats obtenus pour leur caractérisation, et plus important pour leur identification dans un échantillon de lait maternel.

Chapitre II-1. Analyse d'isomères d'oestrogènes dans l'urine humaine

Comme évoqué plus haut, la capacité du TIMS à séparer les métabolites isomères a d'abord été évaluée par l'étude de trois couples d'isomères de dérivés estradiols, (i) estradiol-17 β (E₂ β) et son épimère (E₂ α), (ii) estradiol-3-glucuronide (E₂ β -3G) et estradiol-17-glucuronide (E₂ β -17G), et (iii) 2-méthoxyestradiol (2-MeO-E₂ β) et 4-méthoxyestradiol (4-MeO-E₂ β) (voir **Figure 5A**). Ces composés ont été choisis en tant que métabolites isomères modèles car ils nous permettent d'étudier des régio- et stéréoisomères ainsi que pour leur intérêt biologique. En effet, les estradiols sont connus pour avoir un effet globalement positif sur le maintien de l'homéostasie (Ikeda et al., 2019) mais ils peuvent également être utilisés dans les traitements hormonaux de substitution (Lobo, 1995). Cependant, certains métabolites d'estradiol peuvent augmenter le risque de développement de cancer (Gonzalez et al., 2019; Rižner, 2013; Rodriguez et al., 2001). Il est, donc, important de pouvoir distinguer et discriminer ces métabolites. C'est pourquoi après évaluation des meilleures conditions analytiques pour la séparation des isomères de ces trois couples, les standards ont été ajoutés à une urine humaine pour évaluer la possibilité par notre approche directe IM-MS de les détecter dans une matrice biologique.

Les résultats obtenus dans ce travail ont fait l'objet d'un article intitulé « *An emerging powerful technique for distinguishing isomers : TIMS-TOF for a rapid characterization of estrogen isomers* » publié dans **Rapid Communications in Mass Spectrometry** en 2020 (doi : 10.1002/rcm.8928). Dans cet article, nous présentons la possibilité de distinguer des estrogènes isomères par des analyses directes IM-MS en ionisation ESI négative (voir **Figure 5**) et positive. L'ajout de lithium a été proposé pour améliorer la séparation des isomères sous forme d'adduits de monomères et/ou dimères non covalents cationisés par le lithium (voir **Figure 6**). Ainsi la production de complexes non covalents est apparue comme un moyen direct d'améliorer la séparation par mobilité d'isomères, si la capacité de séparation de l'instrument reste insuffisante.

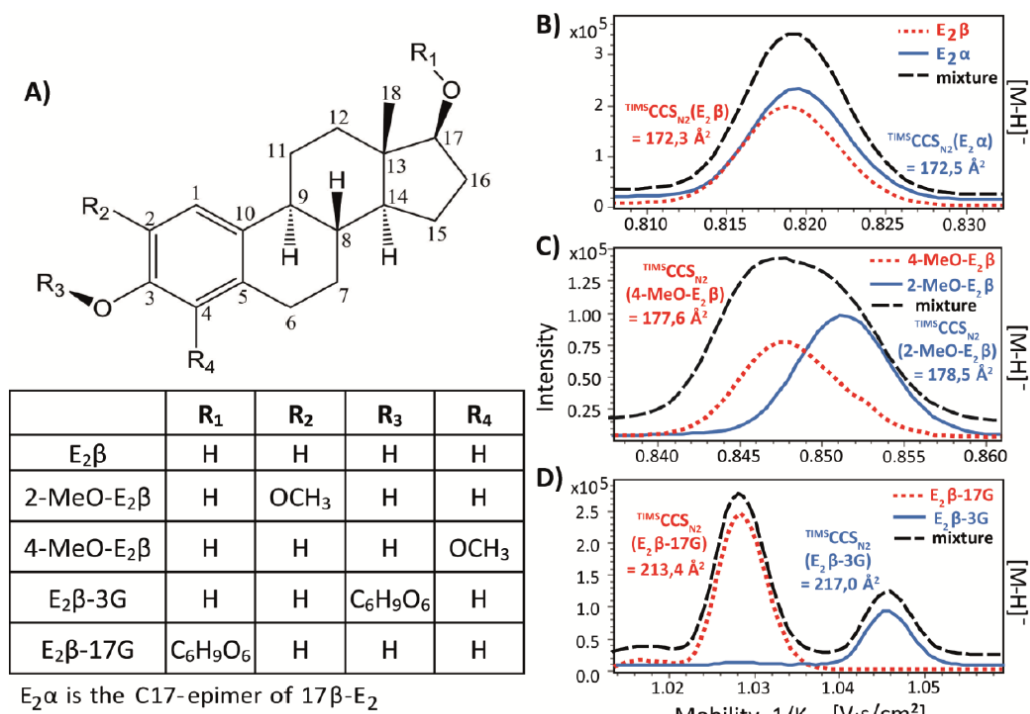


Figure 5. A) Structures des œstrogènes étudiés. B-D) Spectres de mobilité extraits pour le m/z des ions $[M-H]^-$ de chacun des isomères seuls et en mélange en ionisation ESI négative en mode IM-MS ciblé.

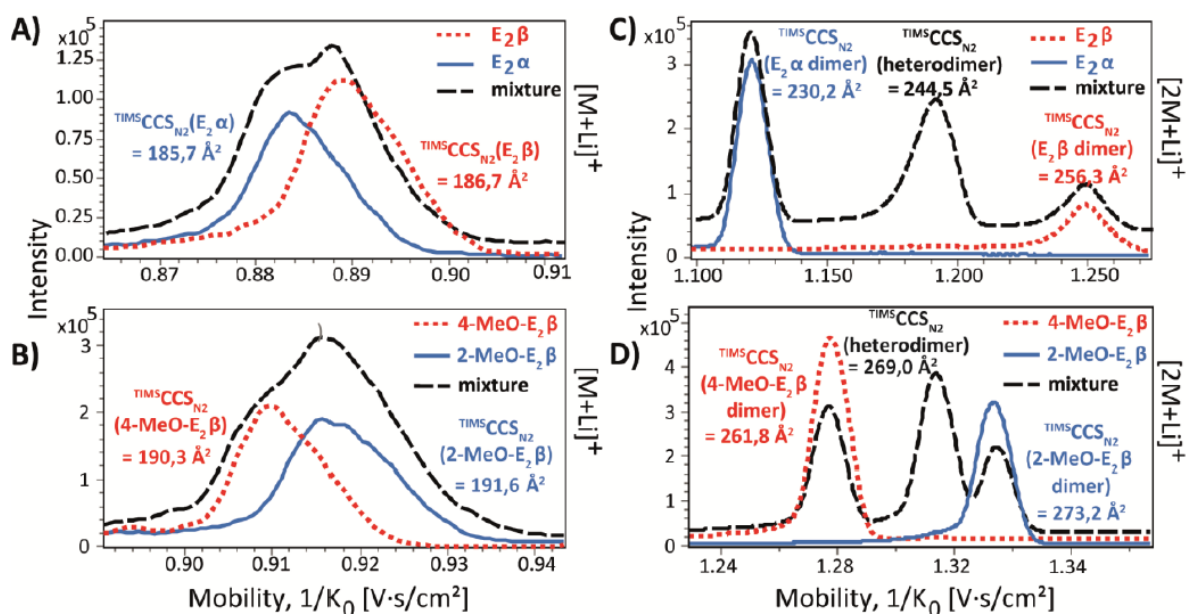


Figure 6. Spectres de mobilité des isomères seuls et en mélange sous leur forme $[M+Li]^+$ et $[2M+Li]^+$ en mode IM-MS ciblé.

Chapitre II-2. Analyse des HMOs dans le lait maternel

A la suite de l'étude des dérivés d'estradiols, nous nous sommes intéressés aux oligosaccharides du lait maternel (Human Milk Oligosaccharides, HMOs) qui représente une classe de composés très intéressante de par leur fonction mais également de par leur grande variété structurale. Les HMOs sont la 3^{ème} famille de composés la plus abondante dans le lait maternel après le lactose et les lipides (Plaza-Díaz et al., 2018) et ils sont de plus en plus étudiés pour leur intérêt biologique. Ce sont, en effet, des prébiotiques pour le microbiome intestinal (Bode, 2015) qui participeraient à la protection des enfants allaités face à certaines infections microbiennes et maladies et également au développement de leur système immunitaire (Quin et al., 2020; Plaza-Díaz et al., 2018). Or, ces différents bénéfices seraient liés à la composition du lait maternel et notamment à celle en HMOs. Cette dernière est très variable d'une mère à l'autre et a conduit à définir différents types de laits. Les laits maternels se classent, en effet, en plusieurs catégories selon le statut sécréteur ou non et le groupe Lewis de la mère (Kunz et al., 2017). Pour classer les différents laits maternels au sein de ces groupes, certains HMOs sont (semi-)quantifiés car ils sont surexprimés ou absents selon les échantillons considérés (voir **Tableau 1**). Enfin, il est également important de caractériser les HMOs du lait maternel car la quantité de certains composés serait liée à la durée de lactation, à des caractéristiques maternelles (âge, poids, alimentation, ethnicité) mais également à certains facteurs environnementaux (lieu et saison) (Azad et al., 2018). Cependant, cette classe de molécules reste difficilement analysable car elle contient de nombreux isomères résultant de la manière dont les différents monosaccharides sont liés sur la chaîne oligosaccharide mais également de la stéréochimie des liaisons des différents monomères entre eux.

Tableau 1. HMOs semi-quantifiés pour classer les échantillons de lait selon leur statut sécréteur ou non, ainsi que leur groupe de Lewis. Figure reproduite de (Kunz et al. 2017)

Name	Structure group	1	2	3	4
2'FL	Fuc α 1-2 Gal β 1-4 Glc	+	—	+	—
LDFT	Fuc α 1-2 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) Glc	+	—	+	—
LNFP I	Fuc α 1-2 Gal β 1-3 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc	+	—	+	—
LNFP II	Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc	- ¹	+	- ¹	—
LNDFH II	Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) Glc	- ¹	+	- ¹	—

Group 1: Lewis (a-b+), secretor.

Group 2: Lewis (a+b-), nonsecretor.

Group 3: Lewis (a-b-), secretor.

Group 4: Lewis (a-b-), nonsecretor.

2'FL = 2'-fucosyllactose; LDFT = difucosyllactose; LNDFH = lacto-N-difucohexaose; LNFP = lacto-N-fucopentaose.

-¹ traces may be present.

Afin d'évaluer la possibilité de caractériser le lait maternel par le couplage de la mobilité ionique et de la spectrométrie de masse (IM-MS), nous nous sommes d'abord intéressés à quatre couples d'isomères : le lacto-N-tetraose (LNT) et le lacto-N-neotetraose (LNnT), le lacto-N-fucopentaose I et V (LNFP I et LNFP V), le 2'-fucosyllactose (2'FL) et le 3-fucosyllactose (3FL) ainsi que le 3'-sialyllactose (3'SL) et le 6'-sialyllactose (6'SL) (voir **Figure 7**). Ces composés, ont été choisis car ils font partis des HMOs les plus abondants présents dans les laits maternels, par exemple le 2'FL est utilisé pour déterminer le caractère sécréteur d'un échantillon (Azad et al., 2018; Kunz et al., 2017) mais également de par leurs structures chimiques. En effet, deux des quatre couples présentent une isomérisie de type positionnel, le fucose est positionné à différents endroits de la chaîne oligosaccharide (LNFP I/LNFP V et 2'FL/3FL) tandis que les deux autres ont des blocs liés différemment à la chaîne principale (LNT/LNnT et 3'SL/6'SL). Dans la continuité de ce travail, une étude plus étendue à un plus grand nombre de HMOs a été menée (voir plus bas).

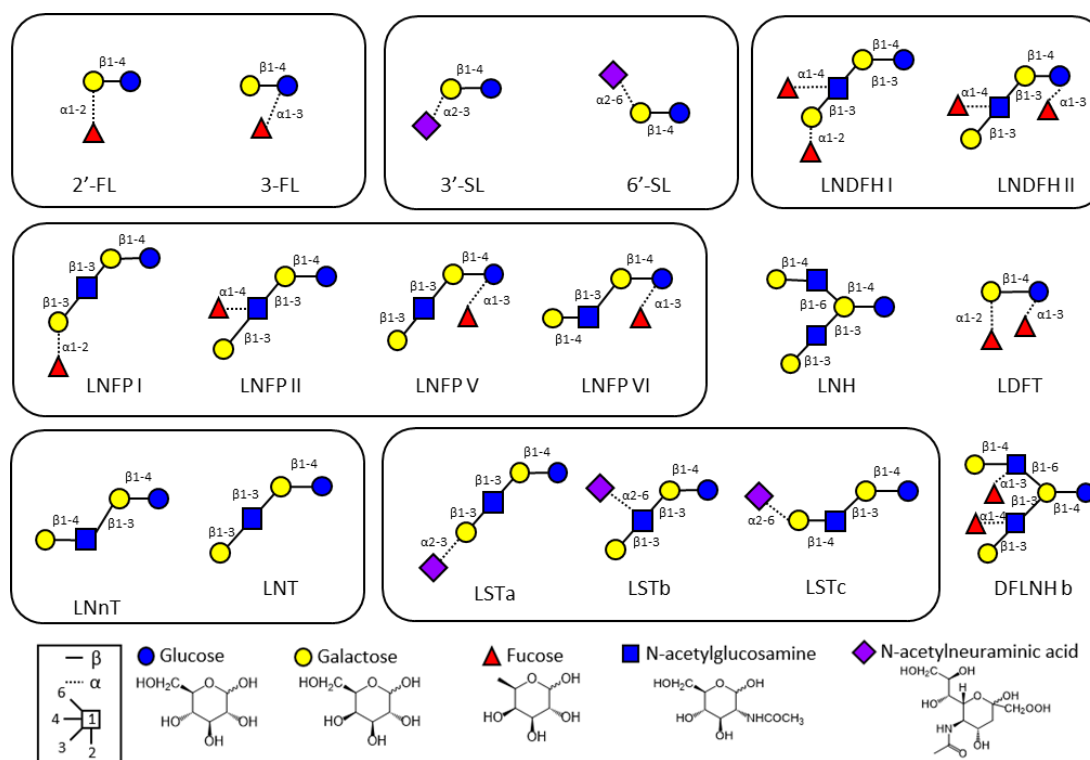


Figure 7. Représentation graphique des HMOs étudiés, selon la nomenclature symbolique des glycans définie par (Neelamegham et al., 2019)

Nous avons étudié ces composés par une approche IM-MS selon deux modes de détection de l'instrument TIMS-TOF : une détection dite de type globale permettant d'analyser l'ensemble des HMOs sur une large gamme de mobilités (voir **Figure 8**) et une de type ciblée sur un

composé d'intérêt permettant d'atteindre des résolutions plus élevées et donc des séparations en mobilité accrues (voir description du TIMS-TOF en **Annexe**). Nous avons, également, évalué l'impact de la réduction des HMOs sur la séparation en mobilité (voir **Figure 9**). Enfin, nous avons appliqué nos méthodes à l'analyse d'un échantillon de lait pour la séparation de nos composés d'intérêt par IM-MS mais également par IM-MS/MS. Ce dernier mode permet de mener des expériences de fragmentation après séparation en mobilité dans la cellule TIMS (voir **Annexe**) dans un double objectif : en premier lieu, pour l'acquisition simultanée de deux données spectrales orthogonales, les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ et les voies de fragmentation et en second lieu, pour identifier un isomère vis à vis de l'(des) autre(s) isomères si la séparation en mobilité est insuffisante via la détection d'ions diagnostiques ou des variations des intensités des ions fragments détectés.

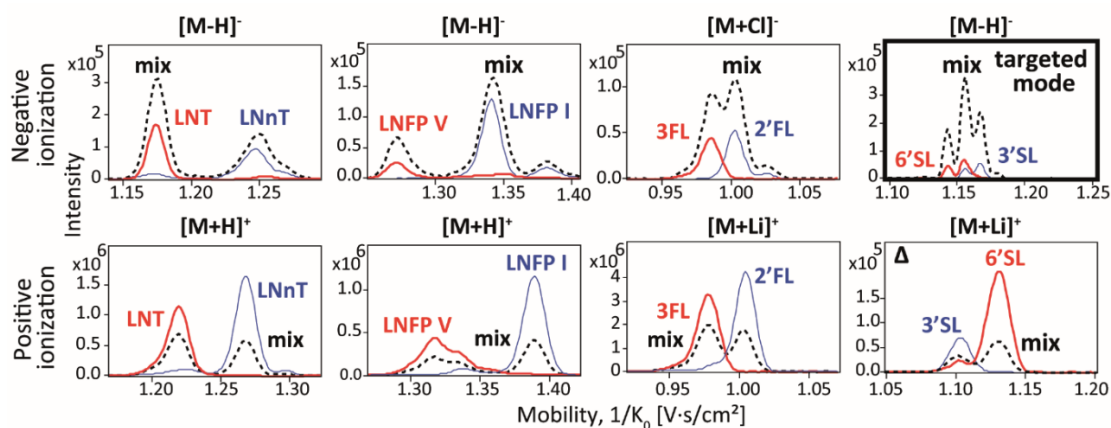


Figure 8. Spectres de mobilité des différentes espèces ioniques et HMO correspondant aux meilleures séparation en mobilité des différents couples d'isomères en ionisation ESI négative et positive

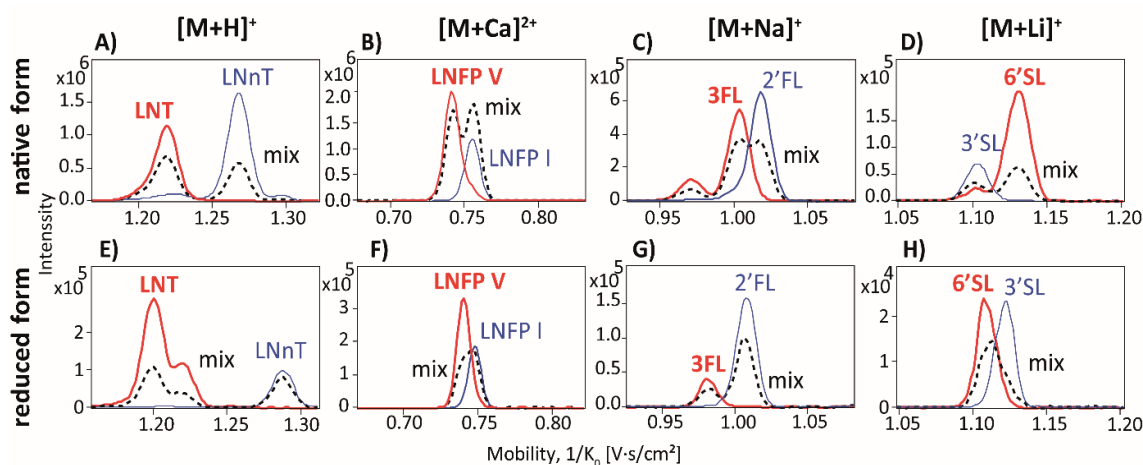
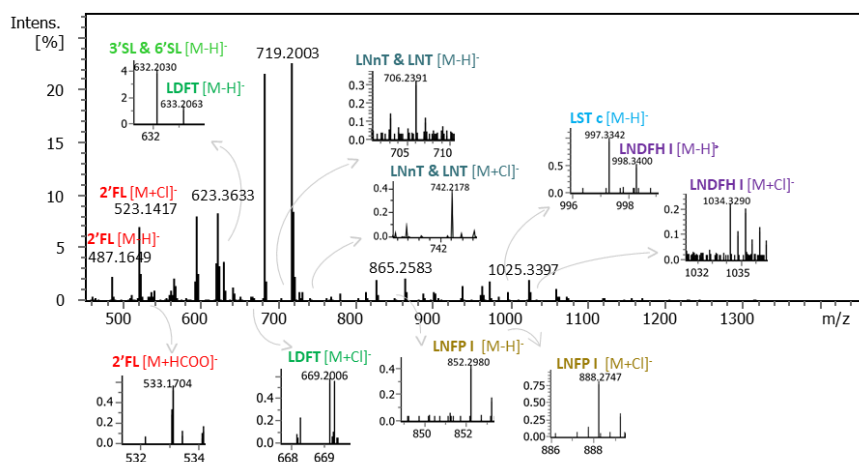


Figure 9. Spectres de mobilité des différentes espèces de HMO sous forme intacte (A-D) et réduite (E-H)

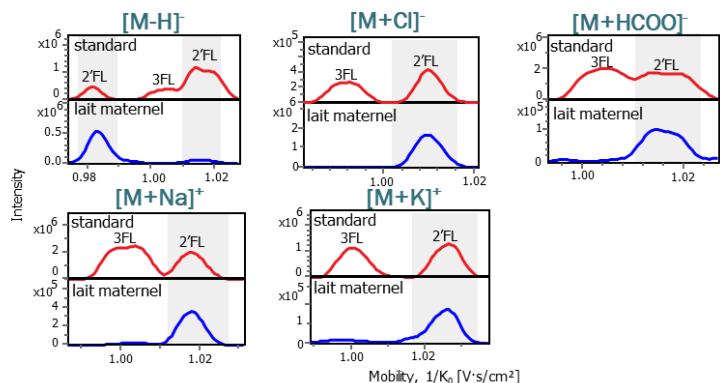
Ces travaux ont fait l'objet d'un article, actuellement en resoumission après révision auprès du journal **Analytica Chimica Acta**, intitulé « *Trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for high throughput and high resolution characterization of human milk oligosaccharide isomers* ».

A la suite de ce travail préliminaire, nous avons voulu étendre notre méthode à un plus grand nombre de HMOs afin de caractériser au mieux le lait maternel. Pour cette étude, nous nous sommes basés sur les travaux de (Azad et al., 2018) qui ont démontré que malgré des compositions en HMOs très variables selon les échantillons, les laits maternels sont constitués à 90% en quantités de 19 HMOs. Tous les HMOs commercialement disponibles parmi ces 19 HMOs ont donc été acquis soit 2'FL/3FL, LNnT/LNT, 3'SL/6'SL, LNFP I/LNFP II, LS-tetrasaccharide b et c (LSTb/LSTc), lacto-N-hexaose (LNH) et difucosyllacto-N-hexaose (DFLNH). Le lactodifucotetraose (LDFT) et le lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II) ont également été étudiés afin d'analyser l'ensemble des HMOs permettant d'assigner à un lait maternel son statut sécréteur ou non, ainsi que son groupe de Lewis (voir **Tableau 1**). Enfin, le LSTa, le LNDFH I, ainsi que les isomères LNFP V et le LNFP VI ont été ajoutés à cette liste afin de constituer des familles d'isomères les plus complètes possible (voir **Figure 7**). L'ensemble de ces dix-huit HMOs a été caractérisé par une approche directe IM-MS sous forme de plusieurs espèces ioniques et l'échantillon de lait maternel a été analysé dans les mêmes conditions, en étudiant l'ensemble de ces composés *via* les analyses IM-MS et IM-MS/MS mises au point avec les composés standards (voir **Figure 10**). Ces résultats ont montré la possibilité de détecter et de détecter une grande majorité des HMOs dans le lait maternel en quelques minutes. De plus, les isomères présents dans l'échantillon nous ont permis de classer l'échantillon de lait étudié comme appartenant au groupe sécréteur.

A) Spectre de masse en ionisation ESI négative du lait maternel



B) Analyse IM-MS en mode ciblé pour les isomères 2'FL/3FL



C) Spectres MS/MS extraits en mode IM-MS global des isomères 2'FL/3FL

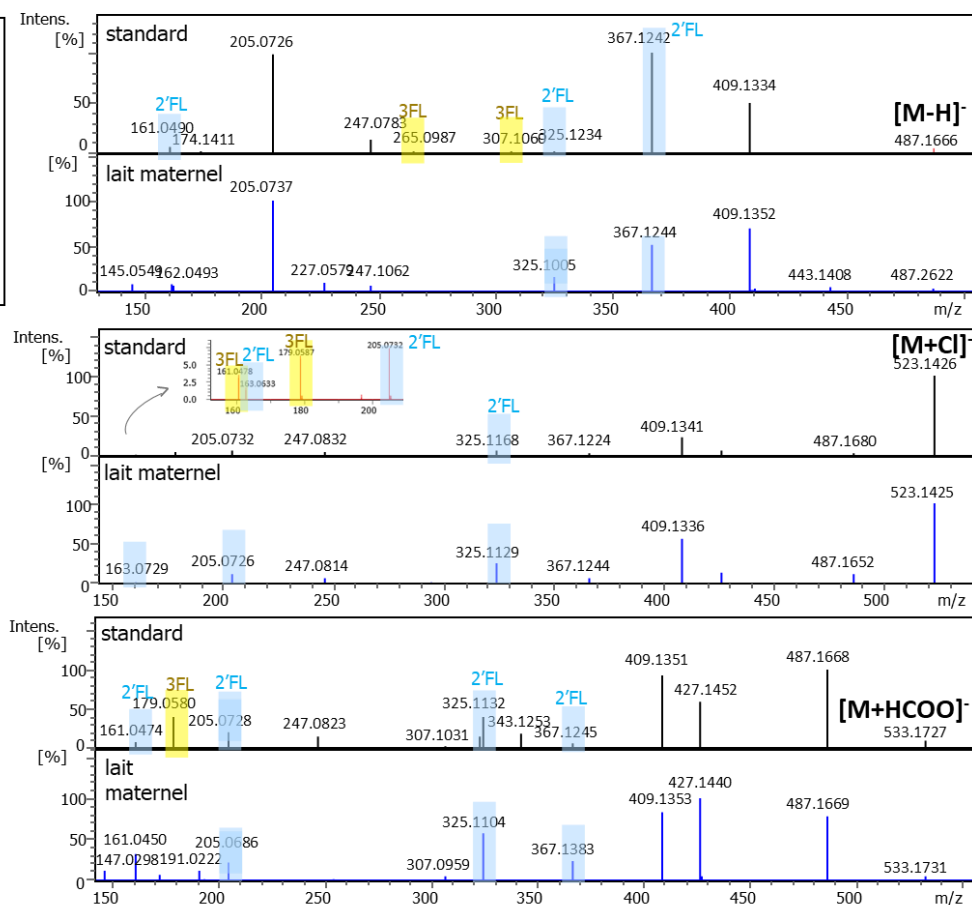


Figure 10. A) Spectre de masse de l'échantillon de lait maternel (dilution 1:2000 dans MeOH/H₂O) analysé par IM-MS en ionisation ESI négative. Les ions des HMOs détectés dans l'échantillon sont annotés sur le spectre de masse. B) Spectres de mobilité extraits pour plusieurs espèces ioniques des isomères 2'FL/3FL analysés en mode IM-MS ciblé à partir du mélange des composés standards et de l'échantillon de lait maternel délipidé en ionisation ESI négative et positive. C) Spectres MS/MS avec acquisition en mode IM-MS global des composés 2'FL/3FL à partir du mélange de composés standards et de l'échantillon de lait maternel délipidé en tant que [M-H]⁻ (CID, 30 eV), [M+Cl]⁻ (25 eV) et [M+HCOO]⁻ (20 eV)

Dans ce chapitre, nous avons montré le potentiel du couplage IM-MS, tout particulièrement avec une cellule de mobilité TIMS pour la distinction et caractérisation de composés isomères en matrice complexe. De manière générale, nous avons tout d'abord mené des analyses de composés standards avec une large gamme de mobilité et une résolution en mobilité moyenne. Dans ces conditions, une empreinte globale de l'échantillon est acquise mais seul un nombre limité d'isomères ont pu être séparés (voir $E_2\beta$ -3G/ $E_2\beta$ -17G sous forme $[M-H]^-$ ou LNT/LNnT sous forme $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$), soulignant la difficulté d'analyser des composés de structures similaires. Néanmoins, nous avons montré que, cas échéant, différentes solutions analytiques peuvent être déployées afin de distinguer un groupe d'isomères : des analyses ciblées à plus haute résolution peuvent être menées (voir les exemples des isomères LSTa, b et c sous forme $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+/[M-H+Ca]^+$), la formation d'ions adduits peut, dans certains cas, améliorer la séparation par mobilité ionique (voir forme $[M+Li]^+$ pour les composés $E_2\alpha/E_2\beta$ et 2-MeO- $E_2\beta$ /4-MeO- $E_2\beta$) ou encore via la formation de multimères non-covalents (voir forme $[2M+Li]^+$ pour les composés $E_2\alpha/E_2\beta$ et 2-MeO- $E_2\beta$ /4-MeO- $E_2\beta$). Enfin, des analyses de type IM-MS/MS ont permis d'obtenir des ions fragments diagnostiques (voir 2'FL/3FL; LNDFH I/II; LNT/LNnT et LNFP I/II/V/VI en ionisation négative) facilitant la distinction d'isomères non ou partiellement séparés par mobilité ionique. Toutes ces solutions analytiques ont été employées avec succès dans l'analyse d'échantillons biologiques (urine humaine et lait maternel) à l'exception de la formation de dimères qui reste défavorisée en matrice complexe. En conclusion, l'analyse directe à l'aide de l'instrument TIMS-TOF apparaît être très prometteuse pour la caractérisation de matrices biologiques à haut débit et à large échelle, sans préparation d'échantillon extensive.

Chapitre III : Création d'une base de données de valeurs CCS de métabolites standards

Dans ce dernier chapitre, nous présentons la création d'une base de données de valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ produite à partir de métabolites standards afin d'améliorer l'étape d'identification du workflow métabolomique. En effet, cette étape reste un des principaux freins aux études métabolomiques (Viant et al., 2017). Cela est dû au fait que le métabolome est composé d'un grand nombre de composés et que peu d'entre eux sont disponibles commercialement en tant que standards, limitant la production de données spectrales de référence utilisées pour l'identification structurale. Les études métabolomiques utilisant l'approche IM-MS étant, de plus, en cours d'expansion depuis seulement quelques années, il existe à l'heure actuelle peu de bases de données de valeurs CCS pour les métabolites.

Ces travaux ont été reportés sous forme d'un article intitulé « *Creation of a Collisional Cross Section database to support metabolomics analyses and identification using trapped ion mobility-mass spectrometry* » en cours de rédaction.

Dans cet article, nous présentons la création d'une base de données de valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ à partir d'analyse de plusieurs centaines de métabolites standards, disponibles dans le cadre de l'infrastructure nationale MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010). Plus de 1300 valeurs expérimentales pour environ 400 métabolites ont ainsi été acquises au cours de mes travaux. Cependant, certains composés standards n'ont pu être détectés. Cela peut s'expliquer par la discrimination de la cellule TIMS pour le piégeage des ions de basse masse mais également par la possible dégradation de certains composés. Cette étude a également porté sur l'évaluation de la répétabilité des mesures afin de déterminer le biais à prendre en compte lors de l'étape d'identification basée sur le paramètre $^{TIMS}CCS_{N_2}$ (voir **Figure 11**). Nous avons, également, comparé notre librairie à trois autres bases de données publiées afin d'évaluer la corrélation de nos valeurs avec celles reportées et acquises sur des instruments utilisant des cellules de mobilité de type DTIMS (voir **Figure 12**). Enfin, une étude de principe a été menée sur un échantillon d'urine humaine analysé par FIA-IM-MS et LC/IM-MS. Ces deux approches nous permettent de comparer et déterminer les avantages respectifs de l'annotation d'un même échantillon dans le cadre d'une technique à haut débit et d'une méthode multidimensionnelle.

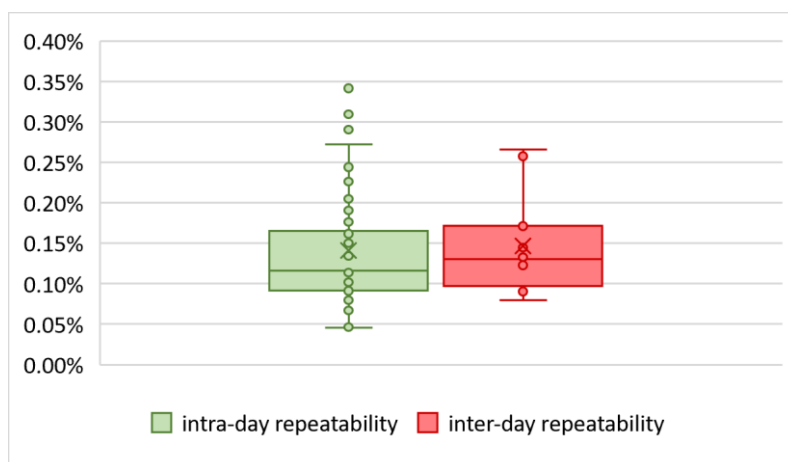


Figure 11. Evaluation de la répétabilité intra et inter-journalier

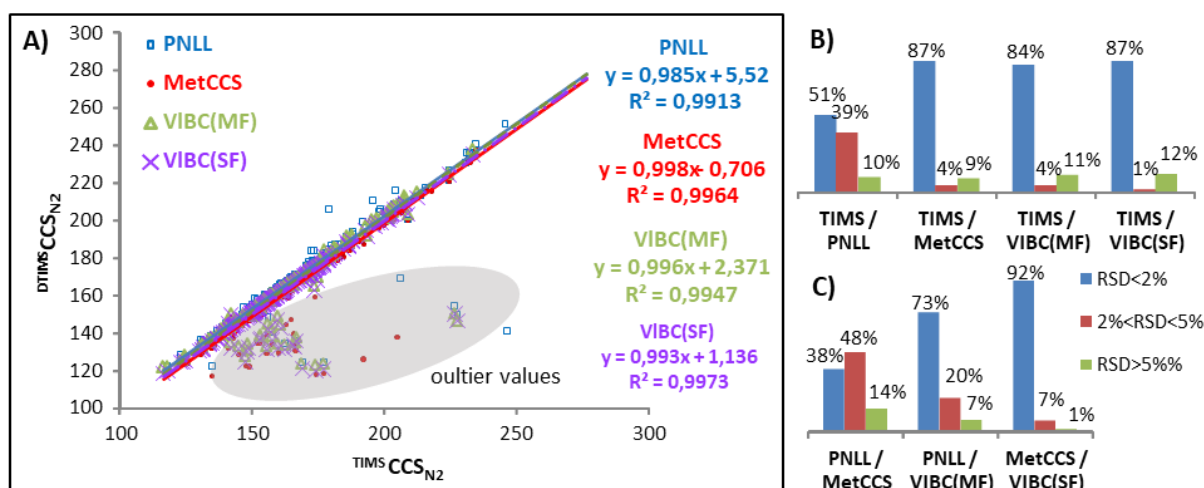


Figure 12. Comparaison de la base de données TIMS avec trois bases de données DTIMS publiées en tant que A) régression linéaire et B) biais. Nous avons aussi évalué le biais entre les trois bases de données dans le panneau C).

Dans ce chapitre, nous rapportons la création d'une base de données contenant 1349 valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ pour 407 métabolites. Cette dernière, a été créée en prenant en compte pour l'ionisation positive les ions $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ et $[M-H_2O+H]^+$ et pour l'ionisation négative les espèces $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M-H_2O-H]^-$ et $[M-CO_2]^-$. Nous avons choisi d'étudier toutes ces formes ioniques car la multiplication de valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ pour un même composé donné permet de confirmer son identification mais également car elle est nécessaire pour certaines classes de composés qui ne se sont pas (ou peu) avérées ionisables sous les formes protonées ou déprotonées surtout en matrices biologiques. Pour la même raison, nous avons décidé de conserver les multiples pics de mobilité éventuellement observés pour une espèce donnée. Ces multiples pics sont, en effet, probablement dû à l'existence de conformères où une

localisation variable de la charge sur l'espèce ionisée. La présence de ces différents conformères est dépendante des paramètres analytiques, notamment de ceux de la source et de ceux de la préparation d'échantillon (Gabelica et al., 2019 ; Oranzi et al., 2019). Ainsi, reporter l'ensemble des valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ observées permet d'augmenter les probabilités d'identification. La comparaison de notre base de données avec trois autres librairies de valeurs $^{DTIMS}CCS_{N_2}$ publiées nous a permis de constater que nous avons produit presque 1000 nouvelles valeurs encore non reportées. Cette comparaison, nous a également permis de mettre en évidence une bonne corrélation avec les autres bases de données et en particulier avec celles utilisant le mode single-field, qui est un mode d'acquisition de l'instrument DTIMS qui doit être étalonné. En effet, les deux études utilisant le mode single-field ont utilisé la même solution étalon et il semblerait que cela permettent de diminuer les biais entre expériences inter-plateformes même équipées de cellules de mobilité différentes. Des valeurs non conformes avec celles issues des autres bases de données ont été observées, elles sont majoritairement obtenues pour des formes ayant des faibles rapports m/z et grandes valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ et sont principalement détectées en ionisation négative. Une hypothèse qui expliquerait ces observations serait que ces pics de mobilité correspondent, en réalité, à des multimères non covalents labiles qui traversent la cellule de TIMS mais se fragmentent lors du transfert vers le TOF, conduisant ainsi à un pic de mobilité élevé pour un faible m/z.

Finalement, nos mesures se sont révélées très reproductibles (RSD intra et inter-journalier inférieur à 0.5%) et robustes (décalage inférieur à 0.5% pour l'analyse de matrices complexes), nous permettant de procéder à une annotation basée sur les valeurs de $^{TIMS}CCS_{N_2}$ avec un biais de 0.5% beaucoup plus faible que celui de 2% actuellement recommandé (Paglia and Astarita, 2017; Paglia et al., 2015). Cette limite appliquée pour l'annotation nous permet, ainsi, d'atteindre un niveau de confiance plus élevé dans l'identification et d'éviter les faux positifs. Enfin, comme preuve de concept, une étude a été menée sur un échantillon d'urine humaine et a permis d'annoter 56 et 84 composés à partir d'analyses FIA-IM-MS et LC/IM-MS, respectivement en appliquant des tolérances sur les m/z, CCS et RT de 5 ppm, 0.5% et 2 min, respectivement.

Conclusion

Ce travail de thèse s'est intéressé au développement d'approches basées sur le couplage de la spectrométrie de mobilité ionique à la spectrométrie de masse (IM-MS) pour des analyses métabolomiques à large spectre. En particulier, ce travail a porté sur l'utilisation de cette technique combinée à l'introduction directe (DI) des échantillons afin de pouvoir réaliser des analyses à haut débit pour faciliter l'étude de cohortes, par exemple. L'approche DI-IM-MS a été développée sur un instrument TIMS-TOF commercialisé par Bruker Daltonics. L'avantage de cette récente technologie par rapport aux autres cellules de mobilité disponibles à l'heure actuelle est sa capacité à faire varier son pouvoir résolutif. Cette capacité permet, ainsi, avec un seul et même instrument de réaliser des analyses de type globales pour la détection exhaustive (ou du moins la plus large possible) des composés présents dans un échantillon mais également de mener des analyses ciblées pour améliorer la séparation des espèces similaires telles que les isobares ou les isomères.

Afin d'évaluer la capacité de l'instrumentation TIMS-TOF à séparer les composés isomères par analyse directe, plusieurs études ont été menées sur divers composés standards modèles tels que des métabolites d'estradiol ainsi qu'une variété d'oligosaccharides du lait maternel. Ces études ont permis de mettre en évidence la robustesse des mesures réalisées par mobilité ionique et la possibilité de séparer des composés structuralement très proches tels que les stéréoisomères, en optimisant entre-autres les conditions analytiques: via la formation d'adduits ou encore celle de dimères non-covalents, par exemple. En outre, des analyses de type IM-MS/MS ont parfois été mises en oeuvre pour caractériser certains isomères grâce à la détection d'ions fragments diagnostiques.

Un autre intérêt majeur de l'approche par mobilité ionique est d'accéder à un paramètre d'identification : le Collisional Cross Section (CCS). Ce paramètre est primordial pour les analyses IM-MS par introduction directe car il permet de caractériser et d'annoter les signaux avec deux paramètres (CCS et m/z). Même si les mesures par spectrométrie de mobilité ionique (CCS) et spectrométrie de masse (m/z) suivent généralement une même tendance par famille de composés et sont donc liées par principe, le CCS reste un paramètre de choix pour l'étape d'identification des approches métabolomiques, étant donné qu'il n'est pas (ou peu) impacté par les effets matrices (notamment en comparaison avec le temps de rétention). De plus, ce paramètre est indépendant du type de cellule de mobilité ionique employé, il peut donc être utilisé dans les études inter-plateformes impliquant différents laboratoires et/ou différentes technologies de mobilité ionique.

Dans ce contexte, nous avons menés plusieurs études qui ont prouvé que les mesures de CCS n'étaient pas significativement impactées en matrice complexe ($RSD < 0.5\%$). En effet, via la comparaison de la réponse analytique de standards en solution pure ou présents dans une matrice biologique (urine humaine ou lait maternel), un faible biais a été systématiquement déterminé. Quant à l'interopérabilité des valeurs CCS vis-à-vis de la cellule employée, nos travaux ont mis en évidence que l'étape d'étalonnage utilisée pour déterminer les valeurs CCS est nécessaire dans la plupart des cellules de mobilité ionique (notamment pour le TIMS), constitue le facteur critique qui peut entraîner des biais dans les mesures expérimentales. Nous avons, en effet, observé que les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ après étalonnage avec une solution de calibration ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent) étaient globalement en accord avec des valeurs publiées par d'autres groupes utilisant une instrumentation DTIMS mais les écarts (entre valeurs de CCS) les moins importants étaient obtenus entre nos mesures et celles effectuées sur des DTIMS en mode single-field étalonnés avec la même solution de calibration que la notre. Nous avons, également, ponctuellement observé des écarts importants pour certains composés et tout particulièrement dans l'étude des estradiols pour les formes dimériques : les espèces monomériques présentaient des $^{TIMS}CCS_{N_2}$ cohérents avec ceux reportés sur des instrumentations TWIMS mais de grandes erreurs ont été observées pour les composés dimériques. Ces biais sont probablement liés au choix des composés étalons, les ions de la solution étalon étant eux-mêmes des ions monomériques. Il faut souligner que certains écarts observés étaient dû à des fragmentations métastables induisant des mesures erronées comme nous l'avons vu lors de la création de la base de données. Ainsi, dans l'ensemble, nos travaux démontrent de l'importance de définir une procédure de calibration universelle, afin que les valeurs CCS enregistrées sur un instrument donné puissent être partagées avec la communauté sans dépendre de la cellule employée.

Au vu de la robustesse de nos analyses ($RSD < 0.5\%$) et du besoin d'identifier correctement les signaux à partir d'une prise d'empreintes métabolomiques, nous avons décidé de construire une base de données $^{TIMS}CCS_{N_2}$ à partir de métabolites standards. Ce travail a permis de rassembler plus de 1300 valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ pour plus de 400 métabolites. Une annotation sur les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ avec une erreur de 2% peut être appliquée pour une étude inter-plateforme et pour des analyses issues de notre laboratoire, i.e. sur notre instrument avec les mêmes conditions analytiques, nous avons montré qu'il est même possible d'annoter un échantillon complexe avec une tolérance bien inférieure de 0.5%. Nous avons, ainsi, pu identifier 56 composés sur la base des valeurs m/z (tolérance de 5ppm) et CCS (tolérance de 0.5%) pour l'analyse d'une urine humaine par FIA-IM-MS.

L'ensemble de mes travaux de recherches a permis d'évaluer les avantages et les limites d'une approche directe FIA-TIMS-TOF pour des analyses métabolomiques. Une telle approche permet de réaliser des analyses à haut débit tout en fournissant deux paramètres d'identification, le m/z et le $^{TIMS}CCS_{N_2}$. Les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ étant très reproductibles et robustes et peu ou pas impactées par les effets de matrice, elles représentent un critère d'identification de choix. Cependant, le TIMS étant un instrument pour lequel la calibration des valeurs CCS est essentielle, il est primordial de développer un protocole commun au sein de la communauté scientifique afin de pouvoir réutiliser les valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$ expérimentales entre laboratoires utilisant différentes cellules de mobilité. Comme, pour toute méthode par introduction directe, les analyses FIA-TIMS-TOF subissent des effets matrices qui peuvent impacter l'empreinte spectrale acquise. Il est possible d'utiliser une technique chromatographique pour réduire ces effets et fournir un troisième facteur d'identification (temps de rétention) mais cet ajout se fait au détriment du caractère haut débit de l'analyse. Pour des analyses FIA-IM-MS, l'utilisation de cellules de mobilité à haute résolution s'avère primordiale. Elles permettent, en effet, d'identifier un maximum de composés notamment via la distinction des composés isomères présentant des mobilités très proches. Dans ce contexte, seuls les instruments plus récents présentant des capacités de séparation élevées, tels que le TIMS (en mode ciblé), le TWIMS cyclique ou le SLIM, peuvent être employés pour des approches directes. Enfin, le couplage de la MS/MS à une analyse FIA-TIMS-TOF s'avère extrêmement utile pour la distinction de certains groupes d'isomères et permet d'apporter un troisième facteur d'identification tout en conservant une analyse à haut débit.

Les travaux de cette thèse ont permis de démontrer le potentiel du couplage IM-MS pour des prises d'empreintes métabolomiques mais également pour des études ciblées. Les analyses non-ciblées sont désormais possible grâce au développement de méthodes d'analyse IM-MS globale et à la création d'une base de données de valeurs $^{TIMS}CCS_{N_2}$. Pour les analyses ciblées, la séparation et caractérisation des isomères de valeurs CCS très proches ont pu être obtenues notamment via l'optimisation des conditions analytiques. Cependant, d'autres investigations sont à poursuivre afin d'évaluer le potentiel de l'instrumentation TIMS-TOF en termes de mesures quantitatives ou tout du moins relatives des composés présents dans les matrices biologiques afin d'obtenir des analyses métabolomiques plus complètes.

REFERENCES

- Alonso A**, Marsal S, Julia A. 2015. Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015. *Front Bioeng Biotechnol* 3.
- Azad MB**, Robertson B, Atakora F, Becker AB, Subbarao P, Moraes TJ, Mandhane PJ, Turvey SE, Lefebvre DL, Sears MR, Bode L. 2018. Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. *J Nutr* 148:1733-1742.
- Bode L**. 2015. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum Dev* 91:619-622.
- Clemmer DE**, Hudgins RR, Jarrold MF. 1995. Naked Protein Conformations: Cytochrome c in the Gas Phase. *J Am Chem Soc* 117:10141-10142.
- Delvaux A**, Rathahao-Paris E, Alves S. 2020a. An Emerging Powerful Technique for Distinguishing Isomers: Trapped Ion Mobility Spectrometry Time-of-flight Mass Spectrometry for Rapid Characterization of Estrogen Isomers. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 34:8928.
- Delvaux A**, Rathahao-Paris E, Alves S. 2021a. Different ion mobility-mass spectrometry coupling techniques to promote metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 1-27.
- Delvaux A**, Rathahao-Paris E, Guillon B, Cholet S, Adel-Patient K, Fenaille F, Junot C, Alves S. 2021b. Trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry for high throughput and high resolution characterization of human milk oligosaccharide isomers. *Under submission*
- Dodds JN**, Baker ES. 2019. Ion mobility spectrometry: Fundamental concepts, instrumentation, applications, and the road ahead. *J Am Soc Mass Spectrom* 30:2185-2195.
- Eiceman GA**. 2002. Ion-mobility spectrometry as a fast monitor of chemical composition. *TrAC Trends Anal Chem* 21:259-275.
- Eiceman GA**, Karpas Z, Hill HH. 2013. Ion Mobility Spectrometry. 3rd ed.. CRC Press, pp. 400.
- Ewing RG**, Atkinson DA, Eiceman GA, Ewing GJ. 2001. A critical review of ion mobility spectrometry for the detection of explosives and explosive related compounds. *Talanta* 54:515-529.
- Gonzalez TL**, Rae JM, Colacino JA. 2019. Implication of environmental estrogens on breast cancer treatment and progression. *Toxicology* 421:41-48.
- Haggarty J**, Burgess KE. 2017. Recent advances in liquid and gas chromatography methodology for extending coverage of the metabolome. *Curr Opin Biotechnol* 43:77-85.
- Harris RA**, Leaptrot KL, May JC, McLean JA. 2019. New frontiers in lipidomics analyses using structurally selective ion mobility-mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 116: 316-323.
- Ikeda K**, Horie-Inoue K, Inoue S. 2019. Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 191:105375.
- Kunz C**, Meyer C, Collado MC, Geiger L, García-Mantrana I, Bertua-Ríos B, Martínez-Costa C, Borsch C, Rudloff S. 2017. Influence of Gestational Age, Secretor, and Lewis Blood Group Status on the Oligosaccharide Content of Human Milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 64:789-798.
- Lobo RA**. 1995. Benefits and risks of estrogen replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 173:982-989.
- Mäkinen MA**, Anttalainen OA, Sillanpää MET. 2010. Ion Mobility Spectrometry and Its Applications in Detection of Chemical Warfare Agents. *Anal Chem* 82:9594-9600.
- Paglia G**, Williams JP, Menikarachi L, Thompson JW, Tyldesley-Worster R, Halldórsson S, Rolfsson O, Moseley A, Grant D, Langridge J, Palsson BO, Astarita G. 2014. Ion mobility derived collision cross sections to support metabolomics applications. *Anal Chem* 86:3985-3993.
- Patti GJ**, Yanes O, Siuzdak G. 2012. Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:263-269.
- Plaza-Díaz J**, Fontana L, Gil A. 2018. Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. *Nutrients* 10:1038.
- Purves RW**. 2018. Enhancing biological LC-MS analyses using ion mobility spectrometry. In: Donald WA, Prell JS, editors. *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, pp. 205-240.
- Quin C**, Vicaretti SD, Mohtarudin NA, Garner AM, Vollman DM, Gibson DL, Zandberg WF. 2020. Influence of Sulfonated and Diet-Derived Human Milk Oligosaccharides on the Infant Microbiome and Immune Markers. *J Biol Chem* 295:4035-4048.
- Rižner TL**. 2013. Estrogen biosynthesis, phase I and phase II metabolism, and action in endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol* 381:124-139.
- Rodriguez C**, Patel AV, Calle EE, Jacob EJ, Thun MJ. 2001. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. *J Am Med Assn* 285:1460-1465.
- Smolinska A**, Blanchet L, Buydens LMC, Wijmenga SS. 2012. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Anal Chim Acta* 750:82-97.
- Viant MR**, Kurland IJ, Jones MR, Dunn WB. 2017. How close are we to complete annotation of metabolomes? *Curr Opin Chem Biol* 36, 64-69.
- Wu Q**, Wang JY, Han DQ, Yao ZP. 2020. Recent advances in differentiation of isomers by ion mobility mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 124:115801.
- Zhong Y**, Hyung SJ, Ruotolo BT. 2012. Ion mobility-mass spectrometry for structural proteomics. *Expert Rev Proteomics* 9:47-58.

ANNEXE

Principe de fonctionnement de la cellule TIMS (Trapped Ion Mobility Spectrometry)

1. Introduction

Initialement connue comme la chromatographie ionique, la mobilité ionique s'est beaucoup développée ces dernières décennies de par ses capacités d'analyse à haut débit ainsi que sa haute sensibilité et sélectivité (Dodds and Baker, 2019). Cette technique consiste à séparer des composés ionisés à l'état gazeux en fonction de leur forme et de leur charge. Elle est encore aujourd'hui beaucoup utilisée en tant qu'appareil autonome et portable pour la détection de composés à des niveaux de traces dans des échantillons gazeux. Elle est notamment employée en routine pour la détection d'explosifs (Ewing et al., 2001) ou d'agents chimiques dans des opérations militaires (Mäkinen et al., 2010), des événements sportifs ou encore des aéroports (Eiceman et al., 2002). Ce principe de séparation d'ions se prête également facilement au couplage avec la spectrométrie de masse pour des analyses plus spécifiques, ce qui permet d'utiliser le couplage mobilité ionique - spectrométrie de masse dans d'autres domaines que ceux précédemment cités, tels que l'environnement, les analyses métabolomiques ou encore les diagnostics cliniques (Eiceman et al., 2013).

Le principe général de la mobilité ionique et les différents types de cellules sont décrits dans le **Chapitre I** du manuscrit. Nous présentons, ici, la cellule de mobilité TIMS (Trapped Ion Mobility Spectrometry-Time of Flight) développée relativement récemment (Fernandez-Lima et al., 2011b; Hernandez et al., 2014) et implémentée dans l'instrument timsTOF commercialisé par Bruker Daltonics (Silveira et al., 2017). Le principe de fonctionnement de ce type de technologie est inversé par rapport à celui de la mobilité classique. En effet, dans la cellule TIMS les ions sont maintenus stationnaires dans un gaz tampon en mouvement grâce à un champ électrique qui compense leur force de dérive. Selon leur taille et leur charge, chaque ion est alors piégé à un endroit donné sur le gradient de champ électrique. Une élution progressive permet de séparer ces différents ions.

2. Principe de fonctionnement

La cellule TIMS est divisée en 3 sections : la zone d'entrée, la zone d'analyse en mobilité et la zone de sortie. Ces sections sont constituées d'un ensemble d'électrodes circulaires chacune divisée en 4 segments électriquement isolés les uns des autres. Ces électrodes ont toutes le

même diamètre extérieur, seul leur diamètre intérieur varie. Il passe de 20 à 8 mm dans la zone d'entrée, reste constant dans la zone d'analyse et enfin diminue de 8 à 1 mm dans la zone de sortie (pour le prototype d'origine). Dans la région d'entrée et de sortie, le potentiel RF (Radio Frequency) appliqué aux électrodes est déphasé de 180° les unes des autres, créant un champ dipolaire qui éloigne les ions de la paroi de la cellule. Dans la région d'analyse en mobilité, la phase du potentiel RF alterne non pas entre les électrodes adjacentes mais entre les segments adjacents, ce qui crée un champ quadripolaire permettant de confiner radialement les ions et d'éviter leur perte due à la diffusion. Ce confinement conduit à une meilleure transmission des ions et donc à une meilleure sensibilité.

La vitesse du gaz est régulée par la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la cellule. Cette différence de quelques mbars produit des vitesses de l'ordre de 150 m.s^{-1} . La plupart du temps, le diazote est utilisé comme gaz dans les cellules de mobilité et c'est notamment le cas dans l'instrument commercial timsTOF (Bruker Daltonics), dont le schéma est représenté en **Figure 1**.

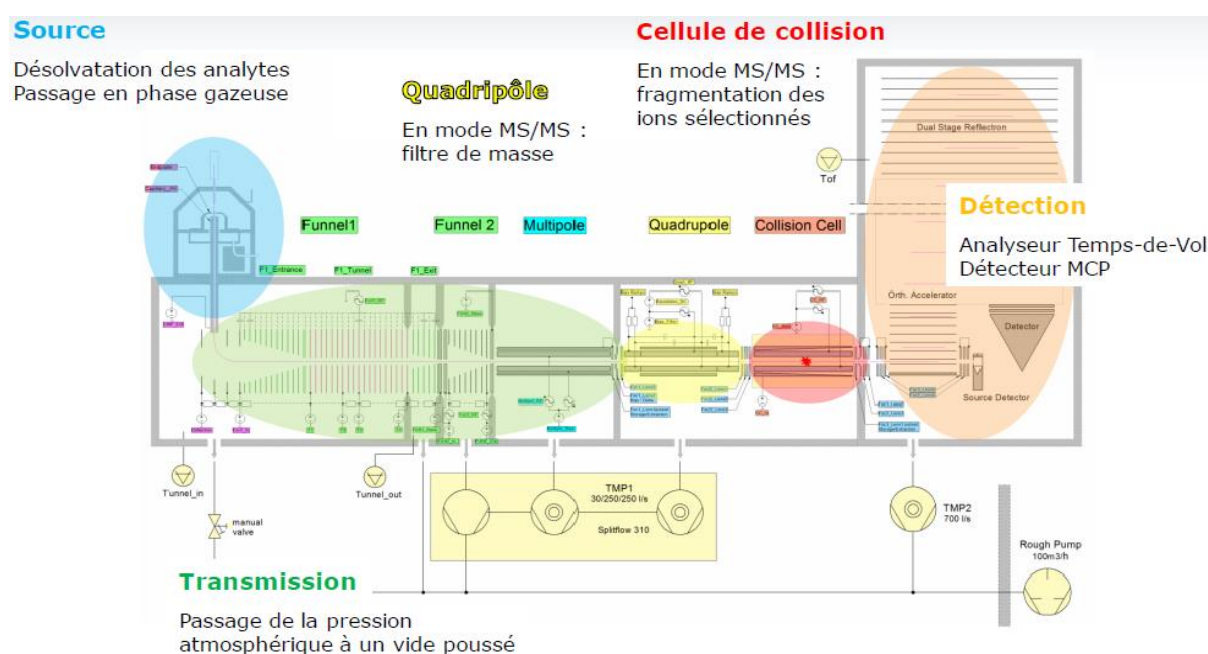


Figure 1. Schéma de l'instrument TIMS TOF (Bruker Daltonics) adapté du manuel timsTOF, Bases et théorie présenté par Aurélie Mème et Alexandre Verdu.

Les ions sont produits par une source d'ionisation électrospray (ESI) puis se dirigent à travers un capillaire en verre dans l'interface de la source où ils sont réfléchis vers la zone d'entrée de la cellule grâce à une plaque déflectrice répulsive. Le TIMS peut, alors, être utilisé dans plusieurs modes de fonctionnement.

Il peut opérer en mode transmission seule, dans ce cas les ions sont transmis à l'analyseur en masse sans séparation en mobilité en appliquant des potentiels plus élevés aux électrodes d'entrée que celles de sortie pour être plus répulsives. Dans ce mode, des spectres de masse classiques sont produits.

En mode mobilité (voir **Figure 2a**), la séparation se déroule en plusieurs étapes. Les ions sont injectés par le flux de gaz dans la zone d'analyse où règne un faible gradient de champ électrique axial ($E/p < 10 \text{ V.cm}^{-1}.\text{Torr}^{-1}$) créé par l'application sur les électrodes de courants DC (Direct Current) variables. La différence de tension entre les électrodes d'entrée et de sortie crée un champ électrique croissant le long de l'analyseur. Les ions ayant des mobilités situées dans une gamme de mobilité choisie seront donc retenus par le champ électrique tandis que le gaz les empêche de reculer et que le champ quadripolaire les empêche de s'échapper radialement. Les ions se retrouvent ainsi «piégés». Le temps de remplissage de la cellule peut varier selon le nombre d'ions étudiés (il faudra faire attention aux effets de charge d'espace résultants, voir **partie 5**). Le temps de remplissage typique est de l'ordre de 10 ms. Les différents ions qui pénètrent dans la zone d'analyse ont des positions différentes dans le gradient de champ électrique en fonction de leur mobilité. Les ions de faible mobilité seront maintenus dans les régions où la force électrique est la plus élevée (vers la sortie) tandis que les ions de mobilités supérieures seront plutôt retenus vers l'entrée de l'analyseur où le champ électrique est le plus faible. Il est à noter que les ions de mobilités trop faibles ne sont pas piégés. Le champ électrique est ensuite lentement diminué pendant un temps appelé le temps de rampe (t_{ramp}) à une certaine vitesse, la vitesse de rampe ou vitesse de balayage (v_{ramp}), ce qui permet aux ions de sortir successivement de la cellule. Les composés sont progressivement élués selon leur mobilité de plus en plus élevée vers la zone de sortie où ils sont focalisés par les lentilles optiques qui les dirigent vers l'analyseur en masse. Pendant l'élution, des spectres de masse sont acquis et chacun correspond à un voltage d'élution donné et donc à une mobilité ionique donnée. Après avoir vidé la zone de séparation, un nouveau cycle d'analyse recommence. Plusieurs analyses TIMS successives peuvent être cumulées pour produire un spectre TIMS-MS statistiquement cohérent.

Lorsque le temps de remplissage est atteint, un potentiel appliqué sur la plaque déflectrice à l'entrée de la cellule TIMS empêche de nouveaux ions d'entrer dans la cellule. Pendant ce temps, ont lieu les étapes de piégeage et d'élution. Une partie de l'échantillon est donc perdue lors de la séparation. Le duty cycle, qui est un paramètre lié à la quantité d'ions transmis de la source d'ionisation à l'analyseur, est donc limité à 50% pour des temps de remplissage et de

séparation égaux. Grâce à une zone de séparation modifiée dans l'appareil développé par Bruker Daltonics, des duty cycles plus élevés peuvent être atteints (voir **Figure 2b**). Dans cet instrument, la longueur de la zone de séparation a été doublée permettant d'intégrer une zone d'accumulation des ions avant la zone d'analyse. Ainsi, une population d'ions peut être stockée pendant qu'une autre est analysée, permettant d'atteindre un duty cycle allant jusqu'à 100%.

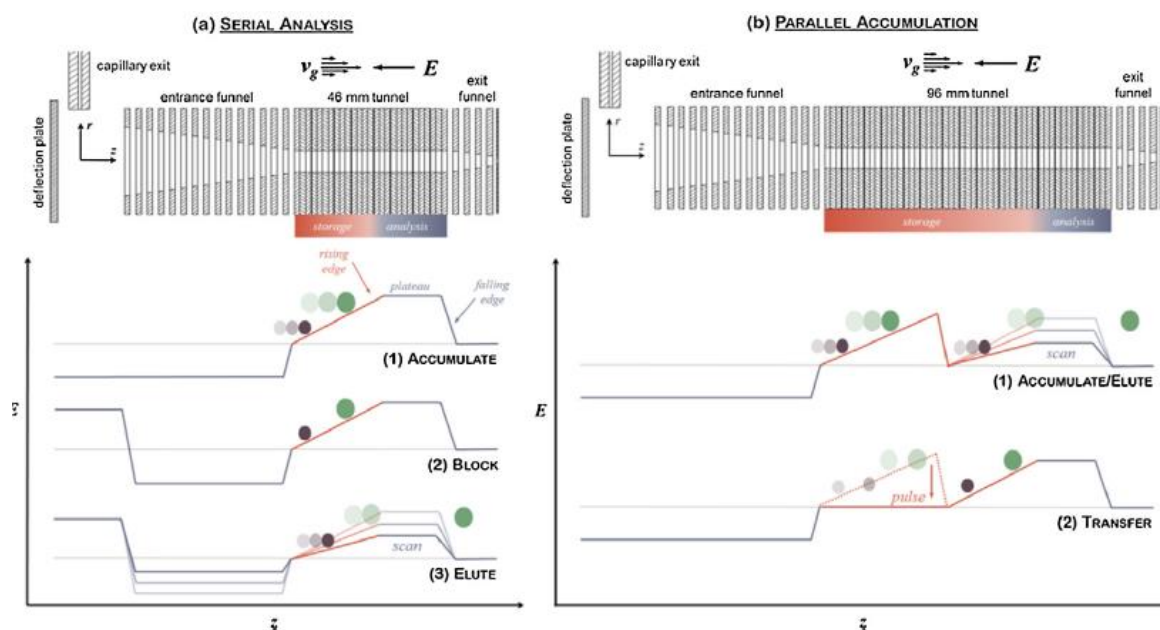


Figure 2. Schéma a) du prototype TIMS et b) du TIMS-TOF développé par Bruker Daltonics. Adapté de Silveira et al. 2017

3. Instruments commerciaux

À la suite de la commercialisation du timsTOF, Bruker Daltonics a depuis développé trois nouveaux instruments appelés timsTOF pro, timsTOF flex et timsTOF flex MALDI-2. Le timsTOF pro est un appareil développé pour des applications de protéomiques qui inclut un nouveau mode de scan en masse. Le mode PASEF (parallel accumulation – serial fragmentation) permet de réaliser plusieurs spectres MS/MS pour un seul spectre de mobilité. La fenêtre d'isolation du quadropôle varie, en effet, au cours de l'analyse pour adapter le m/z à celui de l'ion sortant du TIMS tout le long de l'analyse en mobilité (Meier et al., 2018). Le timsTOF flex comprend la technologie timsTOF pro avec une double source d'ionisation ESI-MALDI permettant de réaliser des analyses d'imagerie (Spraggins et al., 2019). Enfin, le timsTOF flex MALDI-2 contient un laser secondaire de post ionisation permettant d'augmenter le nombre de composés détectés d'un ordre 2 à 3 par rapport à un timsTOF flex classique (Soltwisch et al., 2020).

4. Détermination des valeurs ^{TIMS}CCS

Comme toute spectrométrie à mobilité ionique, la technologie TIMS permet d'obtenir la mobilité des ions étudiés (K). En effet, ce paramètre peut être calculé selon l'équation (1) :

$$K = \frac{v_g}{E} = \frac{A}{(V_{out} - V_{elut})} \quad (1)$$

où v_g est la vitesse du gaz, E le champ électrique, V_{elut} le voltage appliqué pour retenir les ions et V_{out} celui sur la dernière électrode de la zone de séparation. A est une constante de calibration qui peut être obtenue expérimentalement à partir de standards connus via une calibration interne ou externe. On peut noter que V_{elut} est indépendant des paramètres de rampe à une vitesse de gaz donnée. À partir des valeurs de mobilités, il est ensuite possible de déterminer les valeurs ^{TIMS}CCS via l'équation (2) :

$$^{TIMS}CCS = \frac{(18\pi)^{0.5}}{16} \frac{z}{(k_B T)^{0.5}} \left(\frac{1}{m_i} + \frac{1}{m_b} \right)^{0.5} \frac{760 T}{273.15 K_0 P N^*} \quad (2)$$

où z correspond à la charge de l'ion, k_B à la constante de Boltzmann, N^* et T au nombre de densité et à la température du gaz, et m_i et m_b sont respectivement les masses des molécules ioniques et du gaz.

Il a été montré que la calibration en mobilité joue un rôle important sur la détermination des valeurs CCS (Collisional Cross Section). En effet, selon les ions calibrants choisis la valeur CCS déterminée pourra être plus ou moins précise. Les meilleurs résultats seraient obtenus en utilisant des ions calibrants structuellement proches aux ions à calibrer (Hines et al., 2017b) et de même charge (Pagel et al., 2013). Le ESI-L Low Concentration Tuning Mix d'Agilent Technologies (G1969-85000) a été utilisé pour l'ensemble des mesures réalisées au cours de cette thèse. Pour évaluer la qualité des valeurs CCS obtenues une étude comparative a été menée au **Chapitre II.1**.

5. Résolution en mobilité

Dans un TIMS vu que les différents composés analysés sont piégés à différentes mobilités pour différentes forces de champ électrique tout en gardant la même vitesse du gaz, chaque pic aura une résolution différente. Cette dernière pour un ion donné s'exprime selon l'équation (3) :

$$R = \frac{K}{\Delta K} = \frac{(V_{out} - V_{elut})}{\Delta V_{elut}} \quad (3)$$

La capacité de séparation dans le TIMS dépend de la vitesse du gaz, du confinement des ions et de la vitesse de balayage. Lorsque la vitesse du gaz augmente, une meilleure résolution peut être obtenue mais cette augmentation requiert également un champ électrique plus intense pour

compenser les forces de frottement accrues. Le potentiel RF appliqué sur les électrodes de la zone d'analyse joue également un rôle important sur la résolution des pics de mobilités. En effet, si le potentiel RF est trop faible les ions sont mal confinés, une partie est perdue par neutralisation sur la paroi de la cellule. En revanche, si ce potentiel est trop élevé le nuage d'ions se disperse dans la direction axiale pour compenser la répulsion coulombienne, ce qui entraîne une augmentation de la largeur du pic (FWHM) et donc de la résolution. Il est à noter que cette diffusion axiale est toutefois limitée par la largeur du champ électrique nécessaire pour piéger le nuage d'ions et de ce fait, la largeur du pic est limitée.

Les paramètres d'élution peuvent également être modifiés par l'utilisateur pour changer la résolution d'analyse. En effet, la vitesse de balayage ou vitesse de rampe, v_{ramp} s'exprime selon l'équation (4) :

$$v_{\text{ramp}} = \frac{\Delta v_{\text{ramp}}}{t_{\text{ramp}}} \quad (4)$$

Plus la plage de voltages considérés (Δv_{ramp}) est faible et plus le temps de rampe (t_{ramp}) est long. En d'autres termes, plus la vitesse de balayage (v_{ramp}) est grande, meilleure sera la résolution. Cependant, pour des temps d'analyse supérieurs à 30 ms (pour l'appareil TIMS TOF, Bruker Daltonics), la résolution atteint un plateau et n'augmente plus à cause des effets de charge d'espace (voir partie 5) (Silveira et al., 2017).

Différents modes d'analyse sont, ainsi, disponibles sur l'instrument timsTOF (voir **Figure 3**). Ces différents modes permettent d'atteindre des résolutions plus ou moins élevées sur des gammes plus ou moins larges selon les applications voulues. Il est à noter que les hautes résolutions ne peuvent être obtenues qu'à condition de réduire la largeur de la gamme en mobilité. Le mode Survey (voir **Figure 3a**) permet d'obtenir des résolutions comprises entre 30 et 50 pour des larges gammes de mobilité (largeur maximale de 1.62 V.s.cm^{-2}) le mode Detect (voir **Figure 3b**) permet quant à lui d'obtenir des résolutions entre 50 et 90 pour des gammes plus restreintes (largeur maximale de 1.62 V.s.cm^{-2}) enfin le mode Ultra (voir **Figure 3c**) permet d'atteindre les plus hautes résolutions comprises entre 120 et 180 mais pour des gammes en mobilité beaucoup plus resserrées (largeur maximale de 0.35 V.s.cm^{-2}). Lors de nos analyses, le mode Detect a été employé afin de réaliser des empreintes larges et globales tandis que le mode Ultra a lui été appliqué pour des analyses plus fines et résolues.

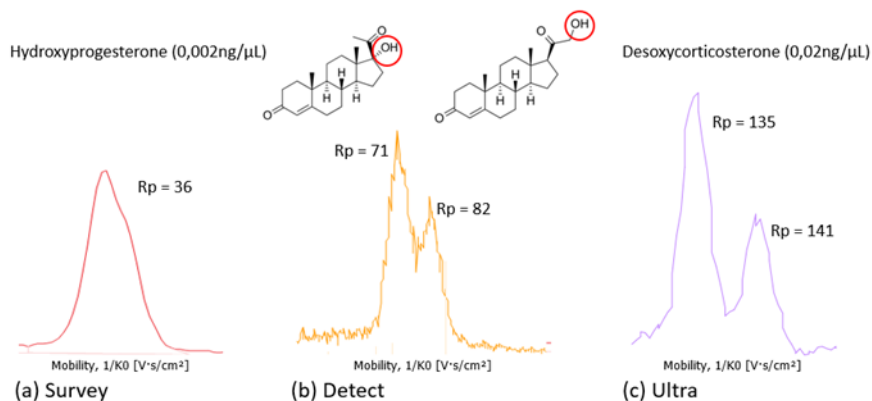


Figure 3. Spectres de mobilité extraits pour l'ion $[M+H]^+$ de m/z 331 pour les composés isomères hydroxyprogesterone et desoxycorticosterone dans les différents mode d'analyse en mobilité disponibles sur l'instrument TIMS TOF (Bruker Daltonics)

6. Effets de charge

Le TIMS présente des similarités avec un piège à ions, il est donc sensible aux effets de charge d'espace qui résultent de la répulsion coulombienne entre particules de même charge et peuvent avoir un impact sur l'efficacité de la séparation en mobilité. Dans l'instrument développé par Bruker Daltonics, l'évaluation des effets de charge d'espace montre qu'environ $10^6/10^7$ d'espèces formées à partir du Tuning Mix peuvent être analysées sans perte de performance analytique (Silveira et al., 2017). Les effets de charge d'espace sur la résolution selon le duty cycle ont également été évalués. Il a été montré que pour des valeurs de duty cycle compris entre 1 et 10%, la résolution est plutôt constante et il n'y a pas d'élargissement des pics dû aux effets de charge d'espace. En revanche, un duty cycle supérieur à 10% conduit à une diminution de la résolution qui peut aller jusqu'à 30% lorsqu'un duty cycle de 100% est atteint. Il faut donc essayer de limiter le temps d'accumulation pour éviter les effets de charge d'espace. Ainsi, même en utilisant l'appareil TIMS-TOF (Bruker Daltonics) qui permet de stocker une population d'ions en amont de la séparation, il faut limiter le temps d'accumulation des ions, quitte à perdre une partie de l'échantillon au niveau de la plaque déflectrice lorsque l'on souhaite réaliser des analyses à très haute résolution et donc à une vitesse de balayage élevée, ce qui entraînera une diminution du duty cycle.