

Technologie ZYMOPTIQ

Mode d'emploi



Table des matières

1	Préambule	5
1.1	Principe de la méthode	5
1.2	Echantillons	5
2	Utilisation des Zymplates	5
2.1	Préparation de l'incubation	5
2.1.1	Avant le début de la manipulation	5
2.1.2	Préparation des solutions de travail	5
2.1.3	Préparation de la plaque de transfert	6
2.2	Début de l'incubation	6
2.3	Fin de l'incubation	6
2.4	Rinçages additionnels	7
3	Préparation de la lecture des Zymplates : Zymocube et Zymosoft	7
3.1	Renseignements plaque et expérience	8
3.2	Insertion de la plaque dans le Zymocube	8
4	Déclaration du plan de plaque et acquisition	9
4.1	Déclaration du plan de plaque via « Edit experimental data »	10
4.1.1	Puits de type « Blank »	10
4.1.2	Puits de type « Reference »	10
4.1.3	Puits de type « Sample »	10
4.1.4	Définition de zones	11
4.1.5	Raccourcis clavier	11
4.2	Enregistrement du plan de plaque	11
4.3	Déclaration du plan de plaque via « Select template »	12
4.4	Déclaration du plan de plaque via « Import experimental data »	12
4.5	Lancement de l'acquisition	13
5	Analyse des résultats	14
5.1	Généralités	14
5.1.1	Ordre conseillé de vérification	14
5.1.2	Exclusions	15
5.1.3	Unités	15
5.1.4	Classement des données des tableaux	15
5.1.5	Graphiques	15
5.1.6	Plan de plaque	15
5.2	Vérification des contrôles négatifs	15
5.3	Vérification de la gamme de calibration	16
5.4	Vérification des échantillons	16
5.5	Fin de traitement des données et enregistrement	16
5.6	Fichiers exportés automatiquement par le Zymosoft	16
5.6.1	Fichier d'analyse au format « .zym »	16
5.6.2	Dossier associé à l'expérience	17
6	Utilisation du Zymosoft en mode avancé	17
7	Troubleshooting	19

1 Préambule

Avant toute utilisation des Zymplates et du lecteur associé : le Zymocube, il est impératif d'avoir pris connaissance de leurs notices respectives. Ces documents contiennent des informations importantes relatives à la sécurité ainsi qu'à la bonne utilisation et conservation de ces instruments.

1.1 Principe de la méthode

Le but est de mettre en œuvre un test enzymatique pour déterminer l'activité d'une solution enzymatique via les capteurs contenus dans les puits de la Zymplate. Un capteur est mis en contact avec la solution de travail contenant l'enzyme dans son tampon. Après un temps défini la solution est rincée et la Zymplate est séchée puis lue à l'aide du Zymocube. La lecture et l'analyse des résultats à l'aide du logiciel dédié sont également expliquées dans ce document.

1.2 Echantillons

Trois types de solutions sont nécessaires à l'utilisation des Zymplates :

- Contrôle négatif : tampon ou produit sans ajout d'enzyme, « Blank »
- Gamme de dilution de l'enzyme à tester à partir d'un échantillon d'activité connue, « Reference »
- Dilution(s) du ou des échantillon(s) à tester, « Sample »

Le nombre de dilution, les facteurs de dilutions, le nombre de prises d'essai ainsi que les bornes de gamme sont à adapter en fonction des produits à tester et des capteurs avec lesquels vous travaillez.

Il est conseillé de préparer un plan de plaque indiquant la disposition des échantillons dans la Zymplate avant la réalisation de l'expérience. La déclaration du plan de plaque dans l'interface logicielle est détaillée dans la partie « Préparation de la lecture des Zymplates : Zymocube et Zymosoft ».

2 Utilisation des Zymplates

2.1 Préparation de l'incubation

2.1.1 Avant le début de la manipulation

S'assurer que la date limite d'utilisation de la Zymplate n'est pas dépassée.

S'assurer que l'on dispose des consommables, produits et de la verrerie nécessaire à la manipulation (voir section « Liste de consommables, réactifs et équipements non fournis » de la notice d'utilisation des Zymplates).

Mettre, si besoin, l'étuve à chauffer à la température souhaitée pour l'incubation. Les Zymplates peuvent être incubées à des températures allant de 4 à 70 °C.

Préparer la solution tampon souhaitée. Aucune incompatibilité n'a été observée avec les solutions tampons classiquement utilisées en enzymologie (ex : sodium, acétate, phosphate, citrate...) à des molarités comprises entre 0 et 200 mM. De même, les Zymplates fonctionnent avec des solutions tampons dont les pH sont compris entre pH 3.0 et pH 9.0.

2.1.2 Préparation des solutions de travail

Les trois types de solutions nécessaires à l'utilisation des Zymplates (contrôle négatif, gamme de dilution de l'enzyme référence et échantillon(s) à tester) sont à préparer pour obtenir les solutions définies dans le plan de plaque.

Remarques : Certaines enzymes peuvent être sensibles à la température, dans ces cas-là, le protocole de préparation des enzymes doit être adapté pour limiter leur dégradation.

Afin de limiter l'adsorption des enzymes sur les contenants lors des dilutions ou de la réalisation de la plaque de transfert (cf. paragraphe suivant), nous recommandons l'utilisation de matériaux conçus pour limiter l'adsorption des protéines et/ou l'ajout de BSA (bovine serum albumin) à une concentration finale de 0.5 g/L dans la solution tampon.

Dans le cas où les échantillons dont on souhaite mesurer l'activité sont formulés ou si l'enzyme se trouve dans un milieu complexe (avec une potentielle présence de substances inhibant son activité) il est recommandé d'utiliser ce milieu complexe auquel l'enzyme à mesurer n'a pas été ajoutée comme contrôle négatif et comme solution de dilution pour la réalisation de la gamme.

2.1.3 Préparation de la plaque de transfert

Répartir les solutions enzymatiques selon le plan de plaque choisi dans une microplaque 96 puits.

2.2 Début de l'incubation

Ouvrir l'emballage et en sortir la Zymplate.

A l'aide d'une pipette multi-canaux, déposer 80 µl des solutions contenues dans les puits de la plaque de transfert dans les puits correspondants de la Zymplate.



A cette étape il est très important de veiller à ne JAMAIS toucher le fond des puits de la Zymplate. Ceci pourrait endommager le capteur et rendre la mesure du puits concerné impossible.

Une fois toutes les solutions transférées, couvrir la plaque à l'aide d'un film adhésif afin de prévenir toute évaporation des solutions au cours de la réaction. Afin de s'assurer de l'adhésion du film, utiliser la raclette fournie.

Placer la Zymplate dans une étuve ou un incubateur réglé à la température souhaitée. Les Zymplates sont prévues pour fonctionner à des températures d'incubation comprises entre 4°C et 70°C.

2.3 Fin de l'incubation

Sortir la plaque de l'étuve, enlever le film adhésif et vider les puits de leur contenu en retournant la plaque d'un coup sec au-dessus d'un évier ou d'un bac. Rincer tous les puits à l'eau distillée. Si le rinçage est fait à l'aide d'une pissette, s'assurer que la pression du jet d'eau soit faible afin de ne pas risquer d'endommager les capteurs. Il est également recommandé de rincer la plaque du bas vers le haut afin de prévenir une éventuelle contamination inter puits. Vider à nouveau la plaque et répéter l'opération une seconde fois.

Dans certains cas, un ou des rinçages additionnels peuvent être nécessaires, voir la section « Rinçages additionnels » ci-dessous.

Après le rinçage, sécher la plaque en la centrifugeant 2 min. Les puits de la Zymplate doivent être orientés vers l'extérieur pour permettre au liquide d'en sortir. Il est important de placer dans la centrifugeuse du papier absorbant pour absorber les gouttelettes et éviter d'endommager la centrifugeuse.

Avant de lancer la centrifugeuse, s'assurer qu'elle est équilibrée correctement : 0.1 g de différence maximum. Pour équilibrer les deux côtés, une plaque servant à faire la tare vous a été fournie lors de la livraison. Il est aussi possible d'utiliser deux Zymplates lorsque plusieurs incubations ont été réalisées en parallèle. La masse des papiers absorbants doit être incluse lors de l'équilibrage des plaques avant centrifugation.

Après deux minutes de centrifugation, vérifier qu'il ne reste pas de gouttelettes d'eau. S'il en reste beaucoup, centrifuger à nouveau. S'il reste peu ou pas de gouttelettes, laisser la Zymplate quelques minutes à l'air ambiant pour qu'elles s'évaporent.

La Zymplate est maintenant prête à être imagée.

Remarque : Dans le cas où la Zymplate n'est pas imagée immédiatement, elle doit être conservée dans son emballage afin d'être protégée des poussières et salissures.

2.4 Rinçages additionnels

Dans le cas où des solutions complexes ont été déposées dans les puits de la Zymplate, des rinçages additionnels peuvent s'avérer nécessaires pour assurer une bonne lecture des puits. Les solutions de rinçages décrites ci-dessous ont été testées par Zymoptiq et n'entraînent pas de modification des résultats d'activité des échantillons dans la quasi-totalité des cas. Dans de rares cas, des interférences ont été notées. Dans ces cas, le rinçage additionnel doit être réalisé directement après le premier rinçage, sans séchage intermédiaire de la Zymplate.

- Solution de rinçage soude : hydroxyde de sodium 20 mM dissous dans de l'eau distillée. Cette solution est utile dans le cas où le produit testé contient de nombreuses particules, notamment si elles sont de nature protéique.
- Solution de rinçage Tween : Tween 80 de 0.3 à 1% (m/v) dissous dans de l'eau distillée. Cette solution est utile dans le cas où le produit testé contient des contaminants gras.

Les rinçages additionnels peuvent être utilisés après une lecture problématique ou être effectués dès la fin de l'incubation, lors du premier rinçage. Dans le cas où ces rinçages sont réalisés en fin d'incubation, ils doivent être précédés d'un rinçage à l'eau distillée. Quel que soit le moment où le rinçage additionnel est réalisé, il doit être suivi d'au moins deux rinçages à l'eau distillée (plus si besoin dans le cas du Tween pour évacuer toute la mousse).

3 Préparation de la lecture des Zymplates : Zymocube et Zymosoft



Veillez à éteindre la centrifugeuse avant la mesure au Zymocube si ces deux équipements sont placés côte à côte. Les vibrations produites par la centrifugeuse peuvent en effet perturber la bonne acquisition des résultats.

Les différentes étapes de l'utilisation du logiciel Zymosoft sont décrites ci-dessous.

Mettre sous tension le Zymocube puis attendre une vingtaine de secondes avant de lancer le logiciel « ZymoSoft.exe ». Si le logiciel est lancé trop rapidement après l'allumage de l'appareil, les connexions avec le PC n'ont pas le temps de se faire et une fenêtre affiche un message d'erreur. Dans ce cas, fermer la fenêtre et l'interface, attendre quelques secondes et relancer le logiciel. Lorsque le logiciel s'ouvre correctement, on accède alors à la page d'accueil (**Figure 1**).

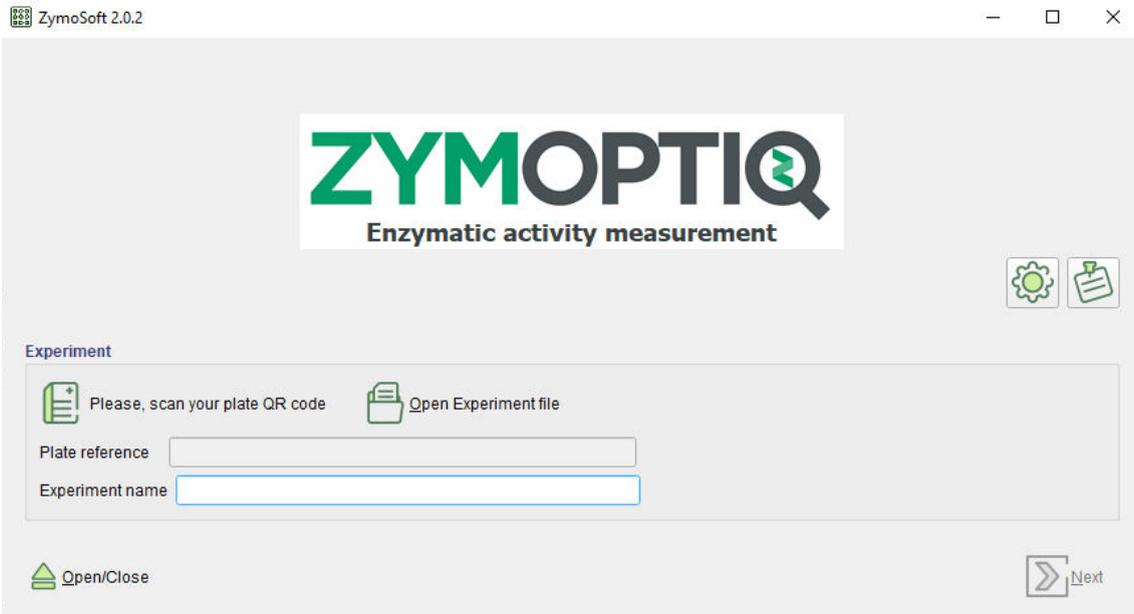


Figure 1 Page d'accueil à l'ouverture du Zymosoft.

3.1 Renseignements plaque et expérience

Dans un premier temps, à l'aide du scanneur, scanner le QR code de la plaque qui va être lue par le Zymocube, en vérifiant bien que le curseur soit actif dans la barre de texte « Experiment name » (**Figure 1**). Après un signal sonore, le nom de la plaque s'affiche dans la barre du haut et les informations propres à la plaque sont enregistrées pour le traitement.

Renseigner le nom de l'expérience à la main dans la barre de texte « Experiment name ». Ce nom entrera dans la composition du nom du dossier contenant les résultats de cette plaque, ainsi que la référence de la plaque contenue dans le QR code.

Remarque : Les caractères suivants ne peuvent figurer dans le nom d'expérience : [] \ / : * ? " < > |, auquel cas, un message d'erreur s'affichera.

Après avoir renseigné ces champs, la Zymplate peut être insérée dans le Zymocube. Cliquer sur le bouton « Open/Close ». Le tiroir du Zymocube s'ouvre.



Bien vérifier avant d'ouvrir le tiroir que rien ne s'oppose à sa course !

3.2 Insertion de la plaque dans le Zymocube

Positionner la plaque sur le tiroir comme indiqué **Figure 2** : la plaque doit être en butée contre le coin inférieur droit. Le puits A1 doit être dans le coin supérieur gauche et les puits vers le haut.

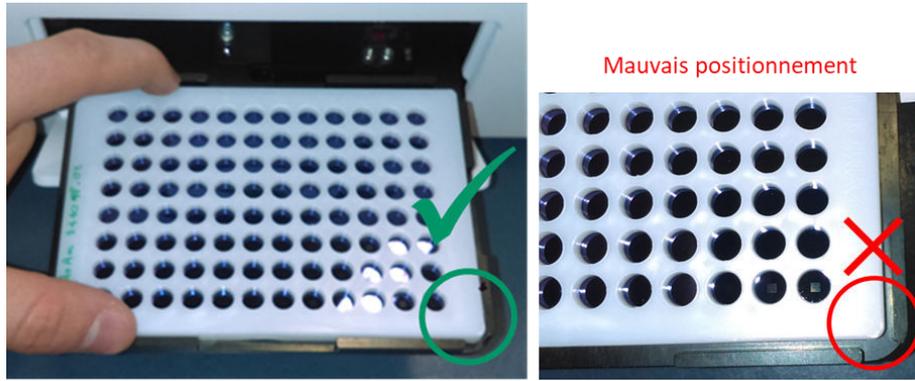


Figure 2 Positionnement de la Zymplate dans le tiroir



Il est impératif que la plaque soit bien positionnée à plat dans le tiroir avant la fermeture. Un mauvais positionnement de la plaque peut entraîner des problèmes d'acquisition, voire des dommages matériels à l'intérieur du Zymocube.



Risque de pincement à la fermeture du tiroir. Ne pas garder le clapet ouvert pendant l'opération et retirer tout outil ou doigt du chariot.

Cliquer à nouveau sur le bouton « Open/Close » afin que le tiroir se referme. Cliquer ensuite sur « Next ».

4 Déclaration du plan de plaque et acquisition

Après avoir cliqué sur « Next », la page de déclaration du plan de plaque s'affiche dans le logiciel (**Figure 3**). Il faut à présent entrer dans le logiciel les informations sur le contenu des puits de la Zymplate. Cela peut se faire soit en créant le plan de plaque via l'interface d'édition « Edit experimental data », soit en utilisant un modèle de plan de plaque pré-enregistré, via « Select template », ou un plan de plaque créé au préalable (enregistré au format Excel ou CSV) via « Import experimental data ».

Figure 3 Page de déclaration du plan de plaque

4.1 Déclaration du plan de plaque via « Edit experimental data »

En cliquant sur le bouton « Edit experimental data », la page d'éditeur de plan de plaque s'ouvre sur un plan de plaque intégralement vide (**Figure 4**). Cet éditeur va permettre de déclarer la nature des échantillons déposés dans les puits de la Zymplate, leur nom, activité, facteur de dilution, ... Ces informations seront ensuite utilisées par le logiciel pour le traitement automatisé des données.

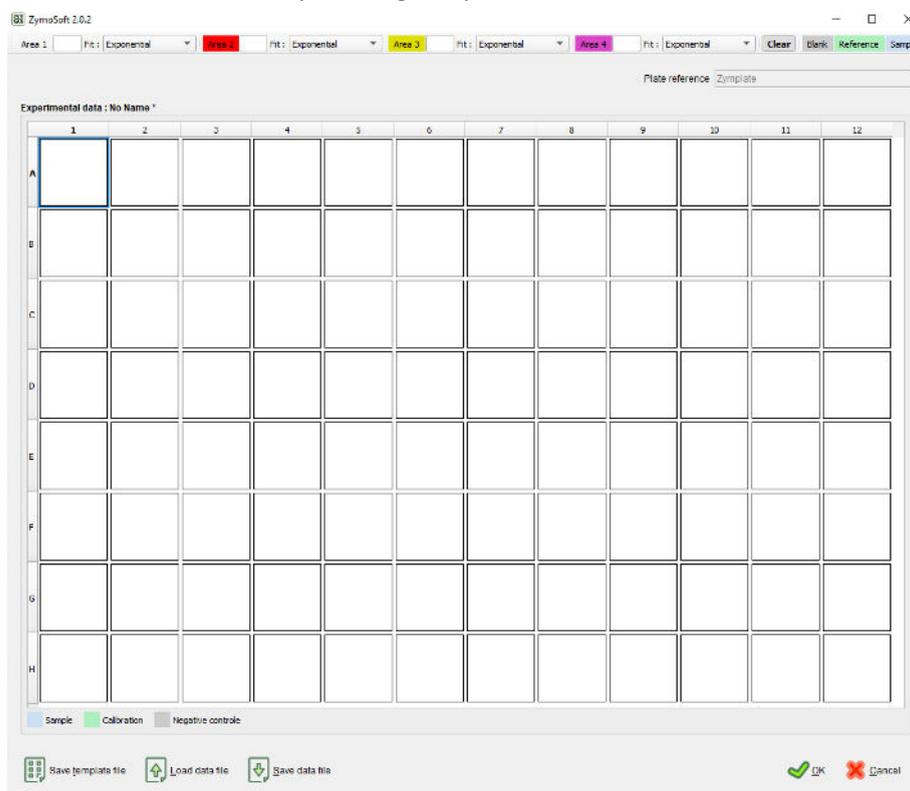


Figure 4 Editeur de plan de plaque : création à partir d'un plan de plaque vide

En premier lieu, il faut définir la nature des puits selon la nomenclature présentée dans la section « Echantillons ». Pour cela, sélectionner un ou plusieurs puits (un puits sélectionné apparaît avec un contour bleu) puis cliquer sur l'un des trois boutons en haut à droite de l'écran : « Blank » / « Reference » / « Sample ». Une fois la nature du puits attribuée, l'arrière-plan des puits apparaît coloré (selon le code couleur présent dans l'interface) et des champs d'information, différents selon le type choisi, apparaissent.

4.1.1 Puits de type « Blank »

Pour les puits de contrôles négatifs un seul champ est à renseigner : le nom. Tous les puits de ce type appartenant à une même zone (voir « Définition de zones ») doivent porter le même nom.

4.1.2 Puits de type « Reference »

Pour les puits de la gamme de référence, deux champs sont présents : l'un pour le nom, l'autre pour l'activité enzymatique de la solution déposée dans le puits. Quel que soit le nom utilisé, les puits d'une même zone possédant la même activité seront considérés comme des réplicas lors du traitement logiciel.

4.1.3 Puits de type « Sample »

Pour les puits contenant des échantillons, un champ nom est présent et deux modes de déclaration du niveau de dilution sont possibles. Si la case « Massic » est vide, seul le champ « d= » est présent et doit être rempli avec le facteur de dilution total appliqué à l'échantillon. Si la case « Massic » est cochée, deux champs supplémentaires apparaissent : « V= » et « m= ». Ces deux champs servent à indiquer la masse d'échantillon pesée (en grammes) et son volume de resuspension ou solubilisation

(en millilitres). Si ces informations sont renseignées, le champ « d= » doit correspondre à la dilution appliquée aux échantillons après cette étape de solubilisation ou resuspension.

4.1.4 Définition de zones

Il est possible de définir jusqu'à quatre zones sur une même plaque. Leur traitement sera réalisé de façon indépendante par le logiciel suite à l'acquisition de la plaque.

Pour assigner une zone à un puits il faut au préalable avoir défini son type, la méthode est ensuite similaire à celle décrite pour la sélection du type des puits et se fait en cliquant sur les boutons « Area ». Le contour du puits se colore alors en fonction de la zone dans laquelle il a été défini : sans couleur pour la zone 1, rouge pour la zone 2, jaune pour la zone 3 et rose pour la zone 4.

Chaque zone doit contenir au moins une position de type « Blank ». Pour chacune des zones utilisées, il faut définir un nom dans le champ à droite du bouton « Area » et il est également possible de choisir le type d'équation qui sera utilisé pour la modélisation des points de gamme. Les équations disponibles sont : exponentielle, linéaire et logistique (à 2, 3 ou 4 paramètres).

Remarques : Par défaut, tous les puits sont attribués à la zone 1.

Les puits appartenant à une même zone ne doivent pas obligatoirement être contigus.

Il est possible d'avoir des puits non déclarés. L'acquisition et le traitement des résultats ne se fera alors que pour les puits déclarés.

La suppression de toutes les informations d'un puits (nature, nom, activité/concentration, zone) peut se faire soit via le bouton « Clear » situé à gauche des boutons de définition du type de puits, soit en utilisant la touche « Suppr » du clavier.

4.1.5 Raccourcis clavier

La plupart des raccourcis claviers usuels fonctionnent dans l'éditeur de plan de plaque :

- Sélection multiple : Ctrl+Click ou en faisant glisser la souris
- Sélections de zones (rectangulaires) via un Shift+Click
- Les copier-coller fonctionnent de façon classique via les raccourcis clavier Ctrl+C et Ctrl+V

Une fonctionnalité supplémentaire avec mémorisation de l'ordre de sélection des puits a été ajoutée. Il est ainsi possible de faire une sélection multiple dans un ordre précis via Ctrl+Click, de la copier avec un Ctrl+C, puis de sélectionner via Ctrl+Click les puits dans lesquels coller les données des puits copiées dans un ordre défini.

4.2 Enregistrement du plan de plaque

Le plan de plaque est associé à la lecture de la plaque et sera par défaut enregistré dans le fichier généré en fin de lecture et d'analyse. Il est également possible de le sauvegarder de façon indépendante via les boutons « Save template file » et « Save data file ».

L'utilisation de « Save template file » permet d'enregistrer une partie des informations du plan de plaque créé : en effet avec ce mode d'enregistrement seuls les types des puits et les informations de zones seront conservées. L'enregistrement sous ce format rend le modèle directement accessible dans l'interface logicielle.

L'utilisation de « Save data file » permet l'enregistrement de l'intégralité des données du plan de plaque (zone, type de puits, nom,...) sous forme d'un export Excel ou CSV. L'enregistrement sous ce format se fait à un emplacement libre sur votre ordinateur. Cet enregistrement se fait dans un fichier indépendant de l'analyse en cours : une modification du plan de plaque dans le Zymosoft n'entraînera

pas de modification du fichier exporté, et inversement. Le fichier généré sera utilisable et éditable ultérieurement avec le Zymosoft.

4.3 Déclaration du plan de plaque via « Select template »

En cliquant sur le bouton « Select template », un menu déroulant vous permet d'accéder aux plans de plaques précédemment enregistrés en tant que modèles. Une fois le modèle sélectionné, il s'ouvre dans l'éditeur de plan de plaque. Il contient les informations de type de puits, zones, nom de zone et modèle de régression utilisé pour les gammes. Ce plan doit ensuite être complété avec les informations requises selon la procédure décrite dans la section « Déclaration du plan de plaque via « Edit experimental data » ». A ce stade le plan de plaque est intégralement éditable.

4.4 Déclaration du plan de plaque via « Import experimental data »

En cliquant sur le bouton « Import experimental data », une fenêtre de navigation s'ouvre pour vous permettre de sélectionner sur votre ordinateur le fichier Excel ou CSV que vous souhaitez utiliser comme plan de plaque. Ce fichier peut soit provenir d'une sauvegarde antérieure d'un plan de plaque, soit être un fichier créé manuellement. Ce type de fichier contient, sous un format tableur (**Figure 5**), les mêmes informations que celle précédemment décrites dans la section « Déclaration du plan de plaque via « Edit experimental data » ».

Zone 1	Exponential							
Zone 2	Exponential							
Zone 3	Exponential							
Zone 4	Exponential							
well	zone	type	name	product form	volume (mL)	mass (g)	dilution factor	activity (U/mL)
A1								
A2								
A3								
...								
H12								

Figure 5 Plan de plaque au format tableur

Les quatre premières lignes correspondent à la définition des zones. La première colonne contient le nom de la zone (si la case est vide, la zone n'est pas déclarée), la seconde colonne correspond au modèle de régression (si la zone n'est pas définie cette case peut être vide ; par défaut le Zymosoft les assignes à « Exponential »).

La suite du tableau contient ensuite les informations de chaque puits, selon la même logique que celle décrite dans la section « Déclaration du plan de plaque via « Edit experimental data » ».

- Well : emplacement du puits
- Zone : numéro de la zone à laquelle appartient le puits – chiffre de 1 à 4.
- Type : type du puits. Les trois types définis sont : « calibration », « negative control » et « sample ». Ces types de puits sont paramétrés dans le logiciel, il est donc impératif de respecter cette nomenclature pour une bonne communication avec le logiciel.
L'utilisation d'un type non défini entrainera la présence de cellules blanches dans le plan de plaque dans l'interface du logiciel et leur exclusion de l'analyse.
- Name : nom libre
- Product form : dans cette colonne deux entrées sont possibles : « solution » ou « powder ». Ce renseignement impacte les informations à fournir dans les colonnes suivantes.

- Volume (mL) : cette colonne est prise en compte uniquement pour les échantillons déclarés en « powder » dans la colonne « product form ». Renseigner alors ici le volume (en millilitres) dans lequel la prise d'essai (extraction ou solubilisation) a été réalisée.
- Mass (g) : cette colonne est prise en compte uniquement pour les échantillons déclarés en « powder » dans la colonne « product form ». Renseigner alors ici la masse (en grammes) utilisée lors de la prise d'essai (extraction ou solubilisation).
- Dilution factor : renseigner dans cette colonne le facteur de dilution qui a été appliqué aux échantillons. Dans le cas d'un échantillon déclaré en « solution », renseigner le facteur de dilution total. Dans le cas d'un échantillon déclaré en « powder », renseigner le facteur de dilution appliqué à l'échantillon après la prise d'essai (la dilution induite par la prise d'essai sera calculée à partir des informations contenues dans les colonnes « volume » et « mass »).
- Activity (U/mL) : cette colonne est à renseigner uniquement pour les points de calibration. Déclarer ici les activités des dilutions de l'enzyme de référence telles que déposées sur la plaque.

Remarques : Les fichiers Excel et CSV de plan de plaque peuvent également être importés via l'éditeur de plan de plaque en cliquant sur le bouton « Load data file ».

En cas de création d'un plan de plaque via le Zymosoft, il vous sera proposé un enregistrement du nouveau plan de plaque créé au format Excel ou CSV. En cas de refus, le plan de plaque n'aura pas de nom attribué et le champ « Experimental data » présentera « no name ». Les données du plan de plaque sont cependant conservées par le Zymosoft.*

En cas de modification du contenu d'un plan de plaque via le Zymosoft, il vous sera proposé un enregistrement du nouveau plan de plaque créé au format Excel ou CSV. En cas de refus, une étoile figurera à côté du nom du plan de plaque d'origine.

4.5 Lancement de l'acquisition

Quel que soit le mode de création/édition du plan de plaque qui a été choisi, après vérification des données dans l'interface du Zymosoft, cliquer sur le bouton « Ok ». Le logiciel vérifie que le plan de plaque respecte les conditions suivantes :

- Tous les puits dont le type est déclaré sont nommés et leurs champs renseignés.
- Chaque zone comportant au moins un puits déclaré est nommée.
- Chaque zone déclarée contient au moins un puits de type « Blank »
- Tous les puits de type « Blank » au sein d'une zone portent le même nom

Si l'une de ces conditions n'est pas respectée, un message d'erreur indique le défaut et l'utilisateur peut le corriger puis valider à nouveau.

La page présentée **Figure 3** s'affiche alors à nouveau et le bouton « Launch readout » est désormais actif (icône verte). Cliquer sur ce bouton pour lancer l'acquisition de la plaque. On entend alors l'acquisition commencer. Pendant toute la durée de l'acquisition, ne pas toucher, choquer ou faire subir des vibrations au Zymocube, cela pourrait fortement endommager le matériel.

Après quelques minutes, les barres de progression de l'acquisition et du traitement des données progressent simultanément. Lorsque l'acquisition est terminée (barres de chargement à 100%), les résultats s'affichent directement dans l'interface.

Le traitement des résultats peut être fait immédiatement dans l'interface du logiciel. Ce traitement peut aussi être effectué dans un second temps en réouvrant le fichier « .zym » dans le Zymosoft. Ce fichier est généré automatiquement lorsque l'utilisateur clique sur le bouton « End ».

Cliquer sur « End » permet de revenir à l'interface de départ pour lancer l'acquisition d'une nouvelle plaque. Cliquer sur « Open/Close » pour ouvrir le tiroir et récupérer la plaque.

Remarque : Dans le cas où une seconde imagerie de la même plaque est envisagée, la plaque doit être conservée dans son emballage.



Si plusieurs acquisitions s'enchaînent, il est impératif d'ouvrir le tiroir entre chaque acquisition, de s'assurer du positionnement de la Zymplate et de le refermer avant de lancer une nouvelle acquisition. Cette procédure est à suivre même s'il s'agit de la même Zymplate acquise plusieurs fois. Cela permet au Zymocube de refaire sa calibration et de garantir des résultats de bonne qualité.

5 Analyse des résultats

Les résultats d'analyses sont consultables de façon interactive dès la fin de l'acquisition. Il est aussi possible de reprendre l'analyse d'une plaque déjà acquise depuis la page d'accueil du logiciel en cliquant sur le bouton « Open Experiment file » puis en cliquant sur le fichier « .zym » correspondant aux données à traiter.

5.1 Généralités

L'interface de traitement des résultats se présente comme présenté **Figure 6**. Chaque zone déclarée sur la plaque est traitée de façon indépendante. L'accès à ces différents « onglets » de zone se fait en cliquant sur les boutons « Area » présent en haut à gauche de la fenêtre. Qu'une ou plusieurs zones soient déclarées, l'organisation au sein d'un onglet est identique et sera donc présentée une seule fois. En cas de multiples zones, la procédure décrite ici est à effectuer une fois par zone.

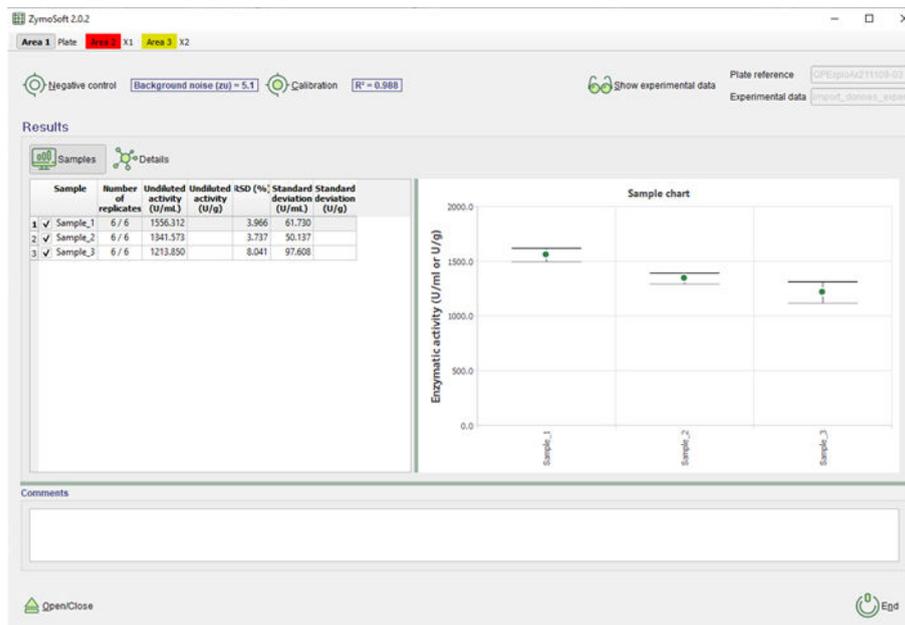


Figure 6 Interface de traitement des résultats

5.1.1 Ordre conseillé de vérification

Plusieurs étapes de vérifications sont recommandées afin de garantir la qualité des résultats : vérification des contrôles négatifs (« negative controls »), de l'allure de la gamme (« calibration curve ») puis des échantillons (« samples »). Toute modification de traitement des contrôles négatifs affecte le calcul de la limite de détection (« Background noise ») et donc les points de gammes et les échantillons et toute modification de traitement des points de gamme affecte sa modélisation et donc les valeurs d'activité des échantillons.

5.1.2 Exclusions

Pour chacun des points de mesure, quel que soit son type, une colonne « Trouble readout » indique à l'aide d'un voyant coloré si l'acquisition de cette position de la plaque s'est bien passée (vert) ou non (rouge). Si le voyant est rouge, le puits est automatiquement exclu. Pour chacun des puits (dans l'onglet « Details » pour les échantillons), la colonne exclusion présente des cases à cocher pour exclure les points manuellement si besoin. La cellule adjacente permet de commenter les exclusions manuelles. Des exclusions automatiques peuvent aussi être faites par le traitement automatique, le motif est alors mentionné dans la colonne « Exclusion comment ». Certaines de ces exclusions peuvent être annulées par l'utilisateur, le puits concerné est alors réinclus dans le traitement mais le commentaire d'exclusion automatique subsiste.

5.1.3 Unités

Les résultats des contrôles négatifs et des gammes sont présentés en Zymunits (ZU), ceux des échantillons en Zymunits et, si une gamme a été incluse, dans votre système d'unités en U/mL ou U/g. Dans le cas où aucune gamme n'est présente, le logiciel affiche un message d'erreur, et seuls les résultats en Zymunits sont présentés.

5.1.4 Classement des données des tableaux

Tous les en-têtes de colonnes de l'interface de résultats du Zymosoft permettent en cliquant dessus d'ordonner les données par ordre alphabétique ou valeur numérique. Lorsque ceci est fait dans l'interface des échantillons agrégés, en cliquant sur « Sample », cela modifie également l'ordre d'affichage des échantillons dans l'interface graphique (**Figure 6**).

5.1.5 Graphiques

Dans toutes les interfaces graphiques de la partie résultats du Zymosoft il est possible de zoomer/dézoomer sur l'axe X en utilisant la molette de la souris, et de zoomer/dézoomer sur l'axe Y en utilisant Shift+molette. Il est également possible de déplacer la zone visualisée en maintenant le click gauche de la souris enfoncé. Un double clic permet de revenir à la configuration initiale. En utilisant le clic droit de la souris, il est possible de copier ou d'enregistrer (au format PNG) la vue courante d'un graphique.

5.1.6 Plan de plaque

Depuis la page d'accueil de l'interface de résultats, il est également possible de visualiser le plan de plaque qui a été déclaré et les informations qu'il contient. Pour cela, cliquer en haut à droite de la fenêtre sur le bouton « Show experimental data » (**Figure 6**). Le plan de plaque s'affiche alors au format de l'éditeur de plan de plaque. Toutes les données et valeurs qu'il contient, et qui ont été utilisées pour le traitement des données, peuvent être visualisées. La modification du plan de plaque n'est pas autorisée après l'acquisition des données de la plaque (sauf si le mode avancé a été activé avant de lancer l'acquisition – voir section « Utilisation du Zymosoft en mode avancé »).

5.2 Vérification des contrôles négatifs

Les valeurs en Zymunits des positions de contrôle négatif sont accessibles en cliquant sur l'icône « Negative control » situé en haut à gauche de la fenêtre. L'exclusion ou la ré-inclusion de points entraîne un recalcul du bruit de mesure (« Background noise »). Le graphique affiché à droite présente les points de gamme et leur modélisation. Lorsqu'une modification est apportée, elle doit être validée en cliquant sur le bouton « Ok », qui permet de sortir de cette vue. En l'absence de modifications, ou si l'on ne souhaite pas conserver les modifications apportées, le bouton « Cancel » permet de sortir de cette vue sans modifications.

5.3 Vérification de la gamme de calibration

En cliquant sur l'icône « Calibration » on affiche la page résumant les informations des points de gamme (**Figure 7**). Le tableau de gauche affiche les résultats de chaque puits. Le graphique de droite affiche les moyennes et écarts-types des points de gammes de même concentration, ainsi que la modélisation obtenue. L'équation utilisée pour la modélisation, la valeur des paramètres variables ainsi que le coefficient de détermination, R^2 , sont également présentés. En fin de traitement, cliquer sur « Ok » ou « Cancel » pour revenir à l'affichage des échantillons.

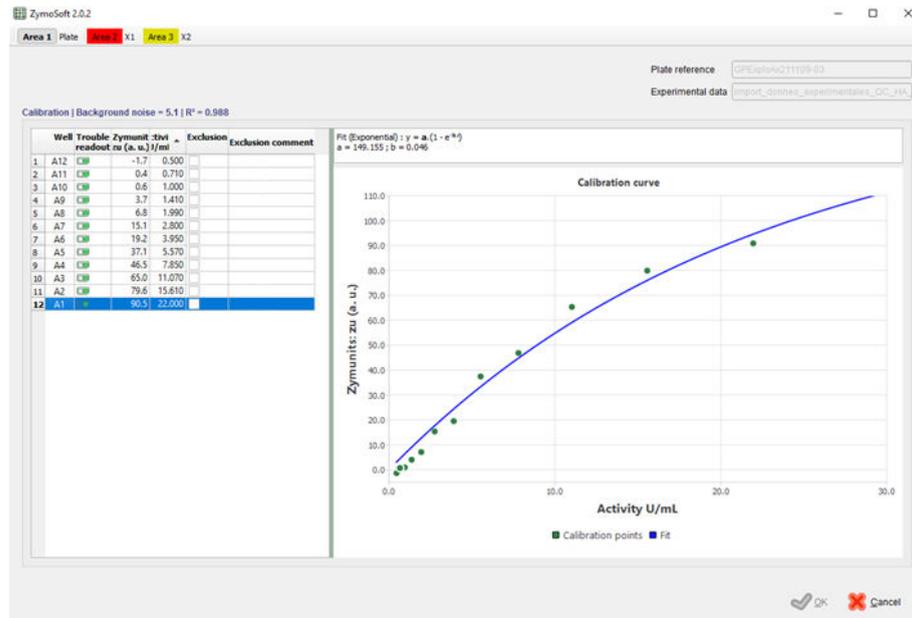


Figure 7 Interface de traitement de gamme

5.4 Vérification des échantillons

La vue d'accueil des échantillons présente les résultats des échantillons agrégés par noms identiques. Pour chaque groupe d'échantillons, le nombre de points conservés, la valeur d'activité initiale obtenue, son écart-type et son coefficient de variation (Relative Standard Deviation – RSD) sont présentés dans le tableau. Dans ce tableau, des cases à cocher permettent de sélectionner les échantillons à afficher dans le graphique. La sélection des échantillons et leur ordre dans ce tableau affecte la visualisation des échantillons sous forme de graphique présentée dans la partie droite de la fenêtre.

En cliquant sur le bouton « Details », on accède dans la partie gauche de la fenêtre aux résultats individuels de chacun des puits. Ce tableau présente les résultats en Zymunits, en activité diluée et en activité initiale obtenue. Il permet également de visualiser d'éventuelles exclusions automatiques ou d'en réaliser de façon manuelle.

5.5 Fin de traitement des données et enregistrement

Lorsque le traitement des données est satisfaisant, cliquer sur « End ». Les résultats sont automatiquement sauvegardés et exportés. Un fichier au format « .zym », qui peut être lu par le Zymosoft et contient toutes les données de plan de plaque et d'analyse est généré ainsi qu'un dossier contenant divers fichiers Excel et images en PNG.

5.6 Fichiers exportés automatiquement par le Zymosoft

5.6.1 Fichier d'analyse au format « .zym »

Ce fichier, lisible par le logiciel Zymosoft, contient toutes les données acquises et les traitements qui leur ont été appliqués. Il peut être rouvert dans le logiciel Zymosoft (via le bouton « Open experiment

file » de l'accueil) pour permettre une analyse des données séparée de leur acquisition ou pour vous permettre de générer de nouveaux visuels.

En cas de modification du traitement des données : modification des puits exclus, le fait de cliquer sur « End » enregistrera le nouveau traitement de données. Ce nouveau traitement écrasera les précédents fichiers enregistrés.

5.6.2 Dossier associé à l'expérience

Dans le dossier associé au même nom d'expérience et référence de plaque que le fichier « .zym », vous trouverez un fichier « WellResults » au format CSV et Excel qui contient les données brutes en Zymunits des puits de la plaque, les informations de modélisation de la gamme ainsi que les résultats en activité (U/mL ou U/g) des échantillons. Dans le cas où aucune gamme n'a été utilisée, ou si le modèle de régression n'a pas permis de convergence sur les données des points de gamme, un fichier « WellZymUnitResults » au format CSV et Excel est généré. Ce fichier contient les valeurs mesurées en Zymunits de chaque puits. Si le plan de plaque utilisé comporte plusieurs zones, les résultats de chacune des zones sont contenus dans les différents onglets du fichier Excel généré.

Des fichiers image, au format PNG, sont également automatiquement enregistrés. Pour chaque zone du plan de plaque déclarée, un fichier « Calibration_curve » et un fichier « Sample_chart » sont générés. Ils contiennent respectivement les représentations graphiques visibles dans le Zymosoft des points de gammes et des divers échantillons.

6 Utilisation du Zymosoft en mode avancé

Sur la page d'accueil du logiciel Zymosoft (**Figure 1**), une icône en forme de roue permet d'activer le mode avancé par la saisie d'un mot de passe (**Figure 8**). Par rapport au mode de fonctionnement du logiciel décrit précédemment dans ce mode d'emploi, l'activation du mode avancé permet la modification du plan de plaque après l'acquisition des données.

Remarques : Le mode avancé doit être activé avant l'acquisition de la plaque.

Lors de la réouverture d'un fichier « .zym » dans le Zymosoft, il faut également activer le mode avancé avant d'ouvrir le fichier « .zym » pour avoir accès aux modifications de plan de plaque.

Pour modifier le plan de plaque, dans l'interface d'analyse des données, cliquer en haut à droite de la fenêtre sur le bouton « Edit experimental data » (qui remplace le bouton « Show experimental data » présent lorsque le mode avancé n'est pas activé). Le logiciel affiche alors le plan de plaque dans l'éditeur de plan de plaque et tous les puits sont éditables : zone, type de puits et contenu des champs.

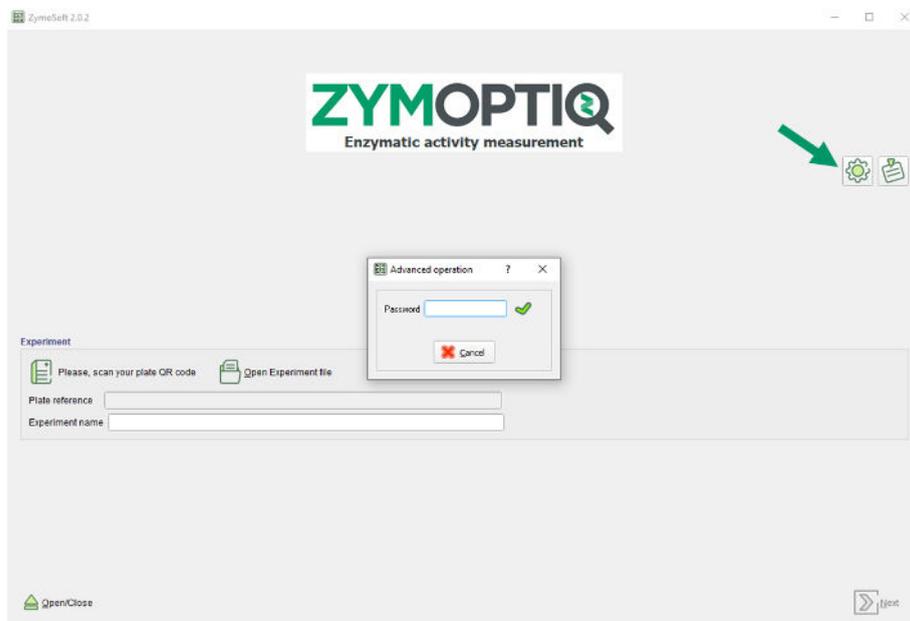


Figure 8 Activation du mode avancé

7 Exclusions automatiques

Certaines positions peuvent être automatiquement exclues lors de traitement par le logiciel. Les raisons et commentaires associés sont présentés dans les paragraphes suivants selon la nature des puits concernée.

7.1 Contrôles négatifs

Des bornes de valeurs brutes en ZU sont définies pour les contrôles négatifs de chaque type de capteur. Une position « blank » qui ne satisfait pas les critères définis sera exclue.

Si plus d'un tiers des positions de contrôle ne satisfait pas ces critères, alors l'analyse ne se fait pas et un message d'erreur vous invitant à sécher plus longtemps la plaque s'affiche dans l'interface du logiciel. Après avoir vérifié le séchage de votre plaque (ou la bonne déclaration dans le plan de plaque des positions « Blank »), relancez l'acquisition.

7.2 Points de gamme

Les points de gammes doivent avoir des valeurs comprises entre 2.5 et 90 ZU. Les points qui ne satisfont pas ce critère sont automatiquement exclus, et le texte « Not valid » est inscrit dans la colonne « Exclusion comment ».

En cas de présence de répliques de points de gamme, l'exclusion d'un point à une activité donnée, entraîne automatiquement l'exclusion des autres points pour lesquels une activité identique a été déclarée. Le commentaire « Not valid » s'affiche.

En cas de problème de lecture du puits (voyant rouge dans la colonne « Trouble readout », le puits concerné est exclu, aucune Zymunit n'est affichée. Le commentaire « Not valid » apparait et est grisé ce qui signifie qu'il ne peut pas être manuellement réinclus par l'utilisateur lors de l'analyse.

7.3 Echantillons

Les valeurs en Zymunits des échantillons doivent être incluses dans la zone couverte par la gamme. Afin de prendre en compte les cas où les bornes haute et basse de la gamme sont des valeurs moyennées, les limites ont été fixées à 0.8 x borne basse et 1.2 x borne haute. Les échantillons qui ne satisfont pas à ce critère sont automatiquement exclus, leur valeur en Zymunit est affichée mais leur

activité n'est pas calculée. Lorsque les Zymunits détectées sont en dessous de la borne basse, le commentaire « Too diluted » est affiché, à l'inverse lorsque les Zymunits détectées sont trop élevées, mais en dessous de 90 ZU, le commentaire « No activity value » est affiché.

Lorsque les Zymunits détectées pour un échantillon excèdent les 90 ZU, le point est automatiquement exclu et le commentaire « Too concentrated » est affiché.

Lorsque les Zymunits détectées pour un puits sont inférieures au bruit de mesure « Background noise », le point est automatiquement exclu et le commentaire « Not valid » est affiché.

En cas de problème de lecture du puits (voyant rouge dans la colonne « Trouble readout », le puits concerné est exclu, aucune Zymunit n'est affichée. Le commentaire « No activity value » apparaît et est grisé ce qui signifie qu'il ne peut pas être manuellement réinclus par l'utilisateur lors de l'analyse.

Dans le cas où aucun point de gamme n'a été inclus ou déclaré dans le plan de plaque, tous les points d'échantillon apparaissent comme exclus. Leur Zymunits sont cependant visibles dans l'onglet « Details ». En dehors des motifs listés ci-dessus, les points exclus à cause de l'absence de gamme de référence sont signalés avec le commentaire « No reference ».

8 Troubleshooting

8.1 Cas d'erreur

Description	Solution
Le logiciel refuse de démarrer ou le Zymocube ne répond pas.	Le logiciel nécessite un accès non surchargé à la bande passante du PC d'acquisition (possible saturation si logiciel lancé deux fois ou si tâches de fond en cours). Finir les tâches en cours et redémarrer l'écosystème selon l'ordre suggéré.
Le câble USB a été débranché en cours d'utilisation.	Le Zymocube se fige. Rebrancher le câble, redémarrer l'environnement dans l'ordre et relancer l'acquisition.
L'ordinateur s'est éteint pendant l'acquisition.	Le Zymocube se fige. Redémarrer l'environnement et relancer l'acquisition.
Les données acquises ne correspondent pas à l'expérience analysée.	Vérifier la cohérence du QR code de la Zymplate scannée et du plan de plaque soumis au logiciel puis relancer l'acquisition.

8.2 Messages d'erreur

Contexte	Message d'erreur	Explication/Solution
Lancement du logiciel	« The Zymocube controller has been interrupted !? »	Le Zymocube n'est pas allumé ou n'a pas eu le temps de se connecter au PC avant le lancement du logiciel
Mode avancé	« The Password Is Incorrect! »	Le mot de passe est incorrect
Scan de l'étiquette	« The V2.0 QR code format is not valid ! »	Le QR code de l'étiquette n'est pas au bon format
	« The volume count ... in the QR code format is not valid ! »	Le QR code de l'étiquette n'est pas au bon format
	« The QR code format is not valid ! »	Le QR code de l'étiquette n'est pas au bon format
	« The QR code version is not valid ! »	Le QR code de l'étiquette n'est pas au bon format

Import du plan de plaque	« The row and/or column count is not valid ! »	Le nombre de ligne et/ou de colonne n'est pas valide ! Modifier le fichier Excel ou CSV
	« Unable to read the values ! »	Impossible de lire les valeurs ! Modifier le fichier Excel ou CSV
Editeur de plan de plaque	« the area ... is not defined ! »	La zone ... n'est pas définie
	« The volume value is not valid ! »	La valeur de volume n'est pas valide
	« The mass value is not valid ! »	La valeur de la masse n'est pas valide
	« The dilution value is not valid ! »	La valeur de dilution n'est pas valide
	« The activity value is not valid ! »	La valeur d'activité n'est pas valide
	« The area index ... is not valid ! »	La valeur de l'indice d'une zone n'est pas valide
	« Unable to write the template file ! »	Le modèle de plan de plaque ne s'est pas enregistré
	« The name of well at the position ... is not defined. »	Le puits ... n'a pas de nom défini
	« The dilution factor at the position ... must be greater than 0.0. »	Le puits échantillon doit avoir un facteur de dilution supérieur à 0.0
	« The volume at the position ... must be greater than 0.0. »	Le volume défini pour le puits ... doit être supérieur à 0.0
	« The mass at the position ... must be greater than 0.0. »	La masse définie au puits ... doit être supérieure à 0.0
	« The sample ... can not be massic and liquid ! »	Un échantillon ne peut être défini en liquide et en massique
	« The area ... does not contains blank well. »	La zone ... ne contient aucun puits de contrôle négatif
	« The blanks in the area ... should have the same name. »	Tous les puits de contrôle négatif au sein de la zone ... doivent porter le même nom
	« The activity at the position ... must be greater than 0.0. »	Le puits de gamme ... doit avoir une activité déclarée supérieure à 0.0
	« The name of area ... is not defined.»	Le nom de la zone ... n'est pas définie
	« The name of the template is not defined ! »	Le nom du modèle n'est pas défini
« The experience name contains invalid characters ([] \ / : * ? " < >) ! »	Le nom d'expérience ne peut contenir les caractères suivants : [] \ / : * ? " < >	
Lancement de l'acquisition	« Unable to launch the controller process : ... ! »	Redémarrer le PC et le Zymocube
	« Unable to launch the controller process (no temp. directory) ! »	Mauvaise installation du logiciel
	« Unable to launch the controller process (no config .ini file) ! »	Mauvaise installation du logiciel

	« The Interf parameters file ... do not exist ! »	Mauvaise installation du logiciel
	« The Interf parameters file is not defined for the plate ... ! »	Mauvaise installation du logiciel
	« Unexpected controller error ... »	Problème machine
	« Unable to create the data directory ! »	Mauvaise installation du logiciel
	« Unable to build the experiment file ! »	Mauvaise installation du logiciel
Ouverture « .zym »	« The file does not contain a valid Zymocube experiment ! »	Le fichier .zym n'est pas au bon format
Affichage des résultats	« Trouble readout »	La lecture du puits a rencontré un problème. Rincer, sécher à nouveau et réimager
	« Unable to exploit the area »	Les contrôles négatifs d'une zone ne permettent pas d'exploiter les résultats des puits
	« the blank wells are not valid ! »	Les puits de contrôle négatif ne sont pas valides
	« the reference wells are not valid ! »	Les puits de gamme ne sont pas valides
Validation des résultats	« Please check write permissions »	Vérifier qu'aucun fichier Excel ou CSV pouvant interférer avec l'analyse en cours ne soit ouvert