

C.H.U. de Clermont-Ferrand
Direction du Laboratoire
58 rue Montalembert
63000 Clermont-Ferrand

**CAHIER DES CLAUSES TECHNIQUES
PARTICULIERES**

C.C.T.P. N°24-GHTA-0151 du 10/12/2024

Établi en application du Code de la commande publique relatif à :

Prestation d'étude pangénomique de la méthylation de l'ADN de 642 échantillons d'ADN humains à l'aide de puces Infinium Methylation EPIC V2 (Illumina) le service d'Hématologie Biologique - C.H.U. de Clermont-Ferrand

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
Article 1 - Objet du marché	3
a) Objet du marché	3
b) Allotissement.....	3
Article 2 : Définition du besoin	3
a) Détail de l'activité.....	3
b) Contenu des offres du fournisseur	4
c) réalisation d'une prestation d'étude de la méthylation de l'ADN d'échantillons d'ADN humains à l'aide de puces EPIC V2	6
Article 3 : LIVRAISON	6
i. Commande	6
ii. Délai de livraison des résultats.....	6
Article 4 : PUBLICATION des résultats	7
Article 5 : EVOLUTION DES PRODUITS ET SYSTEMES EN COURS DE MARCHE.....	7
Article 6 : HYGIENE, SECURITE et ASSURANCE	7
a) Hygiène sécurité :.....	7
b) Assurance :	8
Article 7 : RAPPEL DES PRESTATIONS	8
Article 8 : INTERLOCUTEURS.....	8

Article 1 - Objet du marché

a) Objet du marché

Le présent marché a pour objet la réalisation d'une prestation d'étude pangénomique de la méthylation de l'ADN de 642 échantillons d'ADN humains à l'aide de puces Infinium Methylation EPIC V2 (Illumina), comprenant :

- La conversion des ADN au bisulfite,
- La réalisation des puces EPIC V2,
- L'interprétation personnalisée des données comprenant l'intégration des caractéristiques clinico-biologiques des patients

Equipe demandeuse :

Service Hématologie Biologique - CHU CLERMONT-FERRAND - Equipe EA 7453 Chelter – site Estaing,

Service d'Hématologie Biologique

1 place Lucie et Raymond Aubrac - 63003 Clermont-Ferrand Cedex

b) Allotissement

Le marché est composé de 1 lot, comprenant une offre de base et une variante.

Lot(s)	Désignation
1	Réalisation d'une prestation d'étude de la méthylation de l'ADN de 642 échantillons d'ADN humains à l'aide de puces Illumina EPIC V2 <u>Offre de base</u> : puces EPIC fournies par le service d'Hématologie Biologique <u>Variante</u> : puces EPIC fournies par le prestataire.

Article 2 : Définition du besoin

a) Détail de l'activité

Le vieillissement peut être défini comme l'ensemble des mécanismes qui, au cours de la vie d'un individu, altèrent progressivement l'équilibre physiologique et conduisent finalement à la mort. Il s'agit d'un processus complexe et progressif impliquant de nombreux facteurs biologiques et génétiques, tout en étant influencé par l'environnement de l'individu (pollution, alimentation, tabac...). D'un point de vue médical, le vieillissement individuel est évalué par les gériatres en mesurant la fragilité individuelle (FI). Ce concept de fragilité est complexe et fait appel à différentes échelles permettant de l'évaluer, sans réel consensus. De plus, ces paramètres atteignent leurs limites par un manque de reproductibilité, de standardisation et de sensibilité. Ainsi, des biomarqueurs permettant une évaluation objective de l'âge biologique (AB), font défaut.

Avec le vieillissement de la population générale, de nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes du vieillissement biologique, avec à terme l'objectif d'identifier et d'évaluer les risques de développement de maladies liées à l'âge.

Différentes études ont rapporté un lien entre la méthylation de l'ADN et le vieillissement cellulaire. Plusieurs groupes ont d'abord décrit l'existence d'une hypométhylation globale associée à l'âge, puis des analyses plus précises ont révélé que plusieurs loci, correspondant notamment à des gènes suppresseurs de tumeurs, étaient l'objet d'une hyperméthylation avec l'âge. Ainsi, le niveau de méthylation de différents îlots CpG « cibles » permet de définir un âge épigénétique, témoin du vieillissement biologique partagé par quasiment tous les tissus. Cette horloge de méthylation permet d'évaluer un âge biologique, qui peut différer de l'âge chronologique, notamment en cas de survenue de pathologies telles que les cancers.

L'analyse de la méthylation de l'ADN est considérée aujourd'hui comme la méthode la plus performante pour évaluer l'AB des individus, et différentes horloges basées sur ces analyses ont été décrites, telles que les horloges d'Horvath, de Hannum et DNAmPhenoAge qui combine le profil de méthylation et certains dosages biologiques. Ces horloges de méthylation de l'ADN utilisent majoritairement les données de puce HM450K (Illumina) qui couvre la majorité des îlots CpG cibles. Cependant ces puces ont été remplacées par les puces EPIC BeadChip kit qui ont été validées récemment malgré la perte de certaines cibles (McEwen LM et al., Clin Epigenetics. 2018 Oct 16;10(1):123).

Dans ce contexte, l'équipe du service d'Hématologie Biologique dépose un appel d'offre pour la réalisation d'une prestation d'étude de la méthylation par puces EPIC V2 dans le but d'évaluer l'intérêt d'associer la détermination de l'âge biologique à l'évaluation de la fragilité individuelle réalisée par les gériatres afin de personnaliser la prise en charge des cancers, notamment en terme de tolérance au traitement. Dans un premier temps, le modèle de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) sera utilisé, puisqu'il s'agit du 1^{er} cancer pour lequel une thérapie ciblée a été développée, et que la prise en charge et le suivi de cette hémopathie sont standardisés.

b) Contenu des offres du fournisseur

Les ADN seront extraits par l'équipe d'Hématologie Moléculaire du service d'Hématologie Biologique, dosés et qualifiés avant d'être transmis au prestataire.

Le fournisseur s'engage obligatoirement à :

- Réaliser le traitement des ADN au bisulfite de sodium des échantillons ;
- Réaliser la mesure quantitative de la méthylation des résidus cytosine des sites CpG présents sur la biopuce Infinium Methylation EPIC (Illumina) ;
- Réaliser une analyse bioinformatique complète personnalisée des données, en prenant en compte les caractéristiques clinico-biologiques des patients de la cohorte.

A l'issue du projet, le prestataire doit joindre un rapport d'analyse rédigé, transmis par mail au format .pdf contenant les éléments suivants :

- Le nom et prénom des personnes réalisant la prestation,
- Le nombre d'heures passées sur le projet,
- Le descriptif des problèmes techniques rencontrés, les causes probables et les solutions apportées
- Toute anomalie constatée dans l'utilisation d'un matériel ou son environnement,
- Protocoles techniques utilisés, fiches techniques des réactifs et des adaptations le cas échéant
- Etapes de l'analyse bioinformatique des données, concernant notamment la normalisation, l'élimination des polymorphismes, du bruit de fond, des sondes ayant une faible pvalue ou des valeurs manquantes etc., avec le détail du nombre de sondes éliminées à chaque étape
- La liste des outils bioinformatiques utilisés pour l'analyse des données, ainsi que les versions
- Une analyse descriptive globale des résultats
- Le détail de la définition du différentiel de méthylation
- La comparaison des profils de méthylation avant et après traitement des patients
- La signature du responsable de la société de prestation à la fin du rapport d'intervention

En complément de ce rapport, les données brutes doivent être déposées sur la plateforme EGA (European Genome-phenome Archive), sous la responsabilité du service d'Hématologie Biologique.

Les données filtrées et normalisées devront, quant à elles, être compilées sous forme de deux fichiers .csv construits de la manière suivante :

- Un premier fichier (voir image ci-dessous) comprenant une première ligne avec le nom des échantillons (référencés en colonne) puis une ligne pour chaque sonde avec la B value normalisée de chaque échantillon. Attention, les données chiffrées devront être sous format « . » et non « , ».

	Standard	Standard	Standard
1		GSM2843763	GSM2843764
2	cg00000029	0.4456807	0.4492783
3	cg00000108	0.9277005	0.9290208
4	cg00000109	0.9095168	0.8499462
5	cg00000165	0.1461386	0.1344404

- Un second fichier du même type mais comprenant des précisions génomiques pour chacune des sondes (génom, MAPinfo et coordonnées, chromosome, UCSC refgene name/accession/group/CpGIslands name and relation/regulatory feature groupe).

A la fin du projet, les échantillons restant seront restitués dans un délai de 6 mois maximum.

c) réalisation d'une prestation d'étude de la méthylation de l'ADN d'échantillons d'ADN humains à l'aide de puces EPIC V2

Offre de base : puces EPIC fournies par le service d'Hématologie Biologique

Variante : puces EPIC fournies par le prestataire

Contenu de l'offre attendue :

Réalisation d'une prestation d'étude de la méthylation de l'ADN de 642 échantillons d'ADN humains à l'aide de puces Illumina EPIC V2.

La solution proposée doit permettre de comparer le profil de méthylation de l'ADN des cellules hématopoïétiques avant et après traitement par thérapie ciblée. Les résultats doivent par ailleurs permettre une évaluation de l'âge biologique des individus, réalisée par l'équipe Chelter. Dans ce cadre, les résultats doivent être fournis sous forme de fichier .csv présentant les caractéristiques mentionnées au paragraphe précédent.

Caractéristiques générales :

- Le système doit assurer une traçabilité parfaite de l'ensemble du processus
- L'ensemble doit être conforme aux recommandations du fournisseur concernant l'analyse de méthylation
- L'effet batch doit être évalué et pris en compte lors de l'analyse finale des données

Article 3 : LIVRAISON

i. Commande

Il s'agira d'un marché à bons de commande. A l'issue de la notification du présent marché, les bons de commande seront émis au prestataire retenu selon le calendrier prévu.

ii. Délai de livraison des résultats

Les ADN seront envoyés de façon régulière au prestataire, par batch de 48 patients, avant et après traitement, soit 96 échantillons au total. Le CRB-Auvergne (CHU de Clermont-Ferrand ; responsable opérationnelle : Mme Caroline Jamot) se chargera de l'envoi des échantillons. Le calendrier des envois sera établi selon le rythme des inclusions et les frais relatifs à l'envoi des échantillons seront à la charge du prestataire.

Une 1^{ère} série d'analyse sera réalisée après les 4 premières inclusions, une fois les prélèvements avant et après traitement réalisés. Cette 1^{ère} série comprendra donc 8 échantillons, et servira de « série test ». Les données seront analysées et une attention particulière sera apportée à la qualité des données, de façon à réaliser d'éventuels ajustements techniques pour les autres séries si nécessaire, après concertation avec les membres du service d'Hématologie Biologique. Une 2^{ème} analyse sera ensuite réalisée après 48 inclusions, soit 96 échantillons.

L'ensemble des données des 4 + 48 patients (104 échantillons) fera l'objet d'une analyse détaillée mettant en lien les données de méthylation et les données clinico-biologiques associées (évaluation de la fragilité individuelle, données de séquençage, scores pronostiques...).

Les phases suivantes seront organisées de façon séquentielle avec 1) une analyse des 96 premiers patients (192 échantillons), correspondant à 48 patients à associer à aux deux premières séries (4 patients analysés pour valider le process + 48 patients), soit un total de 100 patients (200 échantillons), puis 2) l'analyse des 196 premiers patients en complétant avec l'analyse des 96 patients suivants (192 échantillons supplémentaires, soit au total 392 échantillons), 3) La dernière phase concernera toutes les inclusions suivantes pour atteindre théoriquement 321 patients (642 échantillons). A noter que selon le recrutement, le nombre d'échantillons total pourra être ajusté ($\pm 20\%$).

Une fois tous les échantillons transmis, le prestataire s'engage à fournir le rapport d'analyse final dans les 6 mois suivant la réception des échantillons. Des réunions de travail régulières entre le prestataire et le service d'Hématologie Biologique seront organisées dans le but de discuter de l'avancée du projet et de définir les modalités ou stratégies d'analyse des résultats. Un interlocuteur privilégié, dédié au projet, sera identifié au sein de l'équipe du prestataire.

Dans le cas d'un empêchement d'une des 2 parties, un contact doit être pris-le plus rapidement possible. Un nouveau calendrier sera alors établi, confirmé par mail.

Article 4 : PUBLICATION des résultats

Le prestataire s'engage à fournir les éléments méthodologiques nécessaires à la publication des résultats (méthodologie, logiciels et versions, bibliographie de référence).

Le prestataire n'apparaîtra pas dans la liste des co-auteurs, mais sa participation aux travaux sera mentionnée dans les remerciements.

Article 5 : EVOLUTION DES PRODUITS ET SYSTEMES EN COURS DE MARCHE

Le fournisseur est tenu de présenter toute les évolutions (analytiques et post-analytiques) qui seraient proposées pendant la durée d'exécution du marché.

L'ensemble des frais inhérents à cette mise à jour et/ou évolution sont à la charge du fournisseur.

Article 6 : HYGIENE, SECURITE et ASSURANCE

a) Hygiène sécurité :

L'Etablissement s'engage à assurer les conditions de sécurité d'usage des personnels du Titulaire pendant leurs interventions de maintenance, et à garantir l'accès au matériel sous réserve du respect des consignes d'hygiène et de sécurité applicables aux services concernés.

b) Assurance :

Le Titulaire s'engage à souscrire une police d'assurance garantissant sa responsabilité civile, découlant des prestations qui lui sont confiées.

Article 7 : RAPPEL DES PRESTATIONS

Le présent CCTP comprend 1 lot et 1 variante.

Si le fournisseur juge qu'il peut proposer des éléments apportant une plus-value pour le service, il peut renseigner l'annexe à l'acte d'engagement en fournissant les documents techniques associés.

Article 8 : INTERLOCUTEURS

- Ingénieurs en charge du suivi du marché :

Kaïs Atallah

katallah@chu-clermontferrand.fr

Tel : 07.86.46.89.28

Céline Bourgne

cbourgne@chu-clermontferrand.fr

Tel : 04 73 750 368 (secrétariat)

- Biologistes référents :

Pr Marc Berger

EA Chelter / service hématologie biologique

mberger@chu-clermontferrand.fr

Dr Benjamin Lebecque

EA Chelter / service hématologie biologique

blebecque@chu-clermontferrand.fr

- Cellule achat du laboratoire :

Sébastien Pireyre

celluleachatlabo@chu-clermontferrand.fr

Tel : 04 73 751 558

- CRB-Auvergne :

Mme Caroline Jamot

cjamot@chu-clermontferrand.fr