



**Université
de Limoges**

CAHIER DES CLAUSES TECHNIQUES PARTICULIÈRES

**MARCHÉ PUBLIC DE FOURNITURES COURANTES ET DE
SERVICES**

Marché 907 26 44 - Microscopie Confocale Multiplex

Université de Limoges
<http://www.unilim.fr>
Pôle de la commande publique
33 rue François Mitterrand
87032 LIMOGES

OH-FLAME Microscopie Confocale Multiplex

1 – Présentation du projet / description succincte du marché

L'Institut Ω Health de l'Université de Limoges fédère une communauté scientifique de plus de 300 personnes au sein de 9 unités de recherche (CNRS, Inserm, INRAE et CHU) et une unité d'appui à la recherche (Université de Limoges, CNRS/Inserm/CHU).

Cette unité d'appui (UAR BISCEm) mutualise les moyens technologiques au service de l'ensemble des unités de recherche de l'institut Ω Health, regroupant des domaines scientifiques variés (immunologie, bactériologie, virologie, cancérologie, neurologie, pharmacologie), mais collabore également très régulièrement avec les instituts de recherche Xlim et IMPEO (Institut Matériaux Procédés Environnement Ouvrages).

Les analyses réalisées portent sur des échantillons fluorescents fixés aussi bien que sur cellules vivantes, en 3 ou 4 dimensions (3D ou 3D suivi dans le temps).

Les applications auxquelles cet équipement doit pouvoir répondre sont multiples.

1/ La mise en œuvre de nouvelles approches développées en microscopie telles que l'imagerie multiplex (panel de 6 à 8 marqueurs) et l'imagerie spectrale. Ces techniques sont de plus en plus utilisées par nos laboratoires :

- pour l'étude de molécules issues de la chimie des substances naturelles ayant des caractéristiques de fluorescence non conventionnelles et leur action sur des modèles animaux et végétaux
- pour l'analyse de modèles murins transgéniques GFP, YFP, RFP, dont notamment des interactions cellulaires ex vivo,
- pour le développement des techniques d'histo-cytométrie dans les domaines de l'hématologie, l'immunologie et l'oncologie.

Un nombre croissant de projets nécessitera donc à court et moyen terme l'utilisation simultanée d'un nombre de plus en plus important de marqueurs aussi bien sur des échantillons fixés que sur le vivant et leur observation en temps réel notamment pour le criblage des échantillons.

Le système devra permettre l'utilisation de fluorochromes ayant des longueurs d'onde d'excitation similaire et /ou des spectres d'émission proches (quelques nm).

Le système devra permettre l'extraction des spectres d'émission online.

2/ **La résolution:** l'utilisation d'un système de microscopie de haute résolution est un pré-requis pour résoudre les problématiques de localisation et de colocalisation telles que la dynamique de la localisation de gènes d'Ig dans des contextes de régulation épigénétique, de localisation de protéines ou peptides d'intérêt aux différents compartiments cellulaires (mitochondrie, lysosome, protéasome et reticulum endoplasmique) etc

3/ **Les mosaïques d'images** : le système devra permettre la mise en œuvre de mosaïques d'images en 2D (y compris pour les acquisitions multiplex) et en 3D particulièrement utiles dans le domaine de l'oncologie pour l'étude du microenvironnement tumoral.

4/ **L'acquisition rapide en 3D sur cellules vivantes** : le système devra proposer une cadence d'acquisition permettant de visualiser la dynamique mitochondriale en fluorescence sur des cellules neuronales normales ou de patients avec une phototoxicité très faible.

5/ **L'acquisition en 3D sur échantillons épais transparisés** (de type sphéroïdes / petits organoïdes) : Les laboratoires de l'institut ΩHealth développent de nombreux modèles alternatifs aux modèles animaux afin de répondre aux exigences de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). La plateforme de microscopie de l'UAR doit offrir des outils adaptés aux échantillons tels que les sphéroïdes, organoïdes, tumoroïdes et organes sur puce. L'imagerie 3D sur échantillons transparisés apporte une première réponse à ce défi technologique, aux côtés d'autres solutions non encore disponibles localement telles que l'imagerie par feuillet de lumière.

Outre les contraintes techniques auxquelles le système doit répondre, des contraintes liées à la structuration même de la plateforme de microscopie impliquent des critères supplémentaires. **Le système doit être facile de prise en main** puisque la plateforme ne dispose que de 0,7 ETP pour accompagner l'ensemble des utilisateurs sur les différents systèmes ainsi que pour l'analyse des données (interface conviviale, facilité de mise en œuvre des protocoles d'acquisition, facilité de repérage des échantillons etc).

2 – Description de l'équipement

2.1 – Microscope confocal à balayage laser

L'équipement comprendra :

- **un microscope optique inversé motorisé**

- Microscope inversé motorisé incluant :
 - o Axe Z motorisé
 - o Une tourelle d'objectif motorisée 6 positions et leur emplacement DIC.
 - o Une tourelle motorisée pour les filtres de fluorescence
- Il est demandé les objectifs suivants :
 - o Un objectif 10x de qualité plan apochromat (ou équivalent), à contraste de phase pour le repérage des cellules

- o Un objectif 20x ou 25x multimmersion de qualité plan apochromat et d'ouverture numérique égale ou supérieure à 0.8
- o Un objectif 40x longue distance de travail à immersion à eau de qualité plan apochromatique avec une ouverture numérique au moins égale à 1,1
- o Un objectif x60 ou supérieure à immersion à huile de qualité plan apochromat, d'ouverture numérique supérieure ou égale à 1,4.

La fourniture d'un x5 serait appréciée, ainsi qu'un système d'autoimmersion pour l'objectif x40 à eau.

- Le microscope devra être équipé d'une platine motorisée ainsi que des modules logiciel nécessaires pour les acquisitions multipoints automatisées et les acquisitions grand champ avec reconstruction de l'image (type « mosaïque » ou « tile scan »). La platine sera également accompagnée d'un joystick pour une utilisation libre du logiciel.
- Il est demandé 3 filtres pour l'observation aux oculaires permettant de voir le DAPI, la GFP et la Cy3 (ou fluorochromes équivalents).
- Une lampe pour l'observation en fluorescence aux oculaires
- Une lampe Halogène pour l'observation en fond clair et en contraste de phase

• **un système de confocal à balayage laser**, comprenant :

- Les sources d'excitation permettant d'atteindre au minimum les longueurs d'onde suivantes : 405,445,488, 561 et 639 (ou équivalentes en justifiant).
- Un groupe de détection offrant la possibilité de travailler jusqu'à 8 canaux haute sensibilité (de type GaAsP)
- Un groupe de détection spectrale haute sensibilité (de type GaAsP) permettant la séparation spectrale en ligne (simultanée) jusqu'à 8 fluorophores sur l'ensemble du spectre 400 – 700 nm.
- un détecteur en transmission
- Le module de détection devra offrir la flexibilité nécessaire pour permettre de déterminer les bandes passantes d'émission.
- Le module de détection devra aussi offrir la possibilité de faire des acquisitions en mode réflexion de surface et les combiner, lors d'une même séquence d'acquisition avec des acquisitions en fluorescence pour l'analyse de matériaux.
- Le système devra posséder un scanner permettant des acquisitions rapides (cf paragraphe 1, point 4/).
- Le module d'acquisition FRAP devra être fourni avec le système.

Tout système permettant, sans modification de préparation d'échantillon, une amélioration de la résolution et de la vitesse serait un plus (cf paragraphe 1, points 2/ et 4/). Il est demandé au candidat d'argumenter sa proposition sur chacun des points précédents.

- **Un système de maintien de focus**

- **Un système d'incubation.**

Le microscope devra être équipé d'une chambre d'incubation régulée en température et en CO₂.

- **Une table antivibration**

- La table fournie devra permettre d'isoler l'ensemble des éléments sensibles aux vibrations.

- **Une station d'acquisition**

- Un PC avec les performances suffisantes pour piloter de manière fluide l'ensemble des modules demandés. Il devra à minima avoir une carte GPU de 16 Go et une mémoire RAM de 128Go ainsi qu'un processeur Intel Xeon W7 (ou équivalent). Le PC sera équipé à minima d'un écran 32 pouces.

Une taille supérieure serait un plus.

- **Le logiciel de pilotage**

- Le logiciel fourni permettra le pilotage de l'ensemble des composants du microscope. Il devra permettre de réaliser des acquisitions
 - o Multiplex (jusqu'à 8 couleurs)
 - o spectrales simultanées ou séquentielles
 - o en Z avec option de correction automatique de la luminosité en profondeur
 - o multi-points et/ou mosaïque automatisées
 - o en time lapse
 - o utilisant les propriétés de photomanipulation (F-Technique). Il est demandé à minima la possibilité de faire du FRAP
- De plus le logiciel devra permettre :
 - o d'acquérir des régions d'intérêts (plusieurs) de forme et de position librement choisie(s)

- o d'orienter l'image à l'acquisition sur une rotation libre à 360° sans perte de luminosité ou sans nécessité d'augmenter le laser. Cette rotation du champs d'acquisition devra être compatible avec la fonction mosaïque de la platine motorisée
 - o de maintenir le focus au cours du temps et/ou dans le cadre d'acquisition(s) multipoints
 - o de rechercher le focus (système d'autofocus)
 - o de combiner des acquisitions avec des réglages différents (puissance laser et gain), configuration optique, déplacement(s) de la platine en x, y et z
 - o de traiter des images au cours de l'acquisition (par exemple l'extraction de spectres de référence).
- Le logiciel devra également offrir les outils suivants
- o Séparation spectrale. Cette dernière devra offrir la possibilité de travailler en mode « aveugle », en mode interactif ou à partir de spectre de référence
 - o Analyse de la co-localisation
 - o Visualisation 2D, 3D ou vue orthogonale
 - o Analyse de l'histogramme
 - o Mesure d'intensité, de distance
 - o Barre d'échelle
 - o Filtres median, gaussien etc...

Le système devra permettre une utilisation en autonomie facilitée afin de dégager du temps en ressources humaines des personnels de la plateforme. Tout équipement permettant notamment un repérage facilité des échantillons sur la platine sera grandement apprécié.

3 – Obligation de résultat

Le titulaire est tenu à une obligation de résultat concernant la conformité, les performances et le bon fonctionnement des équipements fournis dans le cadre du présent marché.

Les matériels livrés devront être pleinement opérationnels, conformes aux spécifications techniques :

Analyse complète d'une lame de FISH DAPI/AQUA/FITC/Cy3 :

- 1/ acquisition automatisée en z stack de plusieurs champs sur une lame sans perte de focus.
- 2/ Si acquisition d'une solution d'analyse d'image : export des données et calcul de toutes les distances possibles entre tous les sondes FISH marquées, par noyau, et distance des spots par rapport au centre du noyau. Ces analyses devront être réalisées en batch sur les différents champs préalablement acquis.

Analyse du réseau mitochondrial sur cellules vivantes marquées à l'aide d'une sonde spécifique (type mitotracker green ou red):

- 1/ Acquisition en time lapse court (30 minutes) sans perte du signal de fluorescence
- 2/ Si acquisition d'une solution d'analyse d'image : calcul du nombre de mitochondries au cours du temps et suivi de leur trajectoire.

Analyse d'échantillons en 4D :

- 1/ Acquisition en 4D (time lapse + 3D) sur film bactérien au cours de la nuit en multipositions (2 positions dans 2 puits différents d'un support de culture de type multiwell coverslip) sans perte de focus.
- 2/ segmentation bactérienne et répartition de bactéries vertes versus rouges dans l'épaisseur du biofilm.

Analyse en mode spectral :

- 1/ Séparation des spectres spécifiques d'une molécule d'intérêt autofluorescente avec un marqueur subcellulaire type mitotracker green.
- 2/ Analyse de la colocalisation entre la molécule d'intérêt et le marqueur subcellulaire dans le logiciel d'acquisition sans avoir recours à une solution d'analyse d'images supplémentaire.

En cas de défaillance, de non-conformité ou de dysfonctionnement constaté pendant la période de garantie, le titulaire devra procéder, à ses frais, à la réparation ou au remplacement des équipements concernés dans les délais prévus au marché.

Dans le cas où ces obligations de résultat ne seraient pas respectées, le fournisseur disposera d'un délai maximal de 15 jours calendaires pour intervenir et remettre l'équipement en état de fonctionnement.

Passé ce délai, une pénalité de 150 € par jour calendaire de retard sera appliquée jusqu'à la remise en service effective de l'équipement.

En cas d'impossibilité de remise en état dans un délai raisonnable, ou en cas de défaillances répétées compromettant le bon fonctionnement de l'équipement, le fournisseur devra procéder au remplacement complet de l'appareil au titre de la garantie, sans frais supplémentaires pour l'acheteur.

4 - Modalité d'exécution

4.1 – Installation

Le système devra être installé au plus tard le 30/09/2026.

4.2 – Lieu de livraison

Les équipements seront livrés à l'adresse suivante :

Université de Limoges

Institut Oméga Health

CBRS

2 rue du Professeur Descottes

87025 LIMOGES

4.3 – Prestations incluses

Les prestations suivantes seront incluses dans la proposition du candidat

- Emballage
- Frais de douane
- Transport
- Assurance transport
- Installation
- Stage de formation à l'utilisation du dispositif

La validation des prestations techniques sera basée sur la capacité du système à répondre aux applications décrites dans les obligations de résultat

5 – Formation des utilisateurs :

Il est demandé une formation complète sur le système des deux personnels techniques de la plateforme.

6 – Service Après-Vente :

6.1 Service après-vente pendant la durée de la garantie

Le candidat doit joindre à son mémoire technique un descriptif détaillé du fonctionnement de son service après -vente, au titre de la mise en œuvre de la garantie contractuelle, précisant notamment :

- Les délais d'intervention

- Les modalités d'intervention (n° d'appel du service, coordonnées précises du service après-vente)
- Et toutes les informations jugées utiles pour la bonne exécution du ce service.

La qualité du service après-vente fait partie des critères de sélection.

6.2 Service après-vente à l'issue de la garantie dit curative

La maintenance curative a pour objet la remise en état de fonctionnement de l'équipement en cas de panne ou de dysfonctionnement imprévu.

Le prestataire devra, dans son offre, proposer et détailler :

- Les délais d'intervention, incluant le délai de prise en compte et le délai d'intervention sur site.
- Les modalités de prise en charge, telles que hotline, diagnostic à distance et intervention sur site.
- Les conditions contractuelles de facturation, incluant la main-d'œuvre, les déplacements et les pièces.
- La liste des pièces stratégiques ou critiques susceptibles d'être remplacées, accompagnée de leur tarification unitaire ainsi que la disponibilité des pièces détachées.

7 – Garantie et maintenance préventive :

7.1 Garantie

Il est demandé 2 années minimum de garantie (pièces, main-d'œuvre et déplacement inclus)

La garantie couvre le démontage, le remplacement et le remontage de toute partie de la prestation ou de l'équipement qui serait, à l'usage, reconnue défectueuse, hors pièces d'usure. Cette obligation inclut l'ensemble des frais induits par la remise en état ou le remplacement du matériel, et notamment les frais de déplacement, de main-d'œuvre, d'emballage et de transport, que les opérations soient réalisées sur le lieu d'utilisation de l'équipement ou que celui-ci soit, à la demande du candidat, retourné dans ses établissements.

La garantie couvre également, sans surcoût pour l'Université, les frais de main-d'œuvre et de déplacement du personnel intervenant dans le cadre de ces opérations.

Le candidat ne pourra en aucun cas refuser l'application de la garantie au motif de l'absence de contrat de maintenance préventive.

Un refus de prise en charge ne pourra être opposé que si le candidat démontre de manière objective, documentée et contradictoire que le dysfonctionnement résulte directement et

exclusivement d'un manquement avéré aux conditions d'utilisation ou d'entretien prescrites par le constructeur, dûment justifié.

La garantie contractuelle prend effet à compter de la date de réception des prestations prononcée par l'administration. La réception technique du matériel sera quant à elle proclamée dès lors que les tests de réception seront estimés satisfaisants et que la qualité du matériel sera établie en accord avec les objectifs du marché.

7.2 Maintenance préventive

Le candidat devra obligatoirement fournir dans son offre les tarifications applicables à la maintenance préventive pour un contrat de maintenance pour une durée de trois ans.

Le candidat devra décrire de manière précise, détaillée et exhaustive les conditions contractuelles, les modalités d'intervention, le périmètre couvert, ainsi que le contenu détaillé des prestations de maintenance préventive et curative proposées, afin de permettre une analyse comparative objective des offres.

La maintenance préventive a pour objectif d'assurer l'entretien régulier de l'équipement, de prévenir l'apparition de pannes, de garantir le bon fonctionnement de la machine dans la durée et de limiter les arrêts non planifiés. Elle comprend a minima une visite annuelle, au cours de laquelle seront réalisées les opérations suivantes :

- nettoyage de l'équipement ;
- remplacement des pièces conformément aux préconisations du constructeur.
- réglages et calibrations nécessaires ;
- contrôles fonctionnels et de sécurité ;
- essais de bon fonctionnement ;

Le candidat devra préciser :

- la liste exhaustive des opérations réalisées lors de chaque visite ;
- les pièces incluses dans la prestation ;
- Liste des pièces exclus dans la prestation en précisant leur abattement (tarifaire, usure)
- les documents remis à l'issue de l'intervention (rapport de maintenance, traçabilité, recommandations).

L'ensemble de ces informations sont nécessaire afin de permettre à l'Université d'évaluer le coût global de possession (TCO) de l'équipement et de comparer objectivement les offres.

8 – Autre(s)

Dans le cadre de l’emménagement dans l’extension du bâtiment actuel le système devra être déplacé à la fin de l’année 2027, il demandé au répondant de proposer une assistance pour ce déménagement (déplacement et remise en service).

Par ailleurs le répondant indiquera le coût carbone du système, depuis sa fabrication jusqu’à sa livraison et son installation.

En complément, dans le cadre de notre politique de maîtrise de l’énergie, le fournisseur devra fournir les informations sur la consommation énergétique, préciser le rendement énergétique, mentionner la classe énergétique conformément à la réglementation en vigueur et fournir les documents techniques justificatives.

9 – Prestations Supplémentaires Eventuelles :

Si le budget proposé le permet toutes ou partie des options suivantes pourront être proposées par le répondant pour compléter l’offre décrite dans le paragraphe 2.

9.1 – Solution logiciel pour l’analyse d’images avancée

Il est demandé de proposer un logiciel d’analyse d’images avancée en PSE1.1 permettant :

- L’analyse d’images 3D et 4D (3D + temps) multichannels
- La segmentation d’objets utilisant les techniques avancées de machine learning (type Stardist ou Cell pose)
- La mise en place de protocoles d’analyses d’image complexes et leur application automatisée sur des séries d’images.
- Le tracking d’objets au cours du temps
- L’export des données en masse.

En regard de projets scientifiques menés en collaboration avec la plateforme de microscopie, une attention particulière sera portée à la possibilité 1/ de générer dans le logiciel des régions d’intérêt (ou ROI pour Region of Interest) à partir d’objets identifiés *via* des masques de segmentation (exemple une cellule ou un noyau) et 2/ de pouvoir créer des relations de dépendance entre ces ROI et d’éventuels objets contenus à l’intérieur.

Le logiciel devra produire des mesures entre objets dans une même ROI.

Ces processus devront pouvoir être réalisés simplement dans le logiciel par n’importe quel utilisateur formé à l’utilisation courante du logiciel.

Il est demandé de proposer en PSE 1.2 une variante incluant également un module d’analyse du réseau neuronal type « neurotrack » (exemple : mesure des prolongements neuronaux et des embranchements)

9.2 – Maintenance préventive supplémentaires

Il est également demandé de proposer des années de maintenance préventive supplémentaires pour le système. Le répondant devra décrire dans quelle mesure ces années de maintenance supplémentaires participeront à la longévité du système et contribueront ainsi à la diminution de l’empreinte carbone de cet équipement.

Le candidat chiffrera en PSE :

- PSE 2 : Un contrat de maintenance pour une durée de 1 an portant la maintenance préventive à une durée totale de 4 ans
- PSE 3 : Un contrat de maintenance pour une durée de 2 ans portant la maintenance préventive à une durée totale de 5 ans
- PSE 4 : Un contrat de maintenance pour une durée de 3 ans portant la maintenance préventive à une durée totale de 6 ans
- PSE 5 : Un contrat de maintenance pour une durée de 5 ans portant la maintenance préventive à une durée totale de 8 ans.

9.3 – Système de contrôle métrologique

Dans le cadre de la mise en œuvre d’une démarche d’amélioration continue du suivi des équipements de la plateforme de microscopie de l’UAR BISCEm, la proposition d’un outil permettant de réaliser facilement le suivi métrologique de l’équipement sera une plus-value et fera l’objet d’une PSE (PSE 6).