

Cahier des Charges Techniques et Particulières (CCTP)

Prestations de Ribodéplétion et Séquençage haut Débit « short reads » sur extraits d'ARN de plantes pour l'Unité de Quarantaine (UQ) du Laboratoire de Santé des Végétaux (LSV) de l'Anses

1. Objet du marché

Dans le cadre de son activité scientifique de validation de méthode et d'analyses de routine en séquençage haut débit, l'unité de quarantaine du laboratoire de la santé des végétaux a la nécessité de faire procéder à des prestations de ribodéplétion et de séquençage haut débit « short reads » afin d'acquérir des séquences de qualité pour l'identification de tous les virus et viroïdes présents dans les échantillons. Les végétaux à analyser appartiennent à différents genres tel que : *Prunus sp.*, *Malus sp.*, *Citrus sp.*, *Vitis sp.* et *Solanum sp.*.

2. Echantillons transmis par l'Anses

Nature :

Les échantillons sont constitués d'extraits d'ARN de plantes (matrices diverses, dont feuilles, bois, écorces, racines, etc...) contenant potentiellement des ARN de virus et/ou viroïdes.

Les extraits d'ARN pourront avoir été traités à la DNase ou non (pour les échantillons traités à la DNase, le traitement sera effectué par l'Anses et précisé lors de l'envoi des échantillons).

Elution et mode de conservation des échantillons :

Les extraits d'ARN seront en général élués dans de l'eau de qualité biologie moléculaire et seront conservés à -80°C en attente d'expédition.

Dans certain cas, environ une dizaine d'échantillon par an, un ou plusieurs échantillons pourront être envoyés dans un mélange acétate de sodium et éthanol, nécessitant à leur arrivée une étape préliminaire de précipitation et de réhydratation, à réaliser par le prestataire. Lors de la commande, le ou les échantillons concernés seront précisés.

Les identifiants des échantillons seront précisés sur chaque tube.

Contraintes Anses :

Qualité et quantité des extraits :

- Volume fourni : 20 -21 µL
- Concentration minimale : 15 ng/µL estimée par fluorimétrie (Qubit), (mesures fournies).
- Valeur moyenne historique des RIN : 7.8 avec forte disparité en fonction des genres végétaux (moyenne entre 6 et 9). Dans certains cas, le RIN peut être inférieur à 6.

Une normalisation en concentration et en volume pourra être réalisée par l'Anses à la demande du prestataire.

Le volume et la concentration de chaque échantillon seront précisés par l'Anses sur un document annexe

fourni par l'Anses ou sur un document du prestataire.

Dans le cas où la pureté des extraits (rapport A260/230 et A260/280) n'est pas jugée suffisante (par l'Anses ou le prestataire), une purification des extraits par le prestataire pourra être demandée par l'Anses.

Transport des échantillons à la charge de l'Anses :

Les échantillons seront conditionnés en microtubes (barette de 8 microtubes de 0,2 mL ou microtubes de 0,5 à 2 mL) ou en plaque, et expédiés sous carboglace à la charge de l'Anses (logistique et financier), exception faite des quelques échantillons dans l'éthanol et l'acétate de sodium qui seront expédiés à T°C ambiante).

Le candidat indique dans son offre l'adresse à laquelle les échantillons devront être envoyés.

Les échantillons seront envoyés, pendant la durée du marché, en majorité entre juin et décembre.

Pendant le transport entre le laboratoire Anses (63370 Lempdes, France) et le lieu d'exécution de la prestation, toute ouverture du colis est interdite afin d'empêcher toute manipulation des échantillons qui pourraient dégrader les ARN en raison de leur fragilité ou entraîner la perte d'un échantillon. En raison de ces risques, le re-routage des échantillons est interdit. **Le transport des échantillons** entre le laboratoire Anses et le lieu d'exécution de la prestation **doit pouvoir être réalisé avec un délai de 72h maximum** car la durée de conservation de la carboglace dans les boîtes fournies par le transporteur n'excède pas cette durée (si la durée de transport est plus longue, il y a un risque de dégradation des ARN).

3. Prestation demandée

Estimation moyenne du nombre d'échantillon par an :

- 220 échantillons/an

Les échantillons à traiter sont regroupés en « lots ».

Une même expédition peut contenir plusieurs « lots ». d'échantillons.

Lorsqu'une expédition comporte plusieurs « lots » :

- les différents lots seront physiquement séparés et facilement identifiables par le prestataire.
- l'Anses précisera les échantillons appartenant à chaque lot (par courriel ou par remplissage des documents adéquats du prestataire).

Nombre d'expéditions estimé sur un an : entre 5 et 10

Nombre total de « lots » estimé sur un an : entre 7 et 12.

Exigences:

- L'ensemble de la prestation de séquençage sur ARN de plantes sera réalisé sous accréditation ISO/IEC 17025 (de la réception des échantillons à l'émission du rapport final avec logo de l'organisme accréditeur).
L'accréditation couvre l'étape de ribodéplétion qui doit figurer sur le rapport final.
- Pour chaque échantillon transmis par l'Anses, la prestation attendue comprend a minima 5 étapes (2 et 4 à 7) parmi les 7 listées infra :
 - 1. Prestation de précipitation et de réhydratation (**si demandée**)
 - 2. Contrôle qualité à réception (RIN, concentration en ARN)
 - 3. Purification (**si demandée**)
 - 4. Ribodéplétion en ARNr végétaux (sauf mention contraire de l'Anses) ;
 - 5. Préparation et contrôle qualité des librairies
 - 6. Séquençage haut débit technologie Illumina
 - RNA Seq paired-end : 2 x 150 pb

- 2 x 25 Million reads
NB : pendant la durée du marché, le nombre de reads pourra être amené à varier en fonction des essais à réaliser par l'Anses selon les modalités définies au CCAP (clause de réexamen)
- 7. Transfert des fichiers fastq, des empreintes md5 et du rapport final de la prestation
- La prestation doit être réalisée lot par lot. Tous les échantillons d'un même lot doivent être traités simultanément pour chacune des étapes.
- Chaque lot d'échantillon doit être traité, quelle que soit l'étape, en l'absence d'autres échantillons de plantes (quelle que soit l'origine), sauf indication expresse de l'Anses.
- Les conditions spécifiques relatives aux extraits d'ARN requises par le prestataire comme par exemple, volume minimum, concentration minimale, quantité minimale, doivent être communiquées dans l'offre du candidat. En cas d'incompatibilité entre ces conditions et celles de l'Anses (cf § 2 Echantillons à traiter), le candidat ne sera pas retenu.
- En cas de qualité insuffisante pour un ou plusieurs échantillons d'un même lot lors de la réalisation de la prestation, le titulaire demandera systématiquement l'accord de l'Anses avant toute poursuite de la prestation demandée pour l'ensemble des échantillons du lot.
- A des fins de valorisation scientifique, le kit de ribodéplétion, le kit de préparation des bibliothèques et le type de séquenceur utilisés devront être communiqués dans l'offre. En cours d'exécution du marché, le cas échéant, le candidat s'engage à informer l'Anses de toute évolution majeure de la méthode utilisée. L'Anses se réserve la possibilité de refuser toute modification importante. En cas de refus de l'Anses, le candidat s'engage à traiter les échantillons Anses avec la méthode antérieure à l'évolution refusée.
- La ribodéplétion doit être adaptée aux échantillons issus de plantes (avec utilisation obligatoire du kit QIAseq FastSelect-rRNA Plant kit, Qiagen. Ce kit a été choisi sur la base de résultats comparatifs présentés par le LRUE (EURL-VIR Workshop 8-9 June 2023, Rome) car il permet une meilleure ribodéplétion des extraits de plantes hôtes.
- Critères d'acceptation Anses pour les résultats de séquençage:
Pour chaque échantillon :
 - au moins 85% des bases obtiennent un QScore égal ou supérieur à 30
 - 2 x 25 Millions de reads :
Si le nombre de reads fourni est inférieur, le résultat ne sera pas accepté et le titulaire devra re-séquencer à ses frais (sauf si l'échantillon était de qualité et/ou en quantité insuffisante à réception par le prestataire)
Si le nombre de read fourni est supérieur, aucun surcoût ne sera payé par l'Anses.
- En cas d'échec de la ribodéplétion ou de la préparation de la bibliothèque, si les extraits d'ARN Anses ont passé le contrôle qualité réception du titulaire, le titulaire réitère l'étape à sa charge (sans facturation).
- En cas de contamination imputable au titulaire, observée par l'Anses à l'issue de l'analyse des résultats de séquençage transmis par le titulaire, un re-séquençage de l'échantillon sera réalisé à la charge du titulaire.
- Le demandeur Anses sera informé si un échantillon est re-séquéncé à l'initiative du titulaire.
- Le prestataire conservera le reliquat des extraits au moins trois mois après la mise à disposition des résultats afin de pouvoir réitérer tout ou partie du processus analytique en cas de problème. Si le candidat peut proposer un délai plus long, il l'indique dans son offre.

4. Livrables

Documents à fournir obligatoirement pour chaque échantillon :

- Fichier de contrôle qualité des ARN à réception,
- Fichier de contrôle qualité de la ribodéplétion (sauf impossibilité),

- Fichier de contrôle qualité des librairies,
- Fichiers FastQ (transmission informatique des résultats par transfert ftp des données de séquençage haut débit du titulaire ou tout autre système sécurisé),
- Empreintes md5 pour chaque fichier fastQ,
- Rapport de prestation final (avec logo d'accréditation).

Les informations suivantes seront également obligatoirement fournies par le titulaire :

- Le kit de ribodéplétion employé
- Le kit de préparation des librairies employé
- Le séquenceur utilisé

A l'exception des audits du prestataire au regard de la norme ISO/IEC 17025, aucun usage des données associées à ces livrables n'est autorisé. Le transfert de ces données à une tierce partie n'est pas autorisé sauf autorisation ponctuelle du demandeur Anses.

5. Délai de livraison des résultats:

Par « délai de rendu de résultats » il faut comprendre « le délai entre la date de réception des échantillons par le titulaire et la date de la mise à disposition des données de séquençage haut débit par le titulaire vers le laboratoire Anses ».

Exigences :

Le délai maximum de rendu de résultats exigé par l'Anses en jours ouvrés (du lundi au vendredi selon la réglementation française) est de **30 jours ouvrés maximum**. Si le candidat peut proposer un meilleur délai, il l'indique dans son offre. Le titulaire s'engage sur le délai de rendu des résultats indiqué dans son offre dans le respect du délai maximum exigé par l'Anses.

Un accusé de réception des envois d'échantillons sera transmis impérativement par le titulaire au laboratoire Anses demandeur. La forme de cet accusé de réception ainsi que ses modalités de transmission sont laissées au libre choix du titulaire.

Toute difficulté concernant les délais doit être signalée au plus tôt à l'Anses, et impérativement avant l'expiration du délai contractuel.

Dans le cas où la mise à disposition des résultats ne respecterait pas les délais prévus dans l'offre du titulaire, l'Anses se réserve la possibilité d'appliquer des pénalités selon les modalités définies au CCAP.

Le titulaire s'engage à prévenir l'Anses en amont (minimum 1 mois avant) en cas de périodes éventuelles de fermeture de la société.

Le prestataire conservera les données brutes de séquençage au moins six mois après leur mise à disposition. Si le candidat peut proposer un délai plus long, il l'indique dans son offre.

6. Traçabilité :

Les échantillons peuvent être ré-identifiés par le prestataire, auquel cas, la correspondance avec les identifications fournies par le demandeur Anses sera transmise.

Tout échange en cours d'exécution entre le prestataire et le demandeur de l'Anses fera l'objet d'un courriel systématique aux personnes identifiées comme contact et sur la boîte institutionnelle de l'unité clermont.lsv@anses.fr

7. Communication :

Le candidat précisera dans son offre la manière dont il communiquera avec l'Anses et les moyens mis en œuvre pour faciliter cette communication (a minima coordonnées des personnes spécialisées sur les différents aspects du marché (technique, financier, ...)).