

**ESSAI INTER-ANALYSTES IFREMER POUR
L'ÉVALUATION DE LA QUALITÉ
DES CONNAISSANCES EN TAXINOMIE ET
DENOMBREMENT DU PHYTOPLANCTON MARIN**
RAPPORT D'ÉVALUATION DES ANALYSTES DU PHYTOPLANCTON DANS LE CADRE DU
REPHY

**Aquaref B3-9 -Rapport sur l'essai inter-analystes
« détermination et dénombrement du phytoplancton »**

**N. Neaud-Masson, M. Brun
JANVIER 2016**

Programme scientifique et technique
Année 2015

Document final

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2015

Auteur (s) : Neaud-Masson N., Brun M.

*Nadine Neaud-Masson
Ifremer centre de Nantes
Nadine.Masson@ifremer.fr*

*Mélanie Brun
Ifremer centre de Nantes
mbrun@ifremer.fr*

Vérification du document :

*Dominique Soudant
Ifremer centre de Nantes
dsoudant@ifremer.fr*

*Laurence Miossec
Ifremer centre de Nantes
Laurence.Miossec@ifremer.fr*

*Bruno Andral
Ifremer centre de Toulon
Bruno.Andral@ifremer.fr*

*Béatrice Lalere
Laboratoire national d'Essai
Beatrice.Lalere@lne.fr*

Les correspondants

Onema : *Marie Claude Ximenes, marie-claude.ximenes@onema.fr
Yorick Reyjol, yorick.reyjol@onema.fr
Emilie Breugnot, emilie.breugnot@onema.fr*

Référence du document : Nadine Neaud-Masson, Mélanie BRUN - Essai inter-analystes Ifremer pour l'évaluation de la qualité des connaissances en systématique du phytoplancton marin - Rapport d'évaluation des compétences en détermination et en dénombrement du phytoplancton marin dans le cadre du REPHY. Rapport AQUAREF 2015 - 43 p.

Droits d'usage :	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

1. INTRODUCTION.....	6
2. MATERIELS ET METHODES.....	8
2.1 Organisation.....	8
2.2 Prise en compte des résultats.....	8
2.3 Interprétation statistique des résultats quantitatifs.....	9
3. RESULTATS.....	10
3.1 Stratégie de comptage des opérateurs.....	10
3.2 Résultats qualitatifs.....	11
3.3 Résultats quantitatifs et discussion.....	14
4. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	26
5. CONCLUSION.....	27

Liste des annexes :

ANNEXE I BIBLIOGRAPHIE.....	28
ANNEXE II MARINE INSTITUTE-IOC PHYTOPLANKTON INTERCOMPARISON TEST 2015 - INSTRUCTIONS.....	29
ANNEXE III RESULTATS DES ANALYSTES PARTICIPANTS.....	40
ANNEXE IV RESUME DES SCORES Z DE TOUS LES ANALYSTES.....	42
ANNEXE V DIFFUSION INTERNE IFREMER DU RAPPORT.....	43

RESUME

Les essais d'aptitude par comparaison inter-laboratoires ou inter-analystes sont utilisés pour évaluer les performances des laboratoires ou analystes sur des compétences spécifiques. Un exercice d'inter-comparaison international est organisé tous les ans par le Marine Institute Phytoplankton unit de Galway (Ireland), sous couvert du NMBAQC-BEQUALM, pour évaluer les performances en identification et en dénombrement du phytoplancton marin.

La détermination des espèces phytoplanctoniques et l'estimation de leur abondance dans le cadre du Réseau d'observation et de surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie, mis en œuvre par l'Ifremer (REPHY) s'appuie sur 28 analystes, répartis dans 11 laboratoires. Onze d'entre eux ont été inscrits à titre individuel en 2015 pour participer à l'inter-comparaison réalisé par le Marine Institute de Galway (ICN-BEQUALM). Les échantillons envoyés aux analystes concernés ont été utilisés pour évaluer aussi les compétences des analystes non-inscrits à l'ICN-BEQUALM, mais réalisant également des analyses de phytoplancton dans ces mêmes laboratoires pour le REPHY. L'analyse statistique des résultats s'appuie sur la même mesure de performance que celle utilisée par le Marine Institute.

Ce rapport décrit le déroulement de l'ICN-BEQUALM et de l'essai complémentaire Ifremer (EIA) et, présente seulement les résultats obtenus pour l'essai Ifremer.

L'objectif est d'apporter des éléments à l'ensemble du personnel du REPHY afin d'entretenir une amélioration continue des pratiques et de déterminer des actions à mettre en œuvre pour cette amélioration.

En terme d'identification des taxa, les résultats reçus montrent que les analystes sont hautement qualifiés dans l'identification du phytoplancton marin et démontrent qu'il existe un consensus parmi les analystes sur la majorité des identifications des espèces présentes dans les échantillons de cet essai. Toutefois, des formations ciblées sur les espèces des genres *Pseudo-nitzschia* et *Guinardia* sont à envisager pour certains analystes.

L'analyse des résultats des dénombrements obtenus cette année a mis principalement en évidence l'importance de la bonne application des protocoles et des instructions particulièrement en ce qui concerne la maîtrise de la préservation des échantillons. Cette dernière, repose en grande partie sur les conditions ambiantes de stockage et sur les délais d'analyse.

Les différents exercices d'inter-comparaison qui ont été menés jusqu'à présent apportent souvent des éléments différents et complémentaires. Ils s'intègrent dans la démarche qualité, et devront, avec leur pérennisation, attester des bonnes pratiques et de leur optimisation.

L'Ifremer, prévoit donc de faire participer chaque année à l'ICN-BEQUALM un tiers des analystes du REPHY et continuer aussi l'évaluation des différents analystes.

Mots clés (thématique et géographique) : Essai d'aptitude, Comparaison Inter-Laboratoires, ICN, Essai Inter-Analystes, EIA, phytoplancton

1. INTRODUCTION

L'Ifremer est chargé d'apporter à l'État et aux autres personnes morales de droit public son concours pour l'exercice de leurs responsabilités, notamment pour le contrôle de la qualité des produits de la mer et du milieu marin (Décret du 5 juin 1984 modifié relatif à la création, à l'organisation et au fonctionnement de l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer). La mise en œuvre d'un réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie (REPHY), depuis sa création en 1984, répond à cette mission. Le concours apporté à l'Administration Centrale se concrétise particulièrement par un soutien :

- à la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (MAAF), pour l'application de la réglementation relative au suivi de la salubrité des zones de production de coquillages ;
- au Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie (MEDDE¹), l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA) et les agences de l'eau pour l'application de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) concernant la surveillance de l'élément de qualité biologique « phytoplancton » et des paramètres hydrologiques dans le milieu littoral.

Les objectifs du REPHY sont :

- La connaissance de la biomasse, de l'abondance et de la composition du phytoplancton marin des eaux côtières et lagunaires, ainsi que de la distribution spatio-temporelle des différentes espèces phytoplanctoniques. Cet objectif inclut, également le recensement des efflorescences exceptionnelles telles que les eaux colorées, des développements d'espèces toxiques ou nuisibles susceptibles d'affecter l'écosystème, ainsi que du contexte hydrologique afférent.
- La détection et le suivi des espèces phytoplanctoniques productrices de toxines susceptibles de s'accumuler dans les produits marins de consommation ou de contribuer à d'autres formes d'exposition dangereuse pour la santé humaine, ainsi que la recherche de ces toxines dans les mollusques bivalves présents dans les zones de production ou dans les gisements naturels.

La détermination des espèces phytoplanctoniques et l'estimation de leur abondance dans le cadre du REPHY sont réalisées par 28 analystes de l'Ifremer, répartis dans 11 laboratoires. Les protocoles usuellement appliqués par les analystes sont décrits dans le document de méthode de Neaud-Masson Nadine (2015). Ces protocoles s'inspirent des lignes directrices de la norme NF EN 15204 (2006) fondée sur la technique de sédimentation classique telle que définie par Utermöhl en 1958. Cette norme s'adresse spécifiquement aux analyses de routine par microscopie optique inversée, telles que pratiquées pour le REPHY, mais elle ne cite pas explicitement le recours à des exercices de comparaison inter-laboratoires (CIL) ou inter-analystes (EIA). En revanche le recours à de tels essais est introduit comme exigence relative à la qualification du personnel dans la norme NF EN 15972 (2011) et est obligatoire dans le cadre des accréditations en application de l'arrêté Agrément des opérateurs de la surveillance DCE (arrêté du 27 octobre 2011)². Les CIL ou EIA sont utilisés pour évaluer les performances des laboratoires ou analystes sur des compétences spécifiques. L'objectif fixé dans le cadre d'Aquaref est de définir les modalités des tests d'évaluation des compétences pour les éléments de qualité biologique en milieu marin. Ces tests doivent permettre d'identifier les besoins en formation et de les prévoir dans les programmations à venir.

Deux EIL ont été organisés en interne à l'Ifremer en 2006 et 2007 (Grossel, 2007 et Grossel, 2009). Depuis 2014, les analystes du REPHY participent à la CIL internationale organisée tous les ans par le Marine Institute Phytoplankton unit de Galway (Irlande), en collaboration avec le Centre UNESCO du CIO pour la Science et la communication sur les algues nuisibles (Danemark) et sous couvert du NMBAQC-BEQUALM (NE Atlantic Marine Biological Analytical Quality Control Scheme-Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes). Le but de cet exercice international est de comparer les performances en identification et en dénombrement du phytoplancton marin^{3,4} des laboratoires engagés dans les programmes nationaux officiels de surveillance du phytoplancton, dans la DCE et dans la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) ainsi que d'autres laboratoires (organismes environnementaux,

¹ Devenu le Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer (MEEM)

² http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?sessionId=2830E766BCD5E08DFD9FFEEA052769F1.tpdila19v_1?cidTexte=JORFTEXT000024767945&dateTexte=20150512.

³ <http://www.bequalm.org/community.htm>

⁴ <http://www.nmbaqcs.org/scheme-components/phytoplankton.aspx>

consultants, entreprises privées) travaillant dans l'analyse du phytoplancton marin. A l'issue de cet essai, chaque analyste reçoit un certificat de performance. Ce document est important pour alimenter le dossier de compétence personnel de chaque analyste et, satisfaire aux exigences relatives à la qualification du personnel, requises dans la norme NF EN 15972. Onze analystes Ifremer ont été inscrits en 2015 pour participer à la CIL réalisé par le Marine Institute de Galway (ICN-BEQUALM).

Les échantillons envoyés aux laboratoires des analystes concernés ont été utilisés pour évaluer également les compétences des analystes non-inscrits à l'ICN-BEQUALM, mais réalisant des analyses de phytoplancton dans ces mêmes laboratoires dans le cadre du REPHY. Cet EIA complémentaire a pour objectif de permettre aux analystes des laboratoires du dispositif du REPHY de situer leurs estimations vis-à-vis des résultats obtenus par l'ensemble des analystes de ce réseau. Dans le cas d'une discordance significative des résultats, les analystes concernés devront mener une réflexion en vue de l'optimisation de leurs pratiques ou l'approfondissement de leurs connaissances taxinomiques. Cet exercice s'inscrit aussi dans la démarche de labellisation du REPHY qui impose également l'évaluation des performances des observateurs et leur habilitation.

Ce rapport décrit le déroulement de l'ICN-BEQUALM et de l'essai complémentaire concernant les analystes de l'Ifremer. Il présente les résultats obtenus pour « l'essai Ifremer » seulement. Une analyse des limites du protocole de l'essai est réalisée et des axes d'amélioration sont proposés. Les résultats des évaluations individuelles des participants sont discutés. Chaque participant devra tenir compte de sa propre évaluation pour mettre en œuvre les actions requises le cas échéant.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 ORGANISATION

En 2015, 11 des 28 analystes du dispositif du REPHY, répartis sur 11 laboratoires, ont été inscrits à l'ICN-BEQUALM et ont rendu leurs résultats selon les instructions prévues (Cf. ANNEXE II). Au total, 99 analystes de 49 laboratoires se sont inscrits à cet exercice (68 d'Europe, 18 d'Amérique du Sud, 2 d'Australie et 1 d'Asie). Les échantillons de cet essai ont été utilisés pour étendre l'exercice aux analystes du REPHY non inscrits à l'ICN-BEQUALM. Dix analystes, en plus des onze inscrits à l'ICN-BEQUALM, ont participé et ont rendu leurs résultats. Au total 21 analystes sur les 28 qui constituent le réseau d'observation du REPHY ont donc participé à cet exercice en 2015⁵.

L'exercice s'inspire de la méthodologie mise en œuvre dans le cadre de l'ICN-BEQUALM. Tous les échantillons ont été préparés par Le Marine Institut de Galway. Une préparation d'un volume suffisant pour l'essai est constituée d'un mélange de neuf espèces issues de cultures en laboratoire. Cette préparation est fixée au lugol neutre, homogénéisée, puis répartie dans les tubes qui constituent les aliquotes transmis aux laboratoires. Des tests d'homogénéité et de stabilité ont été menés sur 15 aliquotes par un laboratoire expert selon le protocole décrit dans le rapport Salas et Larsen (2015). Début juin, les participants inscrits à l'ICN-BEQUALM ont reçu :

- un colis contenant quatre aliquotes d'une eau de mer dopée avec du matériel de culture et fixée avec du Lugol neutre (3 + 1 de secours) d'un volume de 50 ml chacun, conditionnés dans des tubes en plastique Sterilin ;
- un document d'instructions (voir ANNEXE II) ;
- un formulaire de mise en forme des résultats ;
- et un formulaire valant accusé de réception, que les participants ont retourné à l'organisateur dès réception des colis.

Les participants ont réalisé une analyse microscopique sur trois aliquotes (réplicas) et ont retourné les résultats concernant la composition des taxons présents, identifiés au niveau de l'espèce ou, à défaut, du genre, ainsi que leurs abondances en nombre de cellules par litre, pour chaque taxon, dans chaque réplica. Dans le cadre de l'ICN-BEQUALM, le délai entre la réception des échantillons et le rendu des résultats est fixé à un mois maximum.

Au sein de chaque laboratoire du réseau de l'Ifremer, un analyste au minimum est inscrit à cet essai. Les autres analystes du laboratoire utilisent donc les échantillons reçus dans ce cadre. Le volume de chaque aliquote (50 ml) permet la mise en décantation en cuve de deux sous échantillons. Dans un même laboratoire. Les volumes des cuves utilisées, la date de mise à décanter ainsi que la date d'analyse sont renseignés dans la fiche de rendu des résultats. Pour les participants à l'essai complémentaire, un délai plus large a été accordé, avec une date limite de rendu des résultats fixée à fin octobre, c'est-à-dire 5 mois après la réception des colis. Le traitement des résultats a été fait de manière anonyme. Pour cela, un code a été attribué à chaque analyste. Chaque analyste connaît son propre code et seul l'organisateur connaît l'ensemble des correspondances analyste/code. A l'issue du traitement des résultats, chaque analyse tient compte de son évaluation pour mettre en œuvre les actions requises le cas échéant.

2.2 PRISE EN COMPTE DES RESULTATS

Les résultats des tests d'homogénéité et de stabilité menés par le Marine Institut ont montré que les organismes *Paralia sulcata* et *Asterionellopsis glacialis* ne peuvent finalement pas être inclus dans l'analyse statistique. Lors du dopage des échantillons, les chaînes de *P. sulcata* s'étant agglutinées et piégées dans une sorte de mucilage, une bonne homogénéisation n'a pas été possible causant de grandes différences entre les échantillons. Le problème concernant *A. glacialis* est différent. Les chaînes spiralées que forme cette diatomée se sont brisées en cellules individuelles lors de l'homogénéisation et la morphologie des cellules s'est avérée modifiée, causant des difficultés d'identification. Par conséquent, le Marine Institut a décidé que ces deux espèces ne seraient pas incluses dans l'analyse des données pour

⁵ Un analyste en congés longue durée, un départ à la retraite et cinq ont arrêté l'activité d'analyse du phytoplancton pour d'autres tâches.

l'essai. Les résultats obtenus pour *A. glacialis* ont également été écartés dans l'étude présentée ici. Les résultats concernant *P.sulcata* ont semblé *a posteriori* exploitables. En conséquence, ils ont été conservés et inclus au traitement au niveau de l'EIA national.

Concernant l'essai mené avec les analystes Ifremer non inscrits à l'ICN-BEQUALM, trois d'entre eux ont signalé *a priori*, un problème flagrant de conservation des échantillons. Il s'agit des analystes 94, 98 et 99. Pour cette raison, les résultats des analystes 98 et 99 sont pris en compte dans l'évaluation qualitative, c'est-à-dire leur capacité à reconnaître les taxons, mais ne sont pas pris en compte dans l'évaluation quantitative. En revanche, les résultats de l'analyste 94 ont toutefois été aussi pris en compte aussi dans l'évaluation quantitative car ils restent exploitables et apportent des éléments déterminants des axes d'amélioration.

2.3 INTERPRETATION STATISTIQUE DES RESULTATS QUANTITATIFS

L'analyse statistique des résultats s'appuie sur la norme ISO 13528:2005, relative aux « Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons inter-laboratoires ». La statistique de performance utilisée pour comparer les résultats des 19 analystes retenus pour le traitement (cf. sections 3.1 et 3.2) et calculée pour chaque espèce phytoplanctonique est le z score :

$$z_{s,a} = \frac{x_{s,a} - X_s}{\hat{\sigma}_s},$$

avec :

- $z_{s,a}$ le z score de l'analyste *a* pour l'espèce *s* ;
- $x_{s,a}$ le résultat de l'analyste *a* pour l'espèce *s* ;
- X_s la valeur assignée à *x* pour l'espèce *s* ;
- $\hat{\sigma}_s$ l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude (*i.e.* « la mesure de dispersion utilisée dans l'évaluation de l'aptitude et basée sur l'information disponible », ISO 13528:2005) pour l'espèce *s*.

La valeur assignée et l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude sont définis comme étant respectivement la moyenne et l'écart-type « robustes » des résultats des analystes pour chaque espèce phytoplanctonique. Les valeurs pour ces deux grandeurs sont calculées par la mise en œuvre de l'algorithme A décrit dans l'annexe C.1 de la norme. L'interprétation des résultats se fait de la manière suivante :

- le z score donne un « signal d'action » si sa valeur est inférieure à -3 ou supérieure à 3 (limites de contrôle) ;
- le z score donne un « signal d'avertissement » si sa valeur est inférieure à -2 ou supérieure à 2 (limites de tolérance).

Pour un analyste, la présence d'un « signal d'action » dans un cycle d'essais ou de deux « signaux d'avertissement » dans deux cycles successifs prouve l'existence d'une anomalie nécessitant des recherches pour comprendre et résoudre la source de l'anomalie. La justification de cette interprétation, c'est-à-dire des seuils ± 2 et ± 3 , repose sur l'hypothèse d'une distribution normale des valeurs *x*, ce qui n'est pas le cas des données de comptage de flores phytoplanctoniques. En revanche, elles sont supposées être distribuées selon une loi Log-Normale. Une transformation logarithmique de base 10 a donc été appliquée aux données brutes de comptage, pour les trois répliques, afin de satisfaire à l'hypothèse de normalité. Les valeurs de références X et $\hat{\sigma}$ ainsi que les scores *z* ont été calculés à partir de la moyenne, sur les trois répliques, des données transformées.

3. RESULTATS

3.1 STRATEGIE DE COMPTAGE DES OPERATEURS

Le tableau suivant résume les conditions analytiques en détaillant les délais des comptages et les volumes des cuves utilisées par chaque analyste.

Code labo	Code analyste	1 ^{er} réplica					2 ^{ème} réplica					3 ^{ème} réplica				
		Volume cuve (ml)	Date décantation	Date analyse	Délai analyse	Délai décant/anal	Volume cuve (ml)	Date décantation	Date analyse	Délai analyse	Délai décant/anal	Volume cuve (ml)	Date décantation	Date analyse	Date analyse	Délai décant/anal
A	9	20	08/06/2015	10/06/2015	9	2	20	08/06/2015	10/06/2015	9	2	20	08/06/2015	10/06/2015	9	2
A	92	20	08/06/2015	25/09/2015	114	107	10	08/06/2015	24/09/2015	113	106	20	08/06/2015	24/09/2015	113	106
B	67	25	23/06/2015	24/06/2015	23	1	25	23/06/2015	24/06/2015	23	1	25	23/06/2015	24/06/2015	23	1
C	85	25	16/06/2015	18/06/2015	17	2	25	23/06/2015	24/06/2015	23	1	25	25/06/2015	26/06/2015	25	1
C	99	25	17/08/2015	18/08/2015	77	1	25	18/08/2015	19/08/2015	78	1	25	19/08/2015	20/08/2015	79	1
D	66	10	16/06/2015	19/06/2015	18	3	10	16/06/2015	19/06/2015	18	3	10	15/06/2015	18/06/2015	17	3
D	98	10	13/11/2015	16/11/2015	165	3	10	13/11/2015	16/11/2015	165	3	10	13/11/2015	16/11/2015	165	3
E	94	25	09/06/2015	26/06/2015	25	17	25	09/06/2015	16/06/2015	15	7	25	12/06/2015	23/06/2015	22	11
E	56	25	09/06/2015	10/06/2015	9	1	25	09/06/2015	11/06/2015	10	2	25	12/06/2015	15/06/2015	14	3
F	78	10	04/06/2015	10/06/2015	9	6	10	04/06/2015	11/06/2015	10	7	10	04/06/2015	12/06/2015	11	8
F	91	10	20/07/2015	21/07/2015	50	1	10	20/07/2015	21/07/2015	50	1	10	14/09/2015	15/09/2015	104	1
G	95	20	17/11/2015	18/11/2015	167	1	20	17/11/2015	18/11/2015	167	1	20	18/11/2015	19/11/2015	168	1
G	96	20	17/11/2015	18/11/2015	167	1	20	17/11/2015	18/11/2015	167	1	20	18/11/2015	19/11/2015	168	1
H	65	20	09/06/2015	11/06/2015	10	2	20	11/06/2015	12/06/2015	11	1	20	18/06/2015	19/06/2015	18	1
I	83	25	15/06/2015	16/06/2015	15	1	25	15/06/2015	16/06/2015	15	1	25	15/06/2015	18/06/2015	17	3
I	97	10	19/11/2015	24/11/2015	173	5	10	19/11/2015	26/11/2015	175	7	10	19/11/2015	26/11/2015	175	7
J	69	20	15/06/2015	16/06/2015	15	1	20	17/06/2015	18/06/2015	17	1	20	18/06/2015	19/06/2015	18	1
J	93	20	02/11/2015	03/11/2015	152	1	20	02/11/2015	03/11/2015	152	1	20	09/11/2015	10/11/2015	159	1
K	1	20	15/06/2015	17/06/2015	16	2	20	18/06/2015	19/06/2015	18	1	20	19/06/2015	22/06/2015	21	3
L	90	25	04/06/2015	12/06/2015	11	8	25	11/06/2015	15/06/2015	14	4	25	12/06/2015	16/06/2015	15	4
L	27	25	04/06/2015	05/06/2015	4	1	25	11/06/2015	12/06/2015	11	1	25	12/06/2015	15/06/2015	14	3

Tableau 1 : Déroulement des analyses par codes laboratoires et analystes (les codes des analystes ayant participé à la CIL sont en italique-gras)

Dans les instructions de l'ICN-BEQUALM (cf. ANNEXE II), il est conseillé d'utiliser des cuves d'un volume de 25 ml si possible, afin de diminuer au mieux l'incertitude sur la mesure. Cependant, les laboratoires D et F ne disposent pas de cuves d'un volume supérieur à 10 ml.

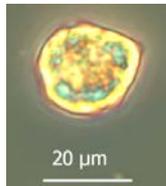
Concernant les délais d'analyse, deux durées sont à prendre en considération : (i) le délai entre la réception des échantillons et la préparation des cuves à décanter, (ii) le délai entre la préparation des cuves et l'analyse au microscope. Ces délais apportent des informations sur les causes possibles d'une éventuelle dégradation des échantillons. Les recommandations de la norme NF EN 15204 (2006) pour assurer une bonne conservation sont les suivantes : « Il convient de stocker les échantillons conservés avec la solution de lugol à l'obscurité et de les refroidir de 1°C à 5°C, à moins qu'ils soient analysés sous trois semaines, auquel cas il est possible de les stocker à température ambiante ». Dix analystes ont préparé leurs cuves dans un délai supérieur à trois semaines par rapport à la date de réception des échantillons. Et pour deux analystes le délai entre la préparation des cuves et la lecture au microscope excède une semaine. Ces faits ne préjugent pas d'une mauvaise conservation des échantillons, si dans l'intervalle, les conditions optimales de stockage ont été respectées.

3.2 RESULTATS QUALITATIFS

Composition spécifique de référence

Les échantillons comprenaient les neuf espèces suivantes :

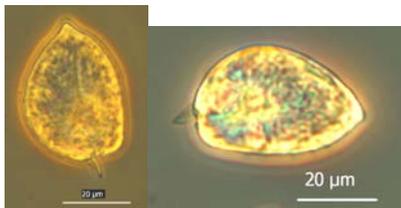
Photos prises sur les échantillons analysés



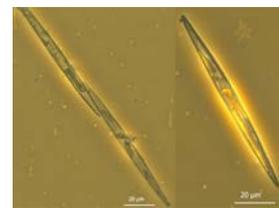
Scripsiella trochoidea (Stein) Loeblich III, 1976



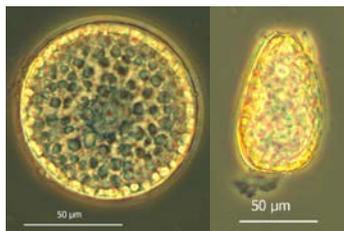
Ditylum brightwellii (T. West) Grunow, 1885



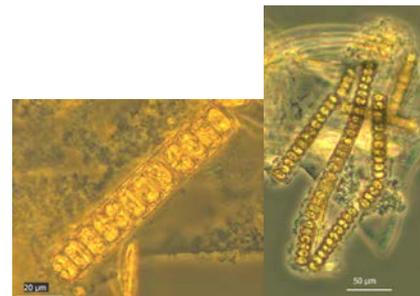
Prorocentrum micans Ehrenberg, 1834



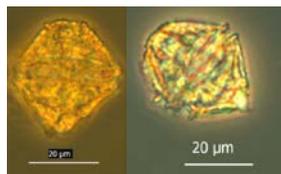
Pseudo-nitzschia australis Frenguelli, 1939



Coscinodiscus granii Gough, 1905



Paralia sulcata (Ehrenberg) Cleve, 1873

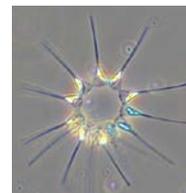


Lingulodinium polyedrum (F. Stein) J.D. Dodge, 1989

Photos non prises sur les échantillons analysés



Guinardia delicatula (Cleve) Hasle, 1997



Asterionellopsis glacialis (Castracane) Round, 1990

Figure 1 : Photos des espèces constituant la composition des échantillons

Résultats qualitatifs des analystes

Le tableau suivant présente les identifications taxinomiques de chaque analyste. Les identifications attendues sont indiquées en têtes de colonnes. La mention « NO » signifie « Non Observé », c'est-à-dire que ce taxon n'a pas été vu dans l'échantillon. La mention « NI » signifie « Non Identifié », c'est-à-dire que des cellules ont été vues mais leur état de dégradation n'a pas permis leur identification. La case est colorée en vert lorsque l'identification au niveau de l'espèce est correcte, en jaune lorsque l'identification est correcte au niveau du genre et en rouge lorsque l'identification est incorrecte au niveau du genre.

LABO	Code analyste	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	<i>Asterionellopsis glacialis</i>
A	9	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
A	92	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
B	67	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia seriata complex</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
C	85	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	<i>Asterionellopsis glacialis</i>
C	99	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
D	66	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia multiseries</i>	<i>Coscinodiscus concinnus</i>	<i>Paralia sulcata</i>	<i>Asterionellopsis glacialis</i>
D	98	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	NI	NI	NI	<i>Thalassiosira punctigera</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
E	56	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia seriata complex</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	<i>Asterionellopsis glacialis</i>
E	94	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
F	78	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
F	91	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	<i>Asterionellopsis glacialis</i>
G	95	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
G	96	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
H	65	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia seriata complex</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
I	83	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sp.</i>	NO
I	97	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
J	69	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia sp.</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sp.</i>	NO
J	93	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
K	1	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
L	27	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO
L	90	<i>Scrippsiella sp.</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Ditylum brightwellii</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>	<i>Paralia sulcata</i>	NO

Tableau 2 : Résultats qualitatifs par analyste - Taxa identifiés. (vert : identification de l'espèce et du genre, jaune identification du genre mais pas de l'espèce, rouge : mauvaise identification)

La majorité des analystes ont su reconnaître correctement les taxons au niveau de l'espèce. Respectivement 16, 2 et 1 analyste(s) se sont (s'est) arrêté(s) au niveau du genre pour *Scrippsiella*, *Paralia* et *Guinardia*.

Concernant le genre *Scrippsiella*, ce niveau d'identification est complètement justifié. En effet, en microscopie optique, il est impossible de distinguer les genres *Scrippsiella*, *Pentaparsodiniun* et *Ensiculifera* qui ne présentent pas de réelles différences. La raison pour laquelle la plupart des analystes ont identifié *Scrippsiella* est qu'il est le plus connu des trois genres. C'est pour cette raison que, dans le cadre du REPHY, les données collectées sont bancarisées sur un groupe de taxa : "*Scrippsiella* + *Pentaparsodiniun* + *Ensiculifera*".

Le genre *Paralia* renferme quelques espèces de morphologie similaire en microscopie optique. L'identification au niveau du genre reste donc raisonnable et correcte. Les analystes N° 69 et 83 ont fait le choix de s'arrêter au niveau du genre, alors que les autres analystes ont déterminé l'espèce *P. sulcata*, ce qui est compréhensible car c'est l'espèce la plus connue.

Le genre *Guinardia* renferme des espèces de morphologie très différente. L'analyste 69 aurait dû pousser l'identification de ce taxon au niveau de l'espèce *G. delicatula*, même si l'identification du genre *Guinardia* par cet analyste s'avère toutefois correcte.

Pour cinq couples (analyste, espèce), l'identification de l'espèce est incorrecte, sans que, toutefois, le genre soit erroné. Pour l'espèce *Pseudo-nitzschia australis*, les analystes n° 56, 65, et 67 ont identifié le taxon comme faisant partie de *P. seriata complex* et l'analyste 66 comme *P. multiseriis*. D'une manière générale, l'identification des espèces du genre *Pseudo-nitzschia* s'avère difficile en microscopie optique. Il faut noter que *P. australis* et *P. seriata* sont très similaires. *P. australis* fait partie du groupe dit *P. seriata complex*. Les résultats de ces quatre analystes sont donc considérés comme réellement très proches de l'identification correcte de l'espèce.

L'analyste n° 66 n'a pas été en mesure d'identifier l'espèce *Coscinodiscus granii*, néanmoins il a correctement identifié le genre. Selon le rapport BEQUALM, ce taxon est apparu le plus difficile à identifier. Notons aussi que le genre *Coscinodiscus* regroupe un très grand nombre d'espèces que l'on ne peut distinguer aisément en microscopie optique. Pour ce genre, l'identification jusque l'espèce n'est pas obligatoirement attendue dans le cadre du REPHY.

Pour cette même espèce, l'analyste n° 98 n'a pas été en mesure de fournir une identification correcte du genre. Il faut remarquer que cet analyste a émis des réserves sur ses résultats, compte tenu de l'état de dégradation des échantillons, ne permettant ni l'identification ni le dénombrement correct des cellules. Cet analyste n'a, par ailleurs, pas pu identifier les espèces *Guinardia delicatula*, *Ditylum brightwellii* et *Pseudo-nitzschia australis*.

3.3 RESULTATS QUANTITATIFS ET DISCUSSION

Les résultats des tests d'homogénéité et de stabilité réalisés par un laboratoire expert dans le cadre de l'ICN-BEQUALM sont résumés dans le tableau suivant, qui est extrait du rapport de cet EIL (Salas et Larsen, 2015).

ISO13528	F-test	Homogeneity test ISO 13528	Homogeneity Harmonized protocol	Stability test 13528	Stability harmonized protocol
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
<i>Prorocentrum micans</i>	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	Pass	Fail	Fail	Pass	Pass
<i>Lingulodinium polyedrum</i>	Pass	Pass	Fail	Pass	Pass
<i>Dytilum brightwellii</i>	Pass	Fail	Pass	Pass	Pass
<i>Coscinodiscus granii</i>	Pass	Fail	Fail	Fail	Pass
<i>Guinardia delicatula</i>	Pass	Fail	Fail	Pass	Pass

Table 1: Homogeneity and stability pass/fail test

Tableau 3 : résultats des tests d'homogénéité et de stabilité obtenus dans l'ICN-BEQUALM (extrait de Salas1 et Larsen, 2015)

Concernant l'homogénéité des taxons, trois tests ont été réalisés. Le test F est positif pour l'ensemble des taxons, ce qui n'est pas le cas pour le test ISO 13528 et le protocole harmonisé. Le test d'homogénéité selon la norme ISO 13528 est positif pour trois taxons (*S. trochoidea*, *P. micans*, *L. polyedrum*) mais ne l'est pas pour quatre taxons (*P. australis*, *D. brightwellii*, *G. delicatula* et *C. granii*), l'hypothèse d'homogénéité est rejetée pour ces taxons selon ce test. Pour deux taxons, cette conclusion est modifiée avec le protocole harmonisé. L'hypothèse d'homogénéité est rejetée pour *L. polyedrum* et elle ne l'est pas pour *D. brightwellii*. Les deux tests de stabilité réalisés sont positifs pour l'ensemble des taxons sauf pour *C. granii* pour le test 13528. Les résultats de ces tests pour les deux taxons *A. glacialis* et *P. sulcata* ne sont présentés ni dans ce tableau ni dans les annexes du rapport de l'ICN-BEQUALM.

En résumé, les résultats de ces tests permettent d'avoir des doutes sur l'homogénéité des répliques pour les taxons *P. australis*, *G. delicatula*, *C. granii* et, dans une moindre mesure, *D. brightwellii* et *L. polyedrum*, ainsi que sur la stabilité de *C. granii*. Ces conclusions doivent être prise en compte dans l'interprétation des résultats.

De plus, les organisateurs de l'ICN-BEQUALM soulignent que ces résultats suggèrent un certain niveau de biais dans la méthode de mesure du fait des participants, du laboratoire expert ou des deux. Ils précisent que cela démontre la nécessité : (i) de matériaux de référence certifiés pour étudier les causes de ce biais ; (ii) d'une étude de répétabilité pour enquêter sur la part de cette variation due aux analystes et celle due à la méthode d'analyse.

Sur l'ensemble des figures suivantes présentant les résultats quantitatifs, les codes des analystes ont été regroupés par laboratoire. Ainsi, l'ordre des analystes est conditionné par l'ordre des codes des laboratoires, qui ne correspond à aucun ordre quelconque. L'intérêt de ce rapprochement est de visualiser les résultats au sein d'un même laboratoire. Chaque participant est en mesure de se situer sur les figures et ainsi de mener une réflexion avec les autres analystes de son laboratoire.

Tous les scores z, calculés à partir des moyennes des log₁₀ des résultats obtenus par analystes et par taxon dénombré sont consultables dans un tableau en ANNEXE III et représentés sur une figure globale en ANNEXE IV.

Sur les pages suivantes, pour chaque taxon sont représentés dans la première figure, le z score de chaque analyste et, dans la seconde figure, les abondances dénombrées dans chaque réplique. Cette deuxième représentation permet d'explorer plus en détail les résultats et de décrire la répétabilité ou la fidélité des résultats par analyste et sur l'ensemble des résultats. Les figures des abondances sont réalisées à la même échelle permettant ainsi leur comparaison.

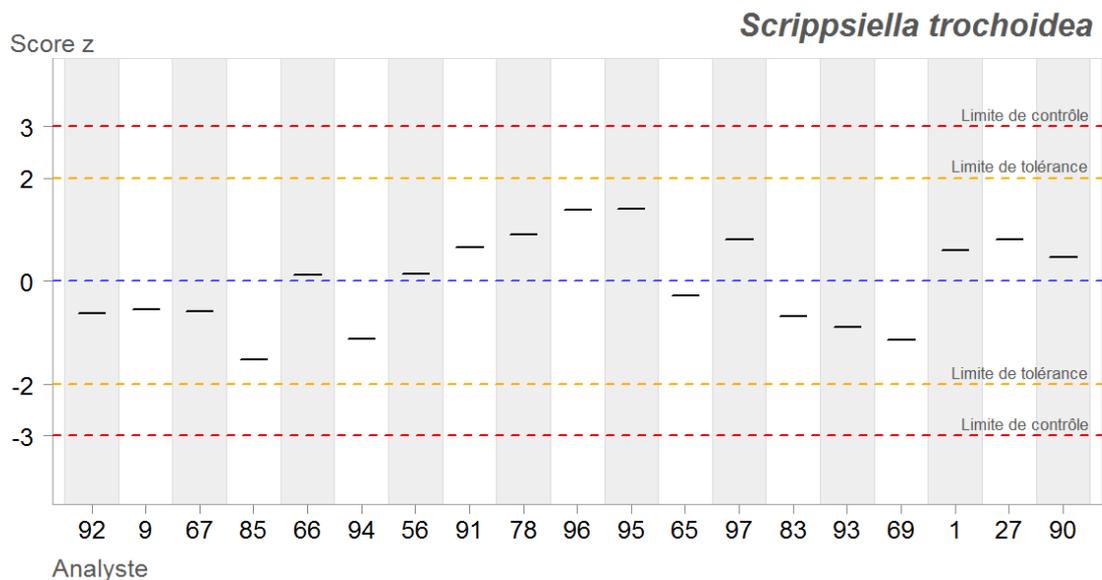


Figure 2 : Scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Scrippsiella trochoidea*.

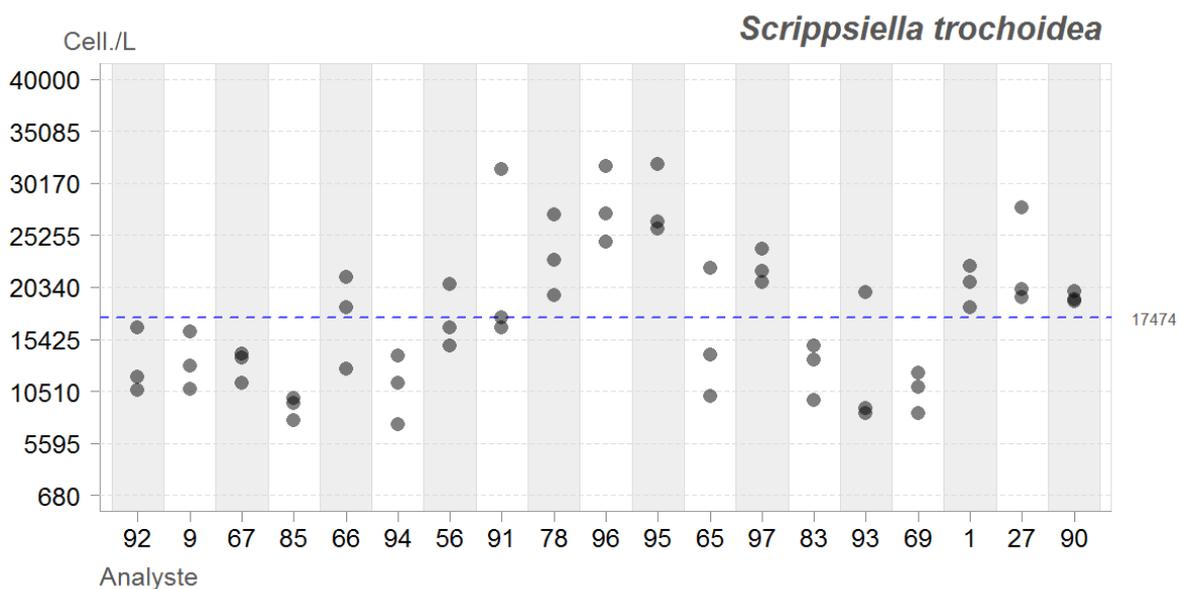


Figure 3 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Scrippsiella trochoidea*.

Tous les z scores sont compris entre les limites de tolérance, n'impliquant aucun signal d'avertissement. La répartition des résultats d'abondance s'étend de 7 400 à 31 950 cell./L. Les résultats de l'analyste 85 pour les trois répliques, faibles par rapport à la moyenne de référence (17 474 cell./L) et très resserrés, entraînent un z score (valeur : -1.53) correspondant au plus faible. De la même manière, les valeurs hautes des analystes 96 et 95 entraînent des scores z (valeurs respectives : 1.38 et 1.40) correspondant aux plus hauts. Pour les analystes 91, 93 et dans une moindre mesure 27, un résultat s'éloigne notablement des deux autres. La piste d'un problème d'homogénéité ou de conservation pour un réplica semble la plus probable.

La variabilité entre les répliques, qui s'observe de façon marquée chez les analystes 94 et 65, laissent supposer un problème d'homogénéité des répliques. Les résultats des tests d'homogénéité et de stabilité réalisés par l'organisateur n'ont pas montré d'irrégularité pour ce taxon. Les explications sur la variabilité de ces résultats sont à trouver ailleurs. Elles peuvent provenir d'une mauvaise homogénéisation lors de la préparation des cuves, d'une dégradation des cellules pendant le stockage avant analyse ou d'une erreur de l'analyste au cours de la procédure d'acquisition des résultats. Il peut toutefois être noté que cette variabilité des résultats est similaire à celle obtenue dans le cadre de l'ICN-BEQUALM, dans lequel il est également observé une mauvaise répétabilité par opérateur des dénombrements pour ce taxon.

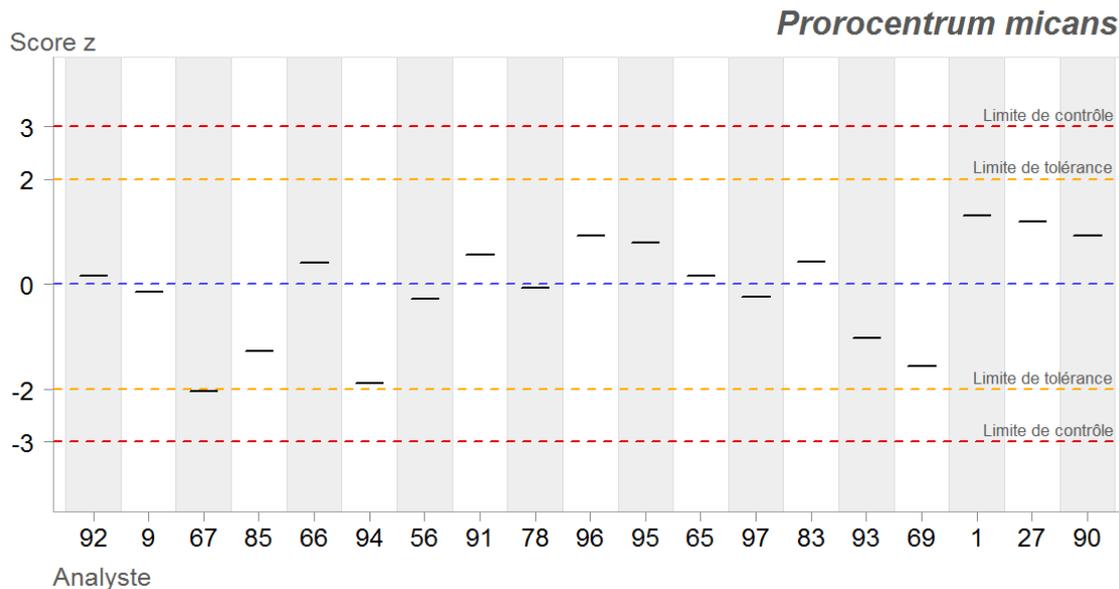


Figure 4 : Scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Prorocentrum micans*.

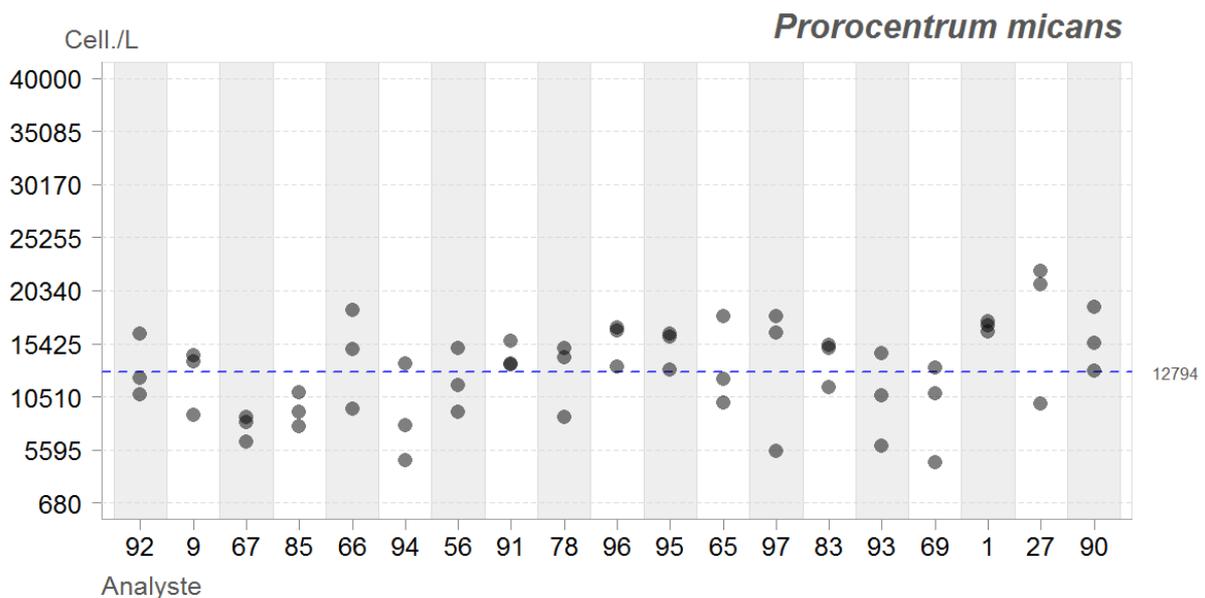


Figure 5 : Abondances des réplicas de chaque analyste pour *Prorocentrum micans*.

La majorité des scores z sont compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement, sauf pour l'analyste 67 dont le z score dépasse légèrement la limite basse (valeur : -2.04). Ce signal d'avertissement est dû à la présence de trois résultats d'abondance faibles. Tous les scores z de cet analyste sont négatifs (cf. ANNEXE III et ANNEXE IV). Les trois réplicas ont été mis à décanter 23 jours après réception des échantillons au laboratoire. Compte tenu de ce signal d'avertissement, cet analyste, devra examiner les conditions de stockage et de conservation des échantillons en attente d'analyse au sein de son laboratoire. Le z score de l'analyste 94 est très proche de cette limite basse (valeur : -1.89), avec une valeur d'abondance parmi les plus basses. Cependant, pour cet analyste une différence d'homogénéité entre les réplicas pourrait expliquer la variabilité de ses résultats. L'analyste 1 a le z score le plus haut (valeur : 1.31) et des résultats d'abondance peu variables et hauts par rapport à la moyenne de référence.

La répartition des résultats d'abondance s'étend de 4 450 à 22 160 cell./L. Les résultats d'abondance pour les analystes 94, 93, 69 et, dans une moindre mesure, 66 sont plutôt dispersés. Les valeurs extrêmes

basses sont obtenues pour un des trois réplicas des analystes 94, 97, 93 et 69. Pour les analystes 9, 97, 69 et 27, le résultat d'abondance pour un réplica est très différent des résultats obtenus pour les deux autres réplicas.

Comme pour *S. trochoidea*. Cette variabilité est similaire à celle obtenue dans le cadre de l'ICN-BEQUALM. Les tests d'homogénéité et de stabilité réalisés par l'organisateur de l'ICN-BEQUALM pour ce taxon n'ont pas montré d'anomalie.

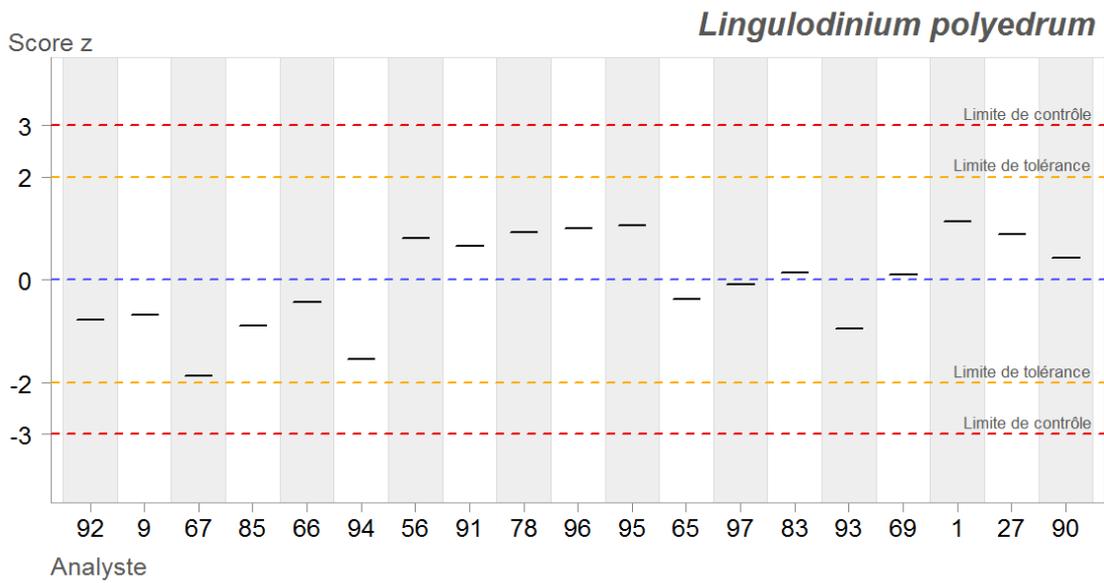


Figure 6 : Scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Lingulodinium polyedrum*.

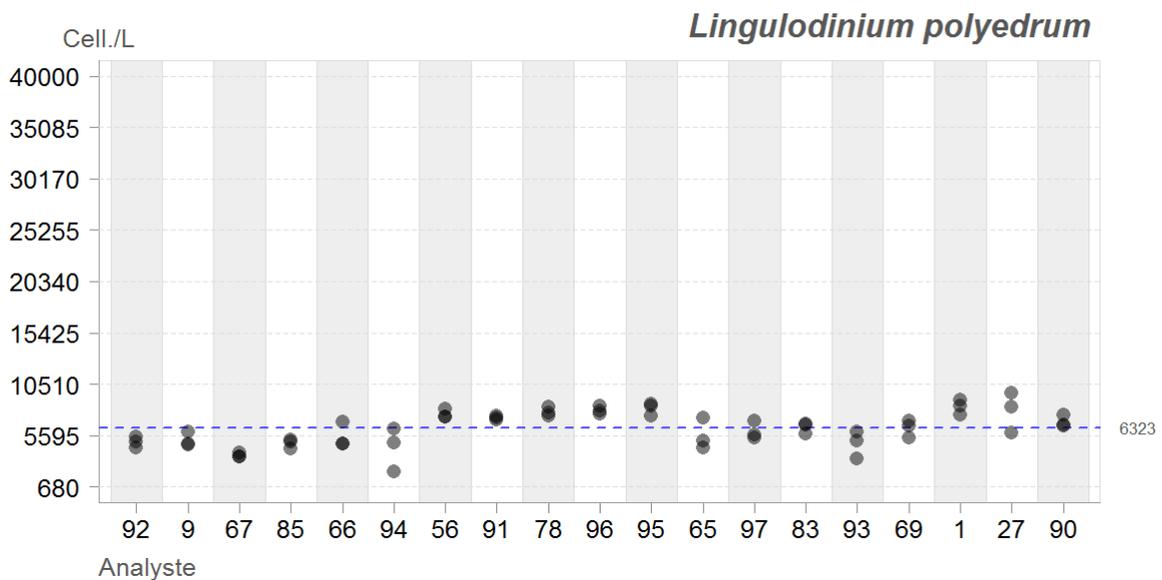


Figure 7 : Abondances des réplicas de chaque analyste pour *Lingulodinium polyedrum*.

Tous les scores-z sont compris entre les limites de tolérance, n'impliquant aucun signal d'avertissement. La répartition des résultats d'abondance s'étend de 2 120 à 9 680 cell./L. Pour la plus part des analystes, les résultats d'abondance sont assez homogène, sauf pour l'analyste 94 dont le résultat pour un réplica est éloigné des valeurs pour les deux autres réplicas. Ces résultats rendent compte d'une bonne homogénéité des réplicas pour ce taxon pour lequel les tests d'homogénéité et de stabilité réalisés par l'organisateur de l'ICN-BEQUALM n'ont pas montré d'anomalie. Le z score pour l'analyste 67 est proche de la limite basse de tolérance (valeur : -1.86). Cet analyste a trois résultats d'abondance peu variables et faibles par rapport à la valeur de référence.

Cette variabilité des résultats est similaire à celle obtenue dans le cadre de l'ICN-BEQUALM.

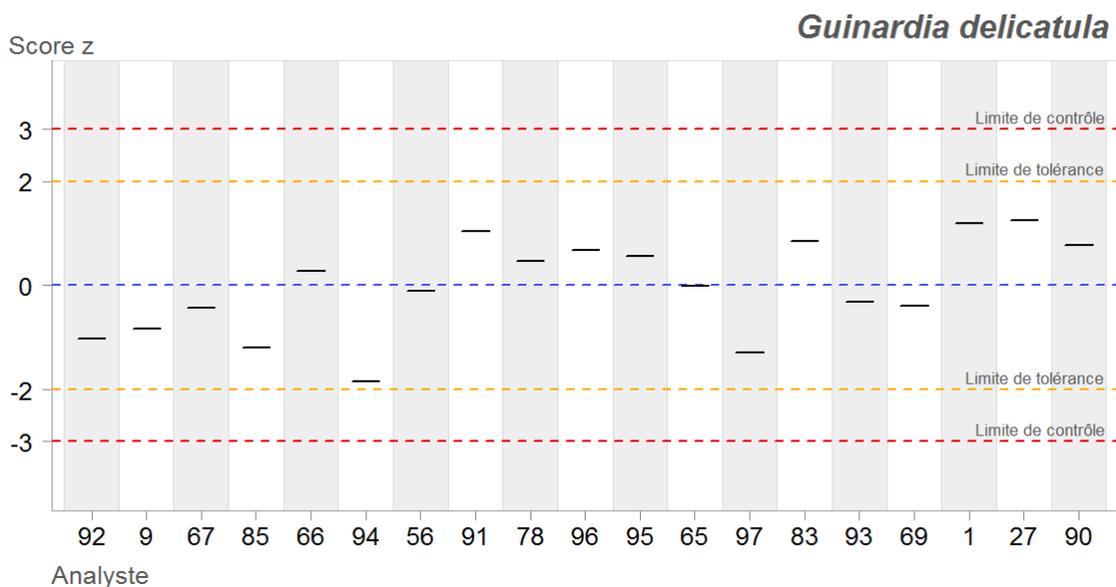


Figure 8 : Scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Guinardia delicatula*.

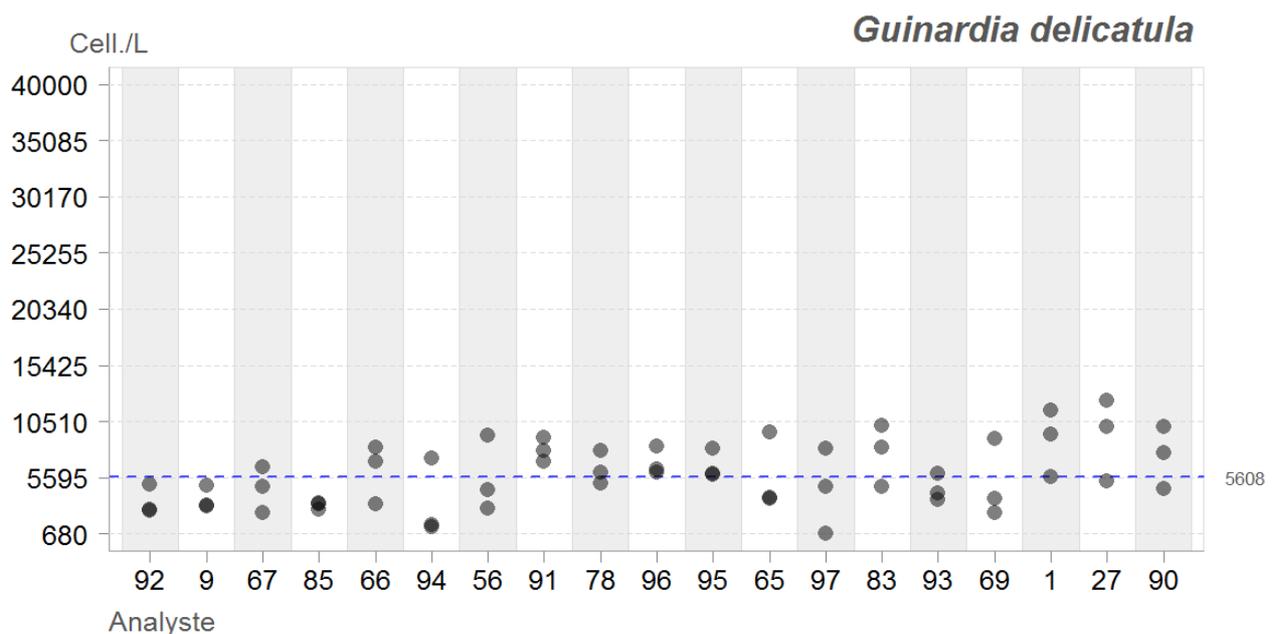


Figure 9 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Guinardia delicatula*.

Pour chaque analyste, le z score est compris entre les limites de tolérance, n'impliquant aucun signal d'avertissement. Pour l'analyste 94, le z score s'approche de la limite basse de tolérance (valeur : -1.85). Ceci est dû aux résultats anormalement bas de deux de ses répliques.

La répartition des résultats d'abondance s'étend de 700 à 12 320 cell./L. La variabilité entre les répliques semble plus importante que pour les espèces précédentes, ce qui pourrait s'expliquer par les résultats des tests d'homogénéité mis en œuvre dans le cadre de l'ICN-BEQUALM, qui mettent en doute l'homogénéité des échantillons pour ce taxon. Le résultat d'abondance pour un des répliques de l'analyste 97 correspond à la valeur minimale obtenue de 700 cell./L et est éloignée des valeurs pour les autres répliques de cet analyste.

Si on exclut la faible valeur de 700 cell./L obtenue sur un seul réplica par l'analyste 97, la variabilité des résultats est similaire à celle obtenue dans le cadre de l'ICN-BEQUALM.

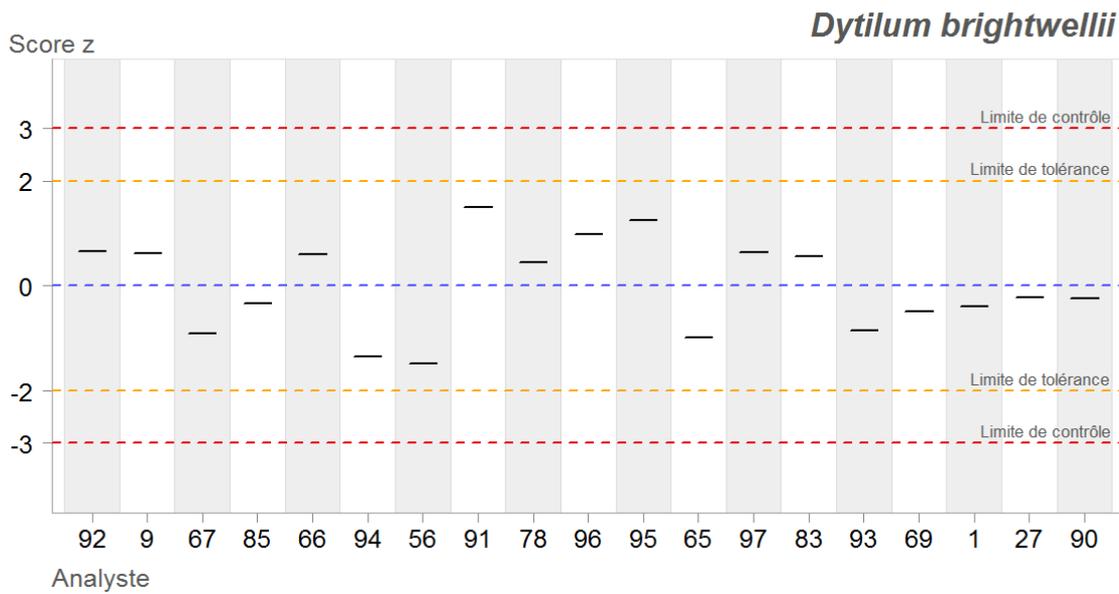


Figure 10 : Scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Dytilum brightwellii*.

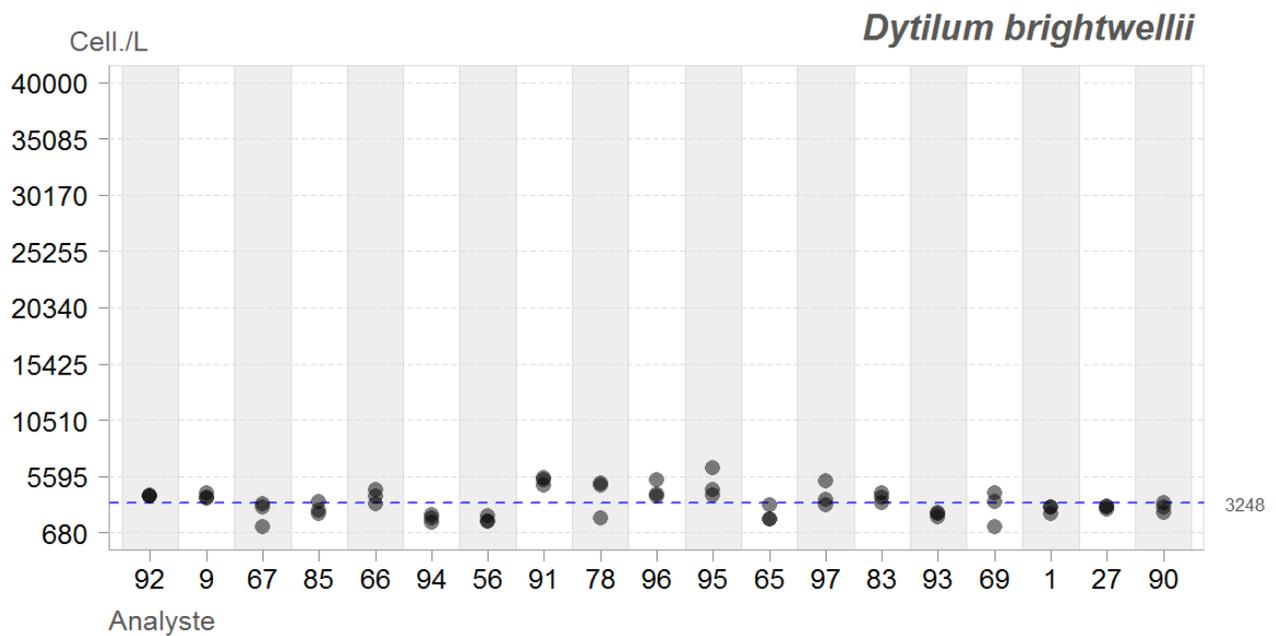


Figure 11 : Abondances des réplicas de chaque analyste pour *Dytilum brightwellii*.

Les scores z de tous les analystes sont compris dans les limites de tolérance, n'impliquant aucun signal d'avertissement. La répartition des résultats d'abondance s'étend de 1 200 à 6 350 cell./L. Comparée aux résultats obtenus dans le cadre de l'ICN-BEQUALM, cette variabilité est plus étendue. Pour la plus part des analystes, les résultats des trois réplicas sont proches sauf pour les analystes 67, 78 et 69.

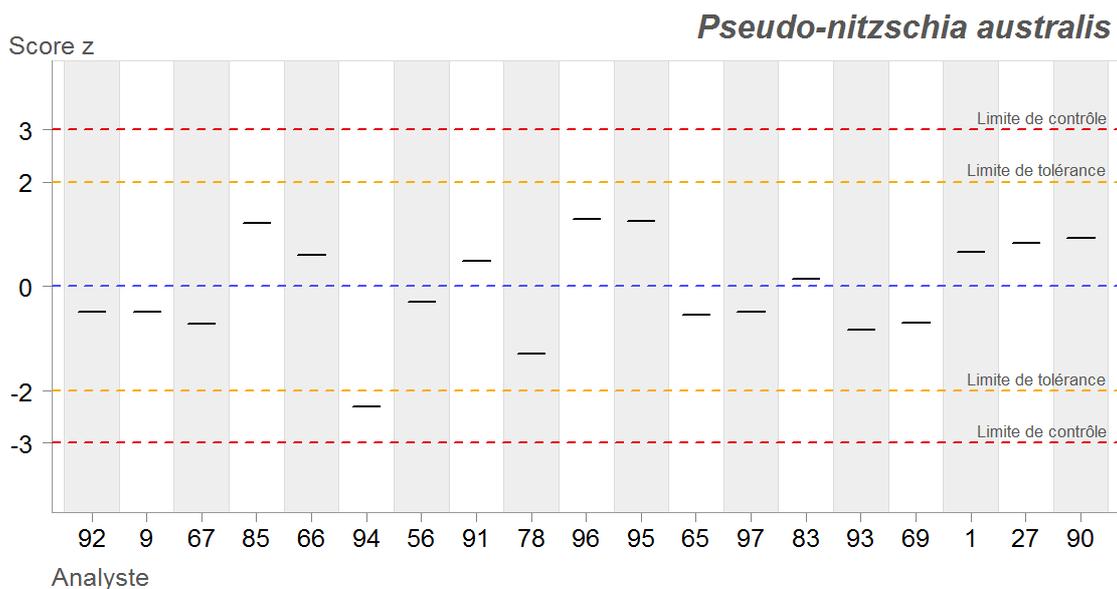


Figure 12 : Scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Pseudo-nitzschia australis*.

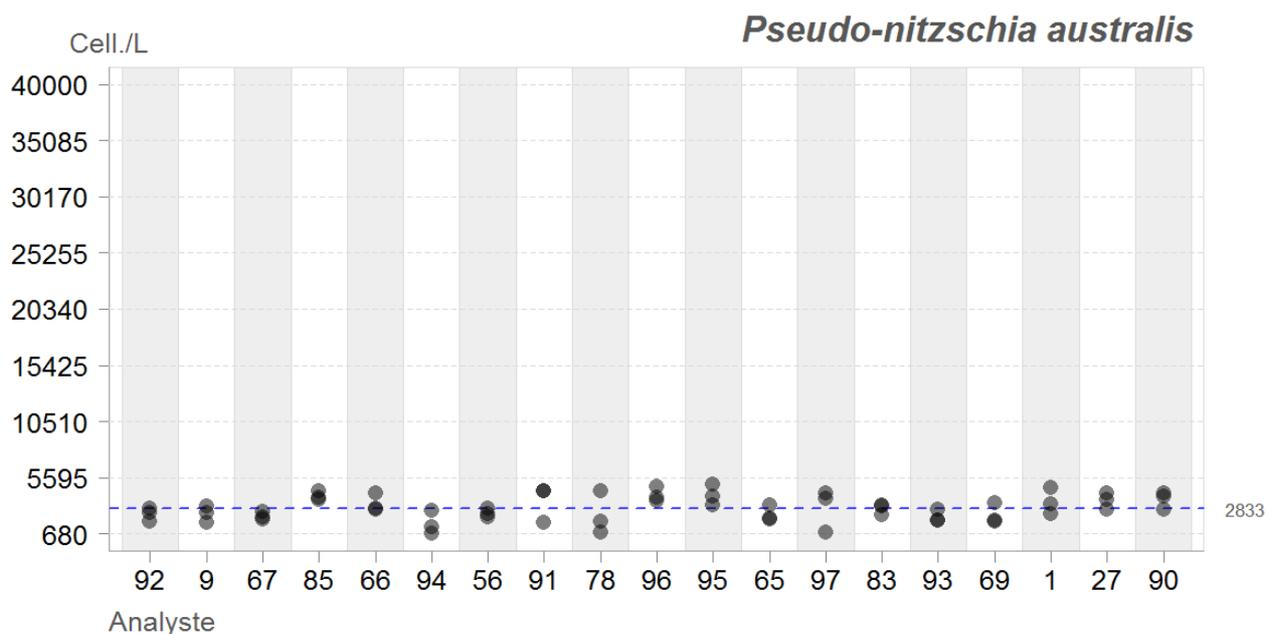


Figure 13 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Pseudo-nitzschia australis*.

Les scores z sont compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement, sauf pour l'analyste 94 dont le z score (valeur : -2.31) dépasse la limite basse de tolérance. Les résultats d'abondance pour cet analyste sont très variables et présentent deux valeurs faibles. Ces résultats sont à rapprocher des résultats de l'analyste 78, qui présente le même schéma de résultats et un z score faible (valeur : -1.29). Cependant, les résultats d'abondance, qui s'étendent de 600 à 5 000 cell./L, sont globalement plus variables que pour *S. trochoidea*, *L. polyedrum* et *D. brightwelli*, ce qui pourrait s'expliquer par une non-homogénéité des échantillons, soulignés par les tests réalisés par l'organisateur de l'ICN-BEQUALM. Une explication de la présence d'un signal d'avertissement pour l'analyste 94 pourrait également être une dégradation des échantillons. En effet, les délais présentés dans le Tableau 1 apportent quelques pistes d'explications. Concernant l'analyste 94, les délais entre la mise à décanter des échantillons et l'analyse au microscope vont de 7 à 17 jours. Dans la norme guide (NF EN 15204), il n'y a pas de consigne précise concernant les délais entre la mise en cuve à décanter et l'analyse au microscope. Néanmoins, durant cette période de sédimentation, les recommandations précisent que les cuves doivent être placées à l'obscurité et à température ambiante constante. De plus, les organisateurs de l'ICN-

BEQUALM ont précisé que la fixation des échantillons au lugol neutre était plus légère cette année que les années précédentes, mais toutefois suffisante pour le délai de rendu des résultats (quatre semaines). Les organisateurs ont ajouté que si les participants souhaitaient garder les échantillons plus longtemps, ils devaient y incorporer un peu plus de lugol.

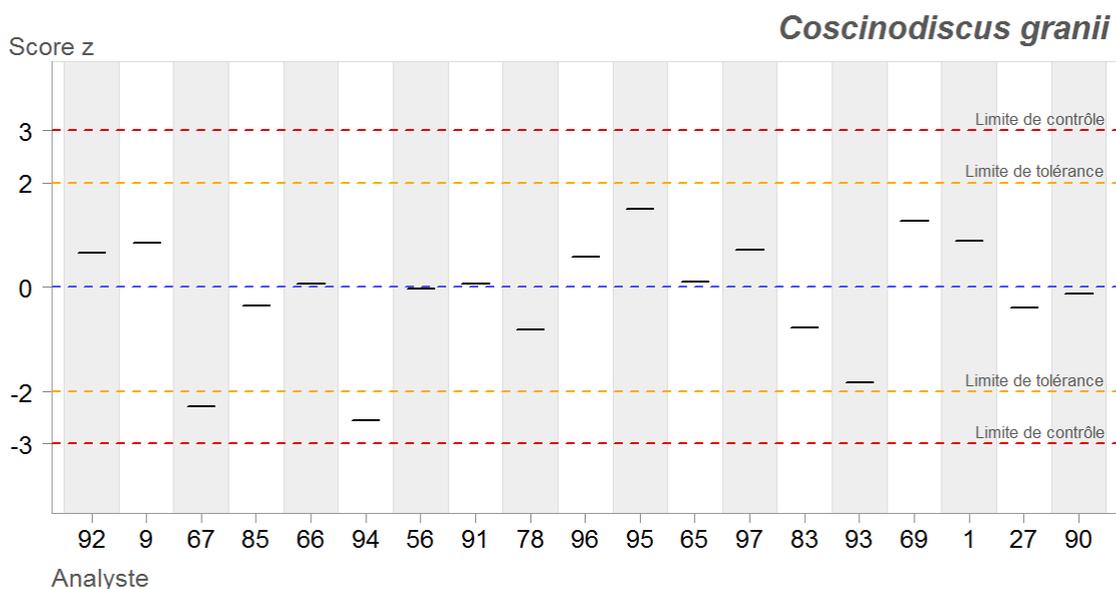


Figure 14 : Scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Coscinodiscus granii*.

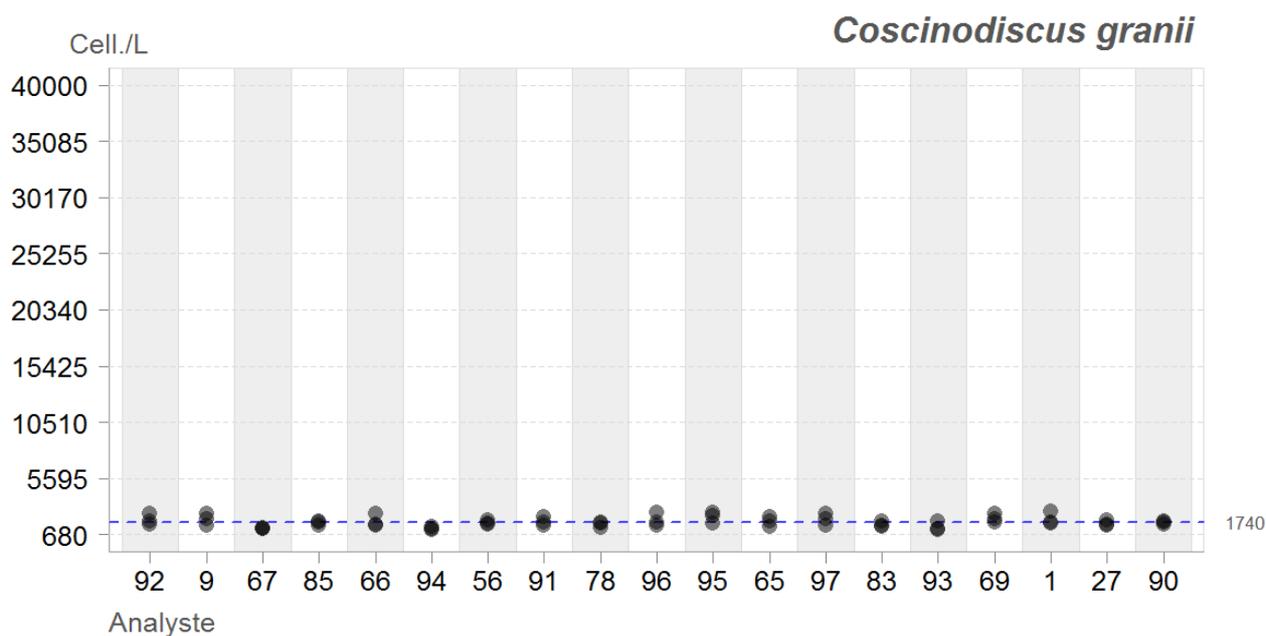


Figure 15 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Coscinodiscus granii*.

Pour ce taxon, les scores z des analystes 67 et 94 (respectivement -2.29 et -2.55) dépassent la limite basse de tolérance induisant un signal d'alerte pour ces deux analystes. Le z score de l'analyse 93 s'approche aussi de cette limite avec une valeur de - 1.819. Ces analystes devront tenir compte de ce signal d'avertissement et mener une réflexion sur les raisons imputables à ces résultats. Il est à noter que tous les scores z des analystes 67 et 94 (cf. ANNEXE III et ANNEXE IV) sont négatifs. L'ensemble de ces éléments tend à faire penser qu'une explication plausible serait une dégradation des échantillons.

La répartition des résultats d'abondance s'étend de 1 040 à 2 700 cell./L. Ce qui est similaire aux résultats obtenus dans le cadre de l'ICN-BEQUALM. La faible variabilité des résultats obtenus dans cet essai ne confirme pas les doutes résultants des tests d'homogénéité et de stabilité pour ce taxon.

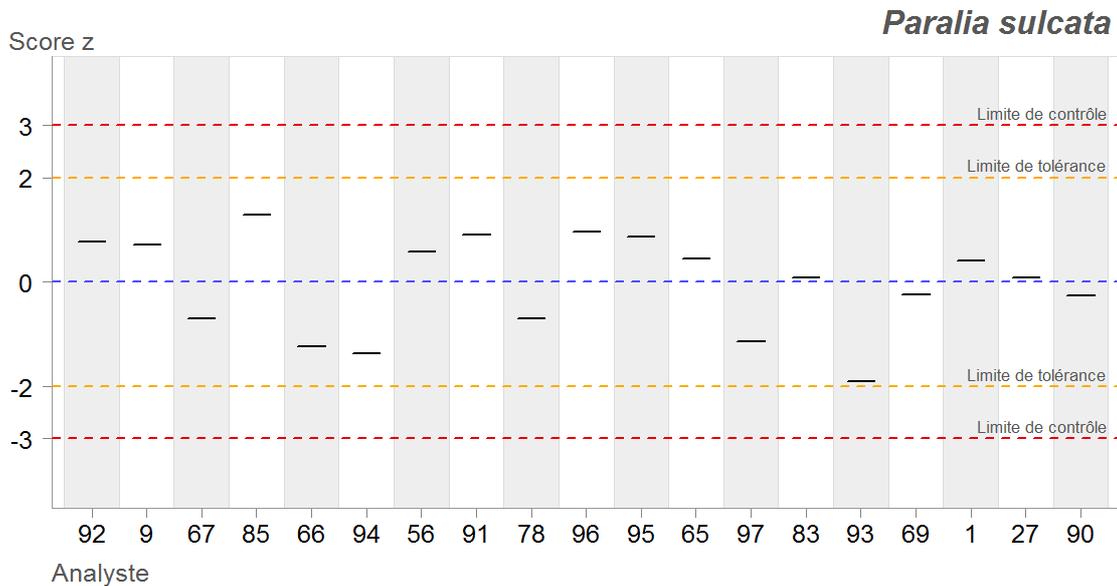


Figure 16 : Scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Paralia sulcata*.

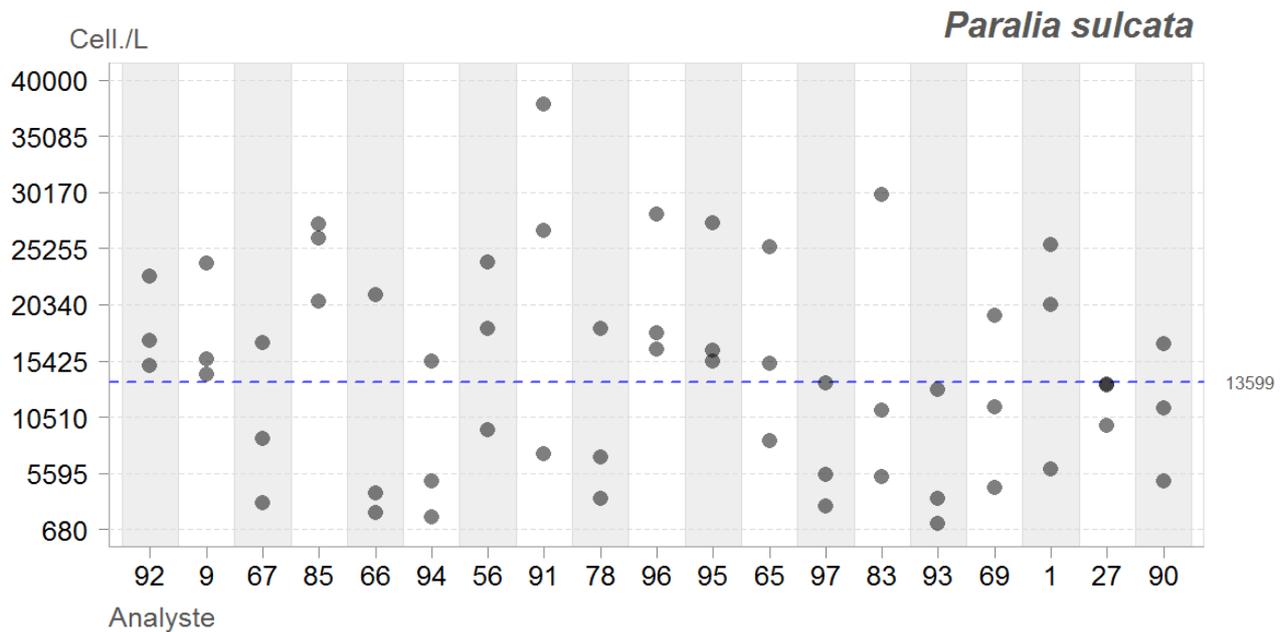


Figure 17 : Abondances des réplicas de chaque analyste pour *Paralia sulcata*.

Pour ce taxon, le z score de chaque analyste est compris entre les limites de tolérance, n'impliquant aucun signal d'avertissement. D'une manière générale, les résultats entre réplicas présentent une plus grande variabilité que pour l'ensemble des autres taxons, ce qui pourrait s'expliquer par les problèmes de mélange soulignés dans la section 2.2.

4. DISCUSSION GÉNÉRALE

Concernant l'identification des taxa, la majorité des analystes a su reconnaître correctement les taxa au niveau de l'espèce (83 % des réponses). Certains se sont arrêtés au niveau du genre pour *Scrippsiella*, *Paralia* et *Guinardia* (17 cas soit 10 %). Dans cinq cas, l'identification de l'espèce est incorrecte, sans que toutefois le genre soit erroné (3 %). Dans un seul cas, l'identification est incorrecte au niveau du genre, mais il faut noter que dans ce cas, l'analyste lui-même a émis des doutes sur ses résultats compte tenu d'une éventuelle mauvaise conservation des échantillons et c'est ce même analyste qui, pour les mêmes raisons, n'a pas pu identifier *G.delicatula*, *D.brightwellii* et *P. australis*.

Comme pour l'ICN-BEQUALM, les réponses sont évaluées au niveau du genre, ainsi nous obtenons 93% de réponses correctes. Cependant, il est demandé aux analystes de pousser l'identification au niveau de l'espèce. Cette information nous est utile, par exemple, pour identifier des sujets de sessions de formations et/ou de perfectionnement à organiser.

Par exemple, il serait utile que les analystes n° 56, 65, 66 et 67 participent à la prochaine session de perfectionnement pour l'identification des *Pseudo-nitzschia*. De telles sessions de formation sont régulièrement organisées par les experts de l'Ifremer de Concarneau et depuis peu en partenariat avec la station biologique de Roscoff.

L'analyste N° 69 s'est arrêté au niveau du genre *Guinardia* sp. Ce genre renferme des espèces de morphologies très variées. Il serait souhaitable que cet analyste perfectionne ses connaissances sur ces espèces.

Pour l'interprétation des résultats quantitatifs, les remarques soulevées dans le rapport final de l'ICN-BEQUALM ont été prises en compte. Dans celui-ci, les organisateurs décrivent les résultats des tests d'homogénéité et de stabilité qu'ils ont menés et attirent l'attention sur des difficultés de maintien de l'intégrité des espèces et d'homogénéisation, rencontrées lors de la CIL.

Malgré des méthodes de culture visant à améliorer la résistance des frustules des cellules de diatomées afin d'assurer leur préservation lors de l'homogénéisation des échantillons, il s'est avéré qu'aucune consolidation particulière n'a été obtenue. Ainsi, des cellules de *D.brightwellii* ont été brisées en deux et les chaînes d'*A.glacialis* ou *G.delicatula* ont été fractionnées, rendant leurs identifications et/ou leurs dénombrements plus difficiles.

Par ailleurs, les chaînes de *P.sulcata* se sont agglutinées ne permettant pas une homogénéisation correcte des échantillons.

Les *A.glacialis*, en plus d'avoir eu leurs chaînes brisées, ont subi des déformations morphologiques causant de fortes difficultés pour les identifier. Par conséquent, *P.sulcata* et *A.glacialis* n'ont pas été inclus dans l'analyse des données par les organisateurs de l'ICN-BEQUALM.

Pour les cellules de *D.brightwellii*, pour lesquels des problèmes ont aussi été observés, *a posteriori*, les résultats des participants ont tout de même été utilisés car ils se sont révélés non affectés.

Pour les mêmes raisons, les résultats observés sur les *P. sulcata* ont été conservés dans les traitements présentés dans ce rapport. En revanche, les résultats des *A. glacialis* ont été écartés.

Par ailleurs, les résultats de ces inter-comparaisons soulèvent des doutes sur l'homogénéité des répliques pour les taxons : *P. australis*, *D. brightwellii*, *G. delicatula* et *C. granii* et sur la stabilité de *C. granii*.

Les résultats d'abondance sont globalement plus variables pour les taxons *G. delicatula*, *P. australis* et *P. sulcata*, ce qui pourrait s'expliquer par : un problème d'homogénéité pour *G. delicatula* et *P. australis* ou par un problème de maintien de l'intégrité de *G. delicatula* et de *P. sulcata*. Quatre signaux d'avertissement sont identifiés sur l'ensemble des résultats des z scores et concernent deux analystes (histogrammes jaunes, ANNEXE IV), ce qui correspond à 2,6 % des résultats traités. Deux d'entre eux concernent *C. granii*, un concerne *P. micans* et un concerne *P. australis*, ce qui pourrait être dû à un manque d'homogénéité des répliques pour les taxons *P. australis* et *C. granii* ainsi que de stabilité pour *C. granii* et/ou une éventuelle mauvaise analyse. Les z scores des deux analystes concernés, c'est-à-dire les analystes 67 et 94, sont négatifs pour l'ensemble des espèces. Ces analystes qui ne font pas partie du même laboratoire, doivent donc mener une réflexion sur la manière dont ils mettent en œuvre le protocole d'analyse, notamment sur les conditions de stockage des échantillons. Aucun résultat ne donne lieu à un signal d'action. Dans les résultats de l'ICN-BEQUALM, moins d'1 % de signal d'action et 3 % de signaux d'avertissement sont identifiés pour l'ensemble des participants. Un seul signal d'avertissement concerne un analyste du réseau REPHY, l'analyste 67, pour lequel deux signaux d'avertissement sont observés dans le cadre de l'EIA complémentaire Ifremer.

Considérant l'ICN et l'EIA, les performances démontrent un bon niveau de compétence global pour l'ensemble des participants du réseau de surveillance.

5. CONCLUSION

L'Ifremer, prévoit dorénavant de faire participer chaque année à l'ICN-BEQUALM un tiers des analystes du REPHY. Ce qui représente environ dix inscriptions par an pour un coût de 550 € par analyste/laboratoire inscrit. Ainsi, chaque analyste participera une fois tous les trois ans à cet EIL.

Parallèlement, les analystes non inscrits seront sollicités pour utiliser les échantillons reçus pour un essai qualifié alors d'EIA (essai inter-analystes interne à l'Ifremer). Ces résultats feront l'objet d'un rapport dont l'objectif est d'apporter des éléments à l'ensemble du personnel du REPHY afin d'alimenter une amélioration continue et de déterminer des actions à mettre en œuvre, afin de corriger d'éventuelles dérives.

L'extension de l'exercice à l'ensemble des analystes du REPHY, utilisant le matériel reçu par les candidats à l'ICN-BEQUALM a été mise en œuvre pour la première fois en 2015. Elle a l'avantage pour l'Ifremer de s'affranchir de la partie préparatoire des échantillons à analyser ainsi que de la réalisation des tests d'homogénéité et de stabilité. En effet, cette partie est coûteuse et nécessite des compétences reconnues. Les résultats des évaluations obtenus revêtent ainsi un caractère certifié lorsque que les essais sont menés par un laboratoire accrédité. Sous couvert du BEQUALM (The Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes), le Marine Institut de Galway apporte cette assurance.

L'analyse des résultats des dénombrements obtenus cette année permet principalement de mettre en évidence l'importance de la bonne application des protocoles et des instructions. En effet, dans certains cas, la dégradation des échantillons, qui n'a pas permis à certains analystes de produire des résultats exploitables, met l'accent sur l'importance de la maîtrise de la préservation des échantillons. Cette dernière, repose sur les conditions ambiantes de stockage, sur les délais d'analyse et sur le traitement de préparation à l'analyse (homogénéisation, mise en cuve). Les recommandations inscrites dans les documents de prescription du REPHY préconisent, en routine, un délai d'un mois maximum pour réaliser ces analyses, ceci bien que la norme EN 15972 indique que les échantillons peuvent être conservés au maximum douze mois, à condition de maîtriser la fixation, et le stockage (température, obscurité et éventuel risque d'évaporation).

Par ailleurs le biais affectant les résultats peut provenir de la méthode d'analyse appliquée. En premier lieu, lors de la préparation des cuves à décanter, l'étape d'homogénéisation est cruciale et doit faire l'objet d'un grand soin. Globalement, toute la chaîne d'acquisition de la donnée doit être maîtrisée.

Dans le cadre de cet ICN-BEQUALM, il était recommandé d'utiliser des cuves à décanter d'un volume de 25 ml. Il s'est avéré que certains laboratoires ne disposent pas de ce matériel. Ces laboratoires doivent donc envisager de s'équiper.

Concernant les compétences en terme d'identification des taxa, les résultats reçus montrent que les analystes sont hautement qualifiés dans l'identification du phytoplancton marin et démontrent qu'il existe un consensus parmi les analystes sur la majorité des identifications des espèces présentes dans les échantillons de cet essai. Ce sont également les conclusions exprimées dans le rapport d'ICN-BEQUALM.

Néanmoins quelques imperfections dans l'identification des espèces de *Pseudo-nitzschia* sont à noter pour quatre analystes et de *Guinardia* pour un analyste, qui ont toutefois correctement identifié le genre. Pour ces analystes, des formations ciblées sur ces genres sont à envisager.

Les genres *Paralia* et *Coscinodiscus* renferment des espèces qui ne peuvent être distinguées aisément en microscopie optique. L'identification au niveau du genre reste donc raisonnable et correcte. Pour ces genres, l'identification jusque l'espèce n'est pas obligatoirement attendue dans le cadre du REPHY.

Ces différents exercices (ICN et EIA) menés apportent souvent des éléments complémentaires découlant sur la mise en œuvre d'actions d'amélioration variées (formations ciblées sur certains taxa, améliorations des équipements comme prise de vue numérique par exemple, métrologie...). Ils s'intègrent dans la démarche qualité, et devront, avec leur pérennisation, attester des bonnes pratiques et de leur optimisation.

Grossel Hubert (2007). Essai interlaboratoires pour le dénombrement phytoplanctonique par la méthode d'Utermöhl.

Grossel Hubert (2009). Essai interlaboratoires pour le dénombrement et la taxinomie du phytoplancton marin - Convention 2009 - Action 1. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00019/12979/>

Neaud-Masson Nadine (2015). Observation et dénombrement du phytoplancton marin par microscopie optique photonique - Spécifications techniques et méthodologiques appliquées au REPHY. Document de méthode. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00292/40293/>

ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires. First édition 2005-09-01

Rafael Salas & Jacob Larsen (2015). PHY-ICN-15-MI1 VR 1.0. BEQUALM Phytoplankton proficiency test in the abundance and composition of marine microalgae 2015 report. <http://www.nmbaqcs.org/media/1613/phy-icn-15-mi1-final-report-vr1.pdf>

NF EN 15204 (2006), Qualité de l'eau - Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode d'Utermöhl). Décembre 2006.

NF EN 15972 (2011), Qualité de l'eau - Guide pour l'étude qualitative et quantitative du phytoplancton marin. Décembre 2011.



Marine Institute-IOC- BEQUALM-NMBAQC Phytoplankton Proficiency Test
PHY-ICN-15-MI1 Vr1.0
Instructions

Please note that these instructions are designed strictly for use in this Intercomparison only.

1. Introduction
2. Preliminary checks, deadlines and use of forms
3. Test method
4. Equipment
5. Sedimentation chambers and sample preparation
6. Counting strategy
7. Samples
8. Conversion calculations of cell counts
9. Online HABs quiz
10. Points to remember

1. Introduction

The Marine Institute, Galway, Ireland, has conducted a phytoplankton enumeration and identification ring trial, under the auspices of BEQUALM-NMBAQC annually since 2005. In 2011, the IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae and the Marine Institute initiated collaboration on the design and organization of this exercise which continues under the Marine Institute- IOC -BEQUALM-NMBAQC banner.

Information about this intercomparison exercise can be obtained in the NMBAQC website (www.nmbaqcs.org) under scheme components and Phytoplankton, you'll find information on the current timetable schedule for the exercise, the list of participants, previous reports and the workshop agenda from the previous exercises to give you an idea of the range of activities within this intercomparison exercise. There is also information on all the other Bequalm-NMBAQC schemes. Also, in the IOC website; <http://hab.ioc-unesco.org> there is information about the exercise under Activities and training courses. Registration to the exercise is through the Marine institute. You need to contact our administrator Fiona Bradley at fiona.bradley@marine.ie to register.

The purpose of this exercise is to compare the performance of laboratories engaged in national official/non-official phytoplankton monitoring programmes, water framework directive, marine strategy framework directive and other laboratories (environmental agencies, consultancies, private companies) working in the area of marine phytoplankton analysis.

The Marine Institute is accredited to the ISO 17025 standard for toxic marine phytoplankton identification and enumeration since 2005 and recognises that regular quality control assessments are crucial to ensure a high quality output of phytoplankton data.

This interlaboratory comparison exercise is conducted to determine the performance of individual laboratories on the composition and abundance of marine microalgae in preserved marine samples and to monitor the laboratories continuing performance.

Participants are asked to carry out microscopic analysis on three marine water samples spiked with cultured material and preserved with neutral lugol's iodine and return results on the composition of the samples to the highest possible taxon and the average abundance in cells per litre for each species in each sample. Each analyst will receive an envelope containing four samples (3 +1 spare) 50ml volume in plastic sterilin tubes.

Please adhere to the following instructions strictly. Please note that these instructions are specific to this ring test only.

2. Preliminary checks, deadlines and use of forms

Upon receipt of the samples, every analyst must make sure that they have received everything listed in the Return Slip and checklist form (Form 1). Make sure that all the samples are intact and sealed properly and check that you have received the enumeration and identification results log sheet (Form 2) as an Excel workbook. Please complete form 1: Return slip and checklist form and send it by fax to (+353 91 387201) or scan, pdf and send it via e-mail to rafael.salas@marine.ie . If you send the form via e-mail, please title the file as Form 1 followed by the exercise code and your full name i.e. Form 1: BEQ15 Rafael Salas A receipt of fax/e-mail is necessary for the Marine Institute to validate the test process for each analyst.

Once samples have been receipt, analysts have four weeks to complete the exercise and return the results to Rafael Salas, Marine Institute, Phytoplankton laboratory, Rinville, Oranmore, Co. Galway, Ireland by e-mail (rafael.salas@marine.ie), fax as above or post. If you decide to post your results, make sure first to make a copy of them and then send the originals to the address above. The enumeration and identification results log sheet (Form 2) must be received in the Marine Institute by Friday, July 3rd 2015.

Please note: Results received after this date will not be included in the final report. Also, if you are posting your results make sure to make a copy for your records before sending the originals. Just in case they never arrive.

An Excel workbook named 'Enumeration and identification logsheet' for you to input your results should be used to write in your results. In this form, first fill in your name,

analyst and laboratory code at the top of the form. Fill in all the information relevant to the analysis of your samples like settlement date, settlement chamber volume used in mls, analysis date and sample number in the corresponding cells. Under the column 'organism' a drop down menu will appear with a list of possible species names. You must choose from this list your answers. The list of species is a reduced list and is designed to have more entries than species are in the samples, you must choose which ones you think have been spiked in the samples and provide a count.

If is not in the list, is not in the sample. The number of rows under the name 'organism' is fourteen but this is arbitrary. It doesn't mean you need to enter fourteen names or that there are fourteen species in the samples. The number of species spiked in the samples is a fixed number but you must decide that yourselves.

In the comments box, you can write information about the test method you used if deviates from the Utermöhl test method and how you performed your calculations if you think is necessary.

Finally, if you send your form back via e-mail, please re-name in the same way as Form 1 above.

3. Test method

The Utermöhl cell counting method (Utermöhl 1931, 1958) is the standard quantitative and qualitative test method used in the Marine Institute phytoplankton national monitoring programme in Ireland. We use 25ml volume sedimentation chambers and we are accredited under the ISO 17025 quality standard.

We advise the use of 25ml sedimentation chambers for the purpose of this intercomparison exercise if these are available. If not, other sub-sample volumes and/or chambers may be used.

If a different method is used, please state all this information in your results.

4. Equipment

The following are the equipment requirements to complete this exercise:

Sedimentation chambers (25ml volume if possible).

Inverted Microscope: This should be equipped with long distance working lenses up to 40 x objective or higher and condenser of Numerical Aperture (NA) of 0.3 or similar and capable for bright field microscopy. Other types of reflected or transmitted light capabilities may be helpful depending on the type of organisms in the samples and can be used if required.

Tally counters

5. Sedimentation chambers and sample preparation

Sedimentation chambers consist of a clear plastic cylinder, a metal plate, a glass disposable cover-slip base plate and a glass cover plate (Fig 1). Three sedimentation chambers are required.

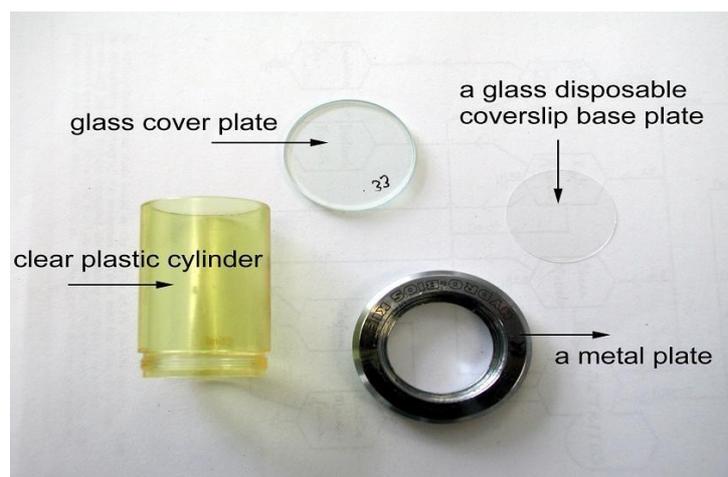


Fig 1: Sedimentation counting chamber

5.1 All sedimentation chambers should be cleaned before start

- 5.2 Place a new not used disposable cover slip base plate inside a cleaned metal plate.
- 5.3 Screw the plastic cylinder into the metal plate. Extra care should be taken when setting up chambers. Disposable cover slip base plates are fragile and break easily causing cuts and grazes.
- 5.4 Important: Once the chamber is set up, it should be tested for the possibility of leaks by filling the completed chamber with sterile filtered seawater and allowing it to rest for a few minutes. If no leakage occurs, pour out the water, dry out completely and proceed with the next step.
- 5.5 To set up a sample for analysis or sub-sample. Firmly invert the sample 100 times to ensure that the contents are homogenised properly.
 - 5.5.1 Pour the sample into the counting chamber. Samples must be adapted to room temperature beforehand to reduce the risk of air bubbles in the chambers due to temperature changes.
 - 5.5.2 There should be enough sample volume in each sample to fill a 25ml sedimentation chamber. Top up the sedimentation chamber and cover with a glass cover plate to complete the vacuum and avoid air pockets.
 - 5.5.3 Label the sedimentation chamber with the sample number from the sterilin tube.
- 5.6 Use a horizontal surface to place chambers protected from vibration and strong sunlight.
- 5.6 Allow the sample to settle for a minimum of twelve hours.
- 5.7 Set the chamber on the inverted microscope and analyse.

- 5.8 Enumeration and identification results for each sample are to be entered in the Excel workbook Form 2 enumeration and identification results log sheet.
- 5.9 If using a different method to the Utermöhl test method, please send the Standard Operating Procedure for your method with your results. Explain briefly how it works and how samples are homogenized, set up, analysed, counted and how you calculate the final concentration.

6. Counting strategy

Each analyst should carry out a whole chamber cell count (WC) of all the species identified in the samples where possible. Other counting strategies can also be used where the cell density in the sample for a particular organism is high. Show your calculations if using a field of view or transect count.

7. Samples

Analysts will have to analyse three samples to complete this test.

The set consist of four samples. Three must be analysed and one is to be used as an additional sample in case of leaks or breaks. These are made up in sterile filtered Seawater and spiked with culture material of consisting of one or several species. Participants are asked to carry out a whole sedimentation chamber cell count (where possible ; see 6.) on each organism and sample.

The cultures come from the Marine Institute Phytoplankton culture collection and the IOC Science and communication centre for Harmful Algae culture collection in Denmark. All the materials have been preserved using neutral lugol's iodine and then homogenized following the IOC Manual on Harmful Marine Algae technique of 100 times sample inversion to extract sub-samples.

Each analyst must count and identify all phytoplankton species found in the three samples.

It is very important to spend some time becoming familiar with the samples and how the cells appear on the base plate before any count is carried out. The reason for this is that cultured cells could be undergoing division or fusion and look different to the known standard vegetative cell types. See figure 1.

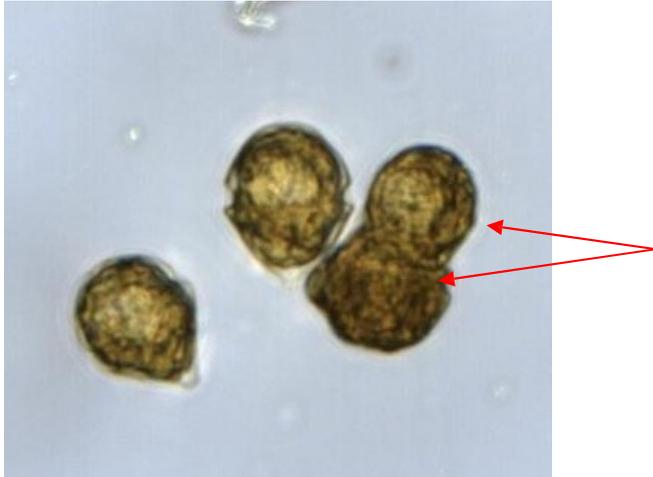


Figure 1: Two Cells fusing

Also note that cells' emptied thecae of dinoflagellates may appear in the samples (see figure 2), or silica frustules in diatoms.

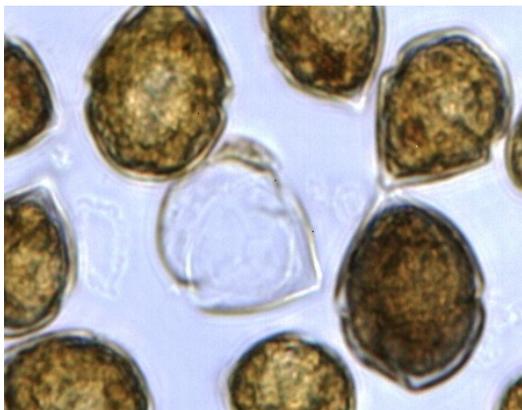


Figure 2: Empty theca

Cells may also vary in size, some cells will appear smaller than others, this is normal in culture conditions (see figure 3). Sometimes Plasmolysis may occur and the cells appear naked and rounded (see figure 4). Aberration of cell morphology can occur also in culture conditions and upon preservation of samples with lugol's iodine.

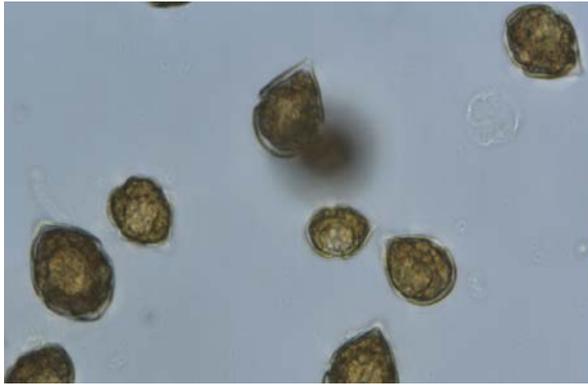


Figure 3: Big versus small cells



Figure 4: Plasmolysed cell

When counting cell chains, only count fully intact and divided cells, counting half cells should be avoided (fig.5).



Figure 5

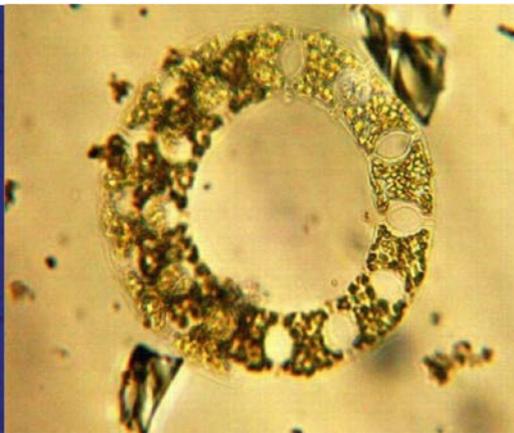


Figure 6

Sometimes cells may not be in the same focus plane (fig.6) but you still need to count them.

The following rules should be applied for cell counting and identifying in this exercise:

- a) Empty theca/ silica frustules should not be counted.
- b) Cells should be counted regardless of size, different sizes doesn't necessarily mean different species
- c) Plasmolysed cells should not be counted

e) When counting cell chains, do not count half or broken cells which are part of the chain

f) Identify to the highest taxonomic level possible all species in the samples

g) Participants should name phytoplankton species according to the current literature and scientific name for that species. Where species have been named using a synonym to the current name and if this synonym is still valid or recognized the answer will be accepted as correct. Use <http://www.marinespecies.org/> if in doubt.

These rules are applicable to this intercomparison exercise only.

8. Conversion calculations of cell counts

The number of cells found should be converted to cells per litre.

Please show the calculation step in Form 2: enumeration and identification results log sheet.

9. Online HABs quiz

A HAB taxonomic quiz will be developed in the web platform 'Ocean teacher' and it should be ready by the end of June 2015. All participants will need access to the internet to complete this part of the exercise. More information on when participants will be able to access this exercise will be sent to you by e-mail later on.

In order to access the exercise you need to go to the webpage <http://classroom.oceanteacher.org/> and login. Analysts which took part in the exercise in any of the last four years will already have a username and password which is still active, those using this facility for the first time need to register first.

When you go to the page <http://classroom.oceanteacher.org/> in the top right hand corner of this page, you'll see a link to login. Press login and in the next page if you already have registered in the previous four years (2011-2014), enter your username and password to access the course, if you forgot your password press the forgotten

password link. If this is your first time using this system, then go to create new account and register your details. Once you register your details we will be able to activate your account. Participants should be able to self-enrol to this exercise, so once you are registered and logged in you must supply an enrolment key to access the exercise. This key is Beq2015. We will tell you the exact date the exercise is opened.

So, how do you do access the course?, Once you are all logged in, in the main page scroll down to the bottom and under interdisciplinary courses, click courses, on the next page and under categories click Harmful Algal Bloom (HAB). The Harmful algal bloom programme Bequalm 2015 link will appear, click on it, enter your key (Beq2015) and start your quiz. Make sure you enter the right course.

Analysts will have several months to complete the exercise once it opens (dates to be decided). Only one attempt to the exercise is allowed and once the exercise is submitted analysts won't have access to it, only to review. So, make sure you review all your answers before submitting. There are a number questions and a maximum grade of 100% for a perfect score. All questions have the same score.

There are different types of questions (true/false, numerical, matching, multiple choice short answer). Please note that if you are asked for a number as the answer do not use text, use a numerical value. Also, in questions where you are asked to write the answer, please make sure that the grammar is correct. Incorrect grammar will give an incorrect answer. Please review your work carefully before submitting.

10. Points to remember

1. **All results must be the analysts' own work. Conferring with other analysts is not allowed.**
2. The Excel worksheet Form 2: Enumeration and identification results log sheet must be received by the Marine Institute, Phytoplankton unit by Friday July 3rd 2015.

ANNEXE III Résultats des analystes participants

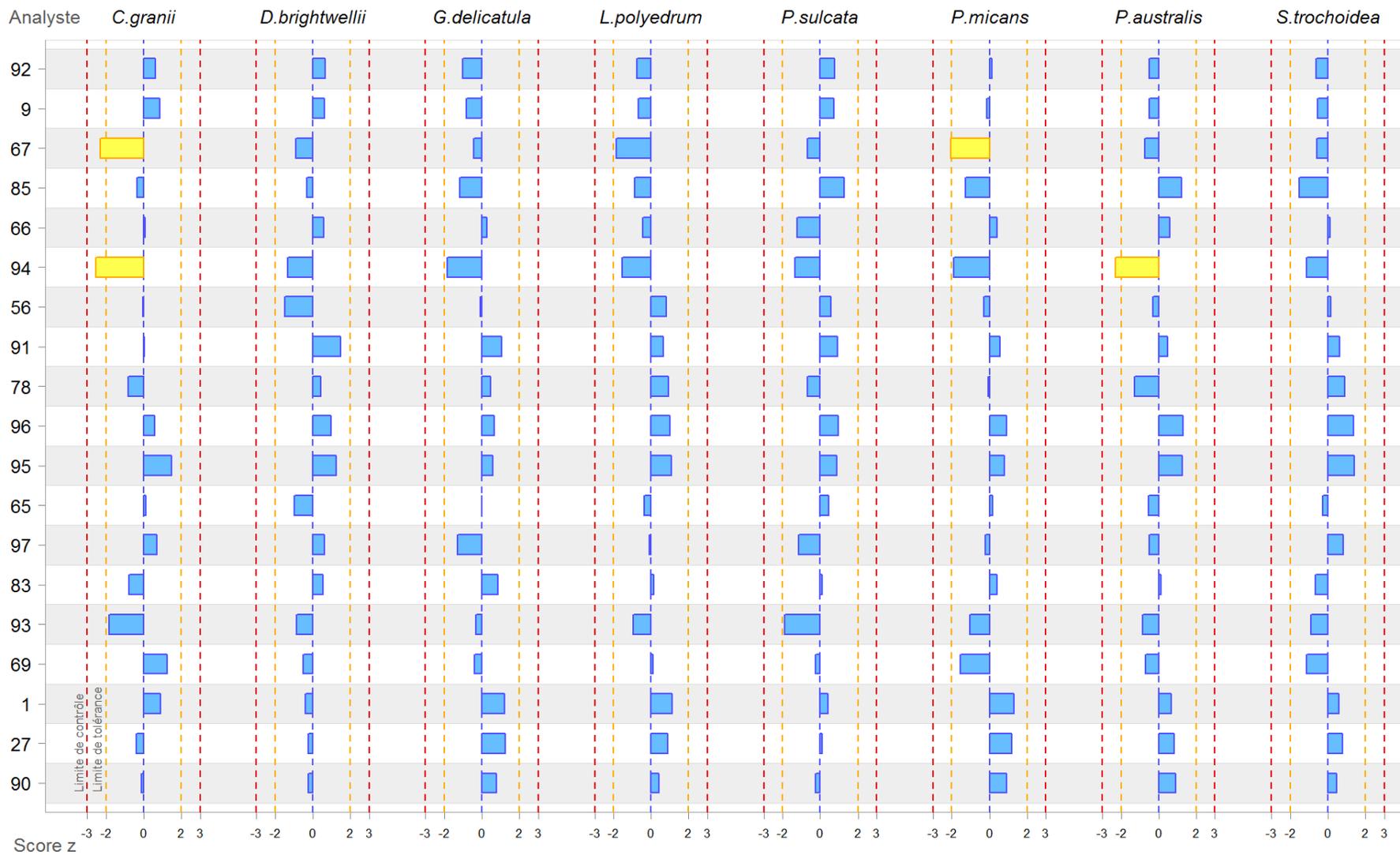
Résultats bruts de chaque réplique.

Analyst Code	<i>Scrippsiella</i> sp. (cells/L)			<i>Prorocentrum micans</i> (cells/L)			<i>Pseudo-nitzschia australis</i> (cells/L)			<i>Lingulodinium polyedrum</i> (cells/L)			<i>paralia sulcata</i> (cells/L)			<i>Dytilum Brightwellii</i> (cells/L)			<i>Coscinodiscus granii</i> (cells/L)			<i>Guinardia delicatula</i> (cells/L)			<i>Asterionellopsis gracialis</i> (cells/L)		
	Res. 1	Res. 2	Res. 3	Res. 1	Res. 2	Res. 3	Res. 1	Res. 2	Res. 3	Res. 1	Res. 2	Res. 3	Res. 1	Res. 2	Res. 3	Res. 1	Res. 2	Res. 3	Res. 1	Res. 2	Res. 3	Res. 1	Res. 2	Res. 3	Res. 1	Res. 2	Res. 3
1	20800	18450	22300	17500	16500	17050	4650	2400	3250	8450	7600	8950	5900	20300	25600	2300	2850	2850	1600	1750	2700	5600	11450	9400	NR	NR	NR
9	16150	12850	10700	13800	8750	14350	3050	2500	1650	5900	4650	4750	23950	14250	15550	4100	3700	3650	2050	1450	2500	3200	3050	4850	NR	NR	NR
27	20120	19360	27840	9800	20960	22160	2800	3600	4200	5840	8320	9680	13280	13360	9720	2840	3000	2640	1400	1560	1960	5280	10080	12320	NR	NR	NR
56	14760	20640	16560	9040	11520	15040	2120	2400	2920	7400	7320	8160	24040	9360	18240	1640	1680	2080	1960	1560	1640	4480	2880	9280	80	1320	120
65	22150	13950	10000	12150	9900	18000	1900	2000	3150	7300	5100	4450	15200	25400	8450	1800	1800	3050	1800	2200	1350	3700	3800	9600	NR	NR	NR
66	21300	18400	12600	9400	18500	14900	2900	4200	2800	4800	6900	4800	2100	3800	21200	3200	3800	4400	2500	1500	1400	3300	8200	7000	500	200	100
67	13680	11320	14000	8640	6320	8120	1880	2600	2080	3560	3920	3520	8560	3000	17000	1200	3160	2840	1200	1200	1280	2520	4760	6520	NR	NR	NR
69	12250	8400	10900	10800	4450	13150	1800	1700	3350	6550	5400	7000	11400	4350	19400	3350	1200	4150	1750	2050	2500	3750	2500	8950	NR	NR	NR
78	22900	19600	27200	8600	14100	15000	1700	4400	800	8300	7700	7500	3400	18200	7000	1900	4800	5000	1300	1700	1600	5100	7900	6000	NR	NR	NR
83	13480	14840	9640	14960	11400	15280	2320	3080	3120	6560	5760	6680	30000	5280	11080	4160	3280	3760	1360	1800	1480	10120	4760	8240	NR	NR	NR
85	7760	9360	9840	7760	9040	10920	4360	3800	3680	5160	4280	4960	27400	20600	26120	3400	2280	2560	1720	1800	1400	3240	2800	3360	280	0	0
90	18960	20000	19200	12880	18800	15480	2800	3880	4240	6480	7600	6560	16920	11280	4880	2840	3240	2360	1520	1840	1720	4560	10080	7720	NR	NR	NR
91	16500	17500	31500	13500	15700	13600	1600	4400	4400	7300	7100	7500	7300	26800	37900	4800	5300	5500	1700	2200	1400	7000	7900	9100	100	0	0
92	16500	10600	11800	12250	10700	16350	2850	2500	1750	5000	4400	5450	22850	15000	17200	3800	3800	3950	1850	1500	2450	2800	2700	5000	NR	NR	NR
93	8450	8900	19850	14500	5950	10650	1800	1800	2800	5100	3400	5950	12900	1150	3400	2300	2400	2050	1800	1200	1050	5950	3600	4250	NR	NR	NR
94	7400	13840	11240	4640	7840	13600	680	1280	2680	2120	4880	6200	4920	1760	15400	1960	1560	2200	1160	1040	1360	1240	1480	7280	0	720	0
95	25850	26500	31950	16000	16350	13000	5000	3200	3900	7450	8600	8450	16350	27500	15400	4400	6350	3900	2550	1650	2350	5800	8100	5900	NR	NR	NR
96	24650	31800	27350	16650	13250	16900	4750	3550	3850	7950	7650	8450	16450	17850	28300	4000	3850	5250	2600	1450	1750	6000	6300	8350	NR	NR	NR
97	20800	21900	24000	16400	18000	5500	800	4200	3700	5400	5600	7000	13500	5500	2700	5200	3100	3500	2500	2000	1400	8100	4800	700	NR	NR	NR

Résultats traités (moyennes des Log₁₀ de chaque réplica et z score de cette moyenne)

Analystes	Scripsiella trochoidea		Prorocentrum micans		Pseudo-nitzschia australis		Lingulodinium polyedrum		Paralia sulcata		Dytilum brightwellii		Coscinodiscus granii		Guinardia delicatula	
	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score	Moyenne des Log10	Z score
1	4.311	0.599	4.231	1.310	3.520	0.659	3.920	1.138	4.162	0.407	3.424	-0.388	3.293	0.887	3.927	1.190
9	4.115	-0.555	4.080	-0.144	3.367	-0.485	3.705	-0.671	4.242	0.717	3.581	0.626	3.290	0.849	3.558	-0.841
27	4.345	0.802	4.219	1.201	3.542	0.826	3.891	0.894	4.079	0.082	3.451	-0.215	3.211	-0.391	3.939	1.257
56	4.234	0.147	4.065	-0.285	3.391	-0.305	3.882	0.818	4.204	0.572	3.253	-1.490	3.233	-0.036	3.693	-0.100
65	4.163	-0.273	4.112	0.166	3.359	-0.539	3.740	-0.378	4.171	0.442	3.332	-0.982	3.243	0.108	3.710	-0.005
66	4.231	0.129	4.138	0.416	3.511	0.592	3.734	-0.429	3.743	-1.228	3.576	0.594	3.240	0.067	3.759	0.266
67	4.112	-0.576	3.882	-2.043	3.336	-0.715	3.564	-1.861	3.880	-0.693	3.344	-0.902	3.089	-2.285	3.631	-0.440
69	4.017	-1.140	3.934	-1.549	3.337	-0.706	3.798	0.111	3.994	-0.247	3.407	-0.493	3.318	1.271	3.641	-0.384
78	4.362	0.903	4.087	-0.077	3.259	-1.288	3.894	0.917	3.879	-0.697	3.553	0.445	3.183	-0.821	3.794	0.461
83	4.095	-0.676	4.139	0.424	3.449	0.133	3.801	0.135	4.081	0.092	3.570	0.555	3.186	-0.766	3.866	0.857
85	3.951	-1.525	3.961	-1.281	3.595	1.220	3.680	-0.883	4.390	1.293	3.433	-0.331	3.212	-0.363	3.495	-1.193
90	4.287	0.461	4.191	0.931	3.554	0.917	3.836	0.436	3.990	-0.265	3.446	-0.247	3.227	-0.129	3.850	0.767
91	4.320	0.651	4.153	0.565	3.497	0.488	3.863	0.661	4.290	0.905	3.715	1.491	3.240	0.061	3.901	1.046
92	4.105	-0.618	4.110	0.152	3.365	-0.495	3.693	-0.773	4.257	0.776	3.585	0.654	3.277	0.649	3.526	-1.021
93	4.058	-0.895	3.988	-1.028	3.319	-0.838	3.671	-0.956	3.568	-1.911	3.351	-0.856	3.119	-1.819	3.653	-0.319
94	4.020	-1.117	3.898	-1.890	3.123	-2.305	3.602	-1.535	3.708	-1.362	3.276	-1.341	3.072	-2.547	3.375	-1.851
95	4.447	1.402	4.177	0.795	3.598	1.245	3.911	1.065	4.280	0.867	3.679	1.258	3.332	1.491	3.814	0.570
96	4.444	1.385	4.191	0.923	3.604	1.288	3.904	1.002	4.307	0.970	3.636	0.979	3.273	0.581	3.833	0.674
97	4.346	0.809	4.070	-0.235	3.365	-0.498	3.775	-0.080	3.767	-1.132	3.584	0.644	3.282	0.714	3.478	-1.283
Moyenne de référence X_s	4.21		4.09		3.43		3.78		4.06		3.48		3.24		3.71	
Ecart-type de référence $\hat{\sigma}_s$	0.17		0.10		0.13		0.12		0.26		0.16		0.06		0.18	

ANNEXE IV Résumé des scores z de tous les analystes



*Responsables et analystes participants des Laboratoires
Environnement Ressources de :*

- Boulogne sur mer (LER-BL);
- Port en Bessin (LER-N);
- Dinard (LER-BN)
- Concarneau (LER-BO) ;
- La Trinité sur mer (LER-MPL/TM) ;
- Nantes (LER-MPL/NT);
- L’Houmeau/La Rochelle (LER-PC/LR);
- Arcachon (LER-AR);
- Sète (LER-LR);
- Toulon (LER-PAC/TL);
- Bastia (LER-PAC/CO)

Responsables nationaux :

- Coordinatrice du REPHY
- Responsable de l'Unité Littoral
- Directeur de Département Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes