

Essai d'aptitude par comparaison Inter-Analystes pour l'évaluation des performances en identification et dénombrement du phytoplancton marin dans le cadre du REPHY Résultats exercice 2016

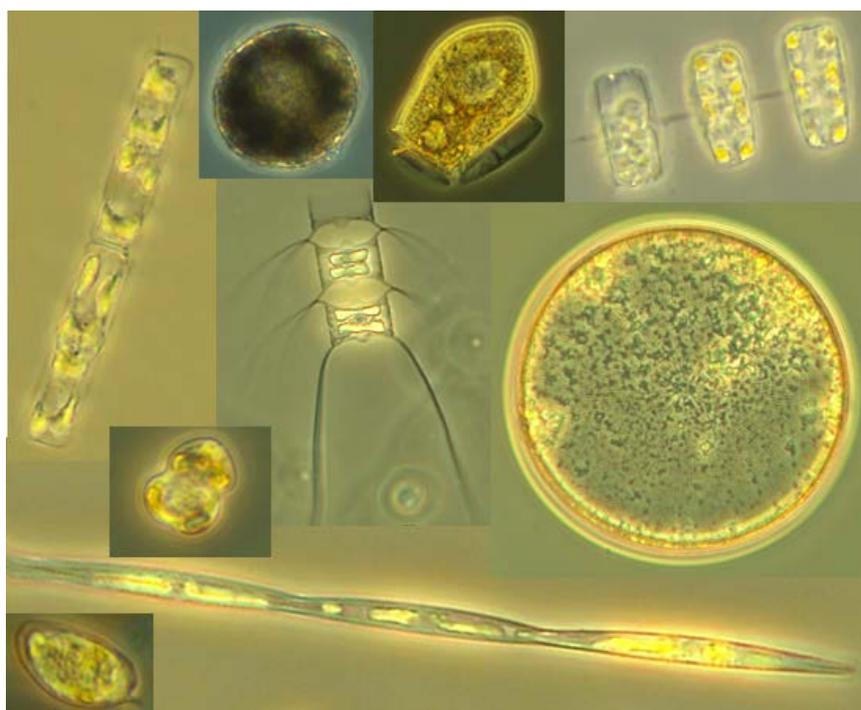


Photo Nadine Neaud-masson

SOMMAIRE

RESUME	2
1 INTRODUCTION.....	3
2 MATERIELS ET METHODES.....	4
2.1 Organisation.....	4
2.2 Prise en compte des résultats.....	5
2.3 Interprétation statistique des résultats quantitatifs	6
3 RESULTATS.....	7
3.1 Stratégie de comptage des opérateurs	7
3.2 Résultats qualitatifs.....	9
3.3 Résultats quantitatifs et discussion	18
4 DISCUSSION GÉNÉRALE	34
5 CONCLUSION.....	36
ANNEXE I BIBLIOGRAPHIE	38
ANNEXE II MARINE INSTITUTE – IPI - INTERNATIONAL PHYTOPLANKTON INTERCOMPARISON 2016 - INSTRUCTIONS	39
ANNEXE III RESULTATS DETAILLES DES ANALYSTES	49
ANNEXE IV RESUME DES Z SCORES DE TOUS LES ANALYSTES	51
ANNEXE V DIFFUSION INTERNE IFREMER DU RAPPORT.....	52

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 (IPI) est organisé tous les ans par le Marine Institute Phytoplankton unit de Galway (Irlande), 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 en 2016 sur 25 analystes, répartis dans 9 laboratoires sur 12 sites. Neuf d'entre eux ont été inscrits à titre individuel en 2016 pour participer à l'IPI. Les échantillons envoyés aux analystes concernés ont été utilisés pour évaluer aussi les compétences des analystes non-inscrits à l'IPI, mais réalisant également des analyses de phytoplancton dans ces mêmes laboratoires pour le REPHY. Au total, 23 analystes sur les 25 du REPHY ont rendu leurs résultats. L'analyse statistique des résultats s'appuie sur le calcul du score z comme mesure de performance, tel que défini dans la norme ISO 13528 :2015.

Ce rapport décrit le déroulement de l'IPI et de l'essai complémentaire Ifremer (Comparaison Inter-Analystes) 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 ce qui concerne l'identification des taxa, avec 91.3 % des résultats correctes et sept genres correctement identifiés par tous les participants sur les neuf genres présents dans les échantillons, l'essai confirme les compétences des analystes dans l'identification du phytoplancton marin. Les difficultés d'identification rencontrées lors de cet essai 2016 ont principalement concerné l'espèce *Karlodinium veneticum*, ce qui n'est pas surprenant car ce dinoflagellé de petite taille n'est pas facilement identifiable au niveau spécifique en microscopie optique.

L'analyse des résultats de dénombrement obtenus cette année a mis en évidence l'importance de la bonne application des protocoles et des instructions. Lors de cet exercice, une erreur a été constatée dans les cas où un analyste n'étant pas parvenu à identifier une espèce n'a pas réalisé son dénombrement, entraînant ainsi une absence de valeur. Dans tous les cas, l'analyste doit rendre un résultat de dénombrement de toutes les cellules observées dans chaque réplique, même s'il n'est pas en mesure d'identifier l'espèce. Il doit choisir alors l'espèce la plus probable dans la liste proposée.

Comme en 2015, la maîtrise de la préservation des échantillons qui repose en grande partie sur les conditions ambiantes de stockage et sur les délais d'analyse s'est à nouveau révélée être un point crucial.

Les différents exercices d'inter-comparaison qui ont été menés jusqu'à présent s'intègrent dans la démarche qualité, attestent des bonnes pratiques des laboratoires et apportent des pistes d'amélioration. L'Ifremer pérennise cette action en poursuivant sa participation chaque année à l'IPI organisé par le Marine Institute de Galway.

Mots clés (thématiques et géographiques) : Essai d'aptitude, Comparaison Inter-Laboratoires, ICN, Essai Inter-Analystes, CIA, 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). La mise en œuvre par l'Ifremer 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 en 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, incluant la surveillance du phytoplancton toxique qui contribue à la mise en œuvre de la surveillance des phycotoxines ;
- au Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer (MEEM), à l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA) intégré récemment à l'AFB (Agence Française pour la Biodiversité) et aux Agences de l'Eau des façades littorales (AEAP, AESN, AELB, AEAG, AERMC), pour répondre aux Directives européennes DCE (Directive Cadre sur l'Eau) et DCSMM (Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin) sur les parties relatives à la surveillance de l'élément phytoplancton et des paramètres hydrologiques dans le milieu littoral.

L'objectif principal du REPHY est la connaissance de la biomasse, de l'abondance et de la composition du phytoplancton marin des eaux côtières et lagunaires, ainsi que du contexte hydrologique afférent. Cette connaissance recouvre notamment celle de la distribution spatio-temporelle des différentes espèces phytoplanctoniques et de leur évolution, et le recensement des efflorescences exceptionnelles. L'acquisition simultanée de paramètres hydrologiques, physico-chimiques et chimiques permet de caractériser et de comprendre les processus gouvernant les écosystèmes côtiers.

En 2016, la détermination des espèces phytoplanctoniques et l'estimation de leur abondance dans le cadre du REPHY ont été réalisées par 25 analystes de l'Ifremer, répartis dans 12 sites. 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-analyses (CIA). 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)¹. Les CIL ou CIA sont utilisés pour évaluer les performances des laboratoires ou analystes sur des compétences spécifiques.

Deux CIL ont été organisées en interne à l'Ifremer en 2006 et 2007 (Grossel, 2007 et Grossel, 2009). Depuis 2014, les analystes du REPHY participent à l'International Phytoplankton Intercomparison (IPI) 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). Le but de cet exercice international est de comparer les performances en identification et en dénombrement du phytoplancton marin^{2,3} 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, 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. Neuf analystes Ifremer ont été inscrits en 2016 pour participer à l'IPI réalisé par le Marine Institute de Galway.

¹ <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000024767945>

² <http://www.bequalm.org/community.htm>

³ <http://www.nmbaqcs.org/scheme-components/phytoplankton.aspx>

Les échantillons envoyés aux laboratoires des analystes concernés ont été utilisés pour évaluer également les compétences des analystes non-inscrits à l'IPI, mais réalisant des analyses de phytoplancton dans ces mêmes laboratoires dans le cadre du REPHY. Ce CIA 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'IPI et de l'essai complémentaire concernant les analystes de l'Ifremer (CIA). 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 2016, 9 des 25 analystes du dispositif du REPHY, répartis sur 12 sites, ont été inscrits à l'IPI et ont rendu leurs résultats selon les instructions prévues (Cf. ANNEXE II). Au total, 81 analystes de 43 laboratoires se sont inscrits à cet exercice (69 d'Europe, 5 d'Amérique du Sud, 2 d'Australie, 1 de Nouvelles Zélande et 5 d'Afrique). La participation des français a représenté 12% des participants soit 11% de l'Ifremer et 1% autre (LIENSs).

Les échantillons de cet essai ont été utilisés pour étendre l'exercice aux analystes du REPHY non inscrits à l'IPI. Quatorze analystes, en plus des neuf inscrits à l'IPI, ont participé et ont rendu leurs résultats. Au total 23 analystes sur les 25 qui constituent le réseau d'observation du REPHY ont donc participé à cet exercice en 2016.

L'exercice s'inspire de la méthodologie mise en œuvre dans le cadre de l'IPI. 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 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. Les résultats des tests d'homogénéité et de stabilité menés par un laboratoire expert selon le protocole décrit dans le rapport Salas et Larsen (PHY-ICN-16-MI1 VR 1.0) sont utilisés pour interpréter les résultats du CIA. Vers le 16 juin, les participants inscrits à l'IPI 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 d'environ 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'IPI, le délai entre la réception des échantillons et le rendu des résultats est fixé à six semaines maximum (livraisons des échantillons courant semaine 24, rendu des résultats fin semaine 29).**

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 (environ 50 ml) permet la mise en décanation en cuve de deux sous échantillons. Les volumes des cuves utilisées, la date de mise à décaner 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 août, c'est-à-dire onze semaine (2 mois et demi) 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

Selon le rapport final de l'IPI, l'échantillon comprenait dix espèces : *Alexandrium ostenfeldii*, *Prorocentrum triestinum*, *Karenia selliformis*, *Karlodinium veneficum*, *Dinophysis acuta*, *Pseudo-nitzschia australis*, *Guinardia delicatula*, *Chaetoceros didymus*, *Coscinodiscus wailesii* et *Thalassiosira gravida*.

Les résultats des tests d'homogénéité et de stabilité menés par le Marine Institut ont montré que les cellules de *Karenia selliformis*, incluses à l'origine, étaient mal conservées et que les résultats concernant *Karlodinium veneficum* ne pouvaient finalement pas être utilisés pour l'analyse statistique des résultats car les dénombrements de ces cellules ne répondaient pas aux critères minimaux requis d'homogénéité.

On peut noter effectivement qu'aucun analyste n'a été en mesure d'identifier 10 espèces distinctes dans les échantillons et que la moitié des participants en a identifiés neuf. De plus aucun analyste n'a détecté la présence de *Karenia selliformis*.

Alors que le Marine institut n'a pas pris en compte les résultats pour l'espèce *Karlodinium veneficum*, il nous a paru nécessaire de conserver ces résultats dans les évaluations, d'une part, parce qu'avec une abondance moyenne d'environ 4500 Cel.l⁻¹ cette espèce était bien présente dans les cuves analysées et donc ne pouvait pas être négligée, et que d'autre part, 15 analystes sur les 23 participants ont bien pris en compte ce taxon malgré la difficulté d'identification. Les instructions stipulant bien que toutes les cellules présentes dans l'échantillon doivent être dénombrées, les cellules de *Karlodinium veneficum* devaient l'être même avec une incertitude d'identification. Pour les calculs des moyennes et écart-types de référence, en conformité avec la norme NF ISO 13528⁴, les valeurs aberrantes ont été écartées. Ainsi, les absences de résultats pour ce taxon ne sont pas incluses dans les calculs de la moyenne et de l'écart-type de référence.

On note par ailleurs que six analystes n'ont détecté *Coscinodiscus wailesii* dans aucun des échantillons. Comme ce taxon a été introduit dans les échantillons à une concentration proche de la limite de détection de la méthode d'essai, il est possible qu'il n'y en ait pas eu dans certains réplicas. Les absences de résultats de ces analystes pour ce taxon ne sont donc pas prises en compte pour les calculs de la moyenne et de l'écart-type de référence et ces analystes ne se voient pas attribuer de z score pour cette espèce.

Concernant les résultats qualitatifs, dans un cas, l'analyste a identifié pour le même taxon attendu deux espèces différentes mais proches morphologiquement. Dans ce cas les résultats des deux espèces ont été cumulés. Pour l'espèce attendue *Pseudo-nitzschia australis*, les identifications *P. seriata* complex sont considérées comme exactes au niveau spécifique puisque *P. australis* fait bien partie du groupe *P. seriata* complex.

⁴ NF ISO 13528 (octobre 2015). Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires.

2.3 INTERPRETATION STATISTIQUE DES RESULTATS QUANTITATIFS

L'analyse statistique des résultats s'appuie sur la norme ISO 13528:2015, relative aux « Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons inter-laboratoires ». La statistique de performance utilisée pour comparer les résultats des 23 analystes, pour chaque espèce phytoplanctonique, est le score z :

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

avec :

- $z_{s,a}$ le score z 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 la dispersion utilisée dans l'évaluation des résultats d'un essai d'aptitude », ISO 13528:2015) 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.3 de la norme. L'interprétation des résultats se fait de la manière suivante :

- le score z donne un « signal d'action » si sa valeur est inférieure à -3 ou supérieure à 3 (limites de contrôle) ;
- le score z 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_s et $\hat{\sigma}_s$ ainsi que les scores z ont été calculés à partir de la moyenne, sur les trois répliques, des données transformées.

Lorsqu'un résultat est manquant pour un réplica ou que la valeur 0 a été renseignée, la valeur 1 est utilisée pour la transformation logarithme. Cette valeur pénalisante permet de pointer les cas de valeur manquante et d'en discuter afin d'améliorer la cause de ses omissions. Pour le calcul des valeurs assignées, les valeurs manquantes ont été prises en compte seulement pour *C.wailessi* et dans les cas où un seul réplica sur les trois est concerné. Ceci afin de prendre en considération le fait que la valeur moyenne est proche de la limite de détection. Dans les autres cas, les valeurs manquantes ne sont pas prises en compte pour le calcul des valeurs assignées.

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. Le délai d'analyse est l'écart entre la date de réception et l'analyse de l'échantillon et le délai décant/anal correspond au nombre de jour entre la préparation des cuves et l'analyse.

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

CODE Labo-Analyst	1 ^{er} réplica					2 ^{ème} réplica					3 ^{ème} réplica				
	volume cuve (ml)	Date décantation	date analyse	Délai analyse (jours)	délai décant/anal (jours)	volume cuve (ml)	Date décantation	date analyse	Délai analyse (jours)	délai décant/anal (jours)	volume cuve (ml)	Date décantation	date analyse	Délai analyse (jours)	délai décant/anal (jours)
A-42	25	23/06/2016	27/06/2016	13	4	25	23/06/2016	27/06/2016	13	4	25	23/06/2016	27/06/2016	13	4
A-81	25	23/06/2016	28/06/2016	14	5	25	23/06/2016	29/06/2016	15	6	25	23/06/2016	24/06/2016	10	1
B-76	20	16/06/2016	12/07/2016	26	26	20	16/06/2016	12/07/2016	26	26	20	16/06/2016	12/07/2016	26	26
B-89	20	28/06/2016	06/07/2016	20	8	20	01/07/2016	08/07/2016	22	7	20	11/07/2016	18/07/2016	32	7
B-91	20	16/06/2016	06/07/2016	20	20	20	16/06/2016	08/07/2016	22	22	20	16/06/2016	12/07/2016	26	26
B-94	20	16/06/2016	23/06/2016	7	7	20	16/06/2016	24/06/2016	8	8	20	27/06/2016	29/06/2016	13	2
C-50	25	28/06/2016	30/06/2016	16	2	25	30/06/2016	01/07/2016	17	1	25	01/07/2016	05/07/2016	21	4
C-90	10	02/08/2016	04/08/2016	50	2	10	02/08/2016	04/08/2016	50	2	10	02/08/2016	05/08/2016	51	3
C-96	25	20/06/2016	21/06/2016	7	1	25	23/06/2016	24/06/2016	10	1	25	24/06/2016	27/06/2016	13	3
D-19	20	20/06/2016	21/06/2016	5	1	20	22/06/2016	23/06/2016	7	1	20	06/07/2016	07/07/2016	21	1
D-93	20	20/06/2016	22/06/2016	6	2	20	20/06/2016	22/06/2016	6	2	20	22/06/2016	24/06/2016	8	2
D-97	20	06/07/2016	08/07/2016	22	2	20	20/06/2016	23/06/2016	7	3	20	22/06/2016	24/06/2016	8	2
E-79	25	28/06/2016	30/06/2016	13	2	25	01/07/2016	07/07/2016	20	6	25	21/07/2016	22/07/2016	35	1
E-82	25	28/06/2016	01/07/2016	14	3	25	01/07/2016	08/07/2016	21	7	25	02/09/2016	05/09/2016	78	3
F-71	25	18/07/2016	19/07/2016	35	1	25	18/07/2016	19/07/2016	35	1	25	19/07/2016	20/07/2016	36	1
F-98	10	30/08/2016	31/08/2016	77	1	10	30/08/2016	01/09/2016	77	1	10	01/09/2016	02/09/2016	78	1
G-37	25	15/06/2016	16/06/2016	2	1	25	21/06/2016	22/06/2016	8	1	25	21/06/2016	23/06/2016	9	2
G-88	25	15/06/2016	17/06/2016	3	2	25	21/06/2016	22/06/2016	8	1	25	21/06/2016	23/06/2016	9	2
G-92	25	18/07/2016	19/07/2016	35	1	25	18/07/2016	19/07/2016	35	1	25	18/07/2016	19/07/2016	35	1
H-26	25	15/06/2016	16/06/2016	2	1	25	15/06/2016	17/06/2016	3	2	25	20/06/2016	22/06/2016	8	2
H-87	25	15/06/2016	16/06/2016	2	1	25	15/06/2016	20/06/2016	6	5	25	20/06/2016	21/06/2016	7	1
I-34	20	16/06/2016	17/06/2016	3	1	25	20/06/2016	21/06/2016	7	1	25	21/06/2016	22/06/2016	8	1
I-85	25	04/08/2016	05/08/2016	51	1	25	08/08/2016	09/08/2016	55	1	20	18/08/2016	19/08/2016	65	1

Dans les instructions de l'IPI (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. La majorité des participants a utilisé des cuves de 20 ou 25 ml. Seuls les analystes **C-90 et F-98** ont utilisé des cuves de 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* ».

Sept analystes ont préparé tout ou partie des cuves dans un délai supérieur à trois semaines par rapport à la date de réception des échantillons (21 cuves sur 69). Pour les analystes **C-90, F-98 et I-85**, les délais d'analyses entre la réception des échantillons et la mise en décantation sont les plus longs de tous les participants mais restent dans les délais accordés pour cet exercice.

Et pour les analystes **B-76 et B-91** le délai entre la préparation des cuves et la lecture au microscope excède trois semaines. Pour tous les autres analystes ce délai est inférieur à 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

Comme stipulé dans le rapport final de l'IPI, en excluant *Karenia selliformis* l'échantillon comprenait neuf espèces : *Alexandrium ostenfeldii*, *Prorocentrum triestinum*, *Karlodinium veneficum*, *Dinophysis acuta*, *Pseudonitzschia australis*, *Guinardia delicatula*, *Chaetoceros didymus*, *Coscinodiscus wailesii* et *Thalassiosira.gravida*

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 ou n'a pas été identifié et non dénombré dans l'échantillon. La case est colorée en vert lorsque l'identification au niveau de l'espèce est correcte, en bleu lorsque l'identification est correcte au niveau du genre et en rouge lorsque l'identification est incorrecte au niveau du genre.

Tableau 2 : Résultats qualitatifs par analyste – Taxa identifiés.

Code Lab-analyste	<i>Thalassiosira gravida</i>	<i>Prorocentrum triestinum</i>	<i>Pseudonitzschia australis</i>	<i>Dinophysis acuta</i>	<i>Coscinodiscus wailesii</i>	<i>Guinardia delicatula</i>	<i>Chaetoceros didymus</i>	<i>Karlodinium veneficum</i>	<i>Alexandrium ostenfeldii</i>
A-42			<i>P. seriata complex</i>		<i>C. granii</i>				<i>A. tamarense</i>
A-81			<i>P. seriata complex</i>		<i>C. granii</i>				<i>A. tamarense</i>
B-76	<i>Thal. sp.</i>		<i>P. australis</i>						
B-89	<i>Thal. sp.</i>		<i>P. australis</i>					<i>K.armiger</i>	
B-91			<i>P. australis</i>						
B-94	<i>Thal. sp.</i>	<i>P. micans</i>	<i>P. sp.</i>			<i>G. sp.</i>		NO	<i>A.minutum</i>
C-50	<i>Thal. sp.</i>		<i>P. pungens</i>		NO	<i>G. sp.</i>	<i>C. decipiens</i>	NO	<i>Pentapharsodinium dalei</i>
C-90			<i>P. pungens</i>		<i>C. granii</i> + <i>Actynocyclus octonarius</i>	NO	<i>C. decipiens</i>	NO	<i>A. minutum</i>
C-96			<i>P. pungens</i>				<i>C. decipiens</i>	<i>Heterosigma akashiwo</i>	<i>A.minutum</i>
D-19			<i>P. australis</i>					NO	
D-93			<i>P. australis</i>					NO	
D-97			<i>P. australis</i>					NO	
E-79			<i>P. multiseriis</i>		NO			<i>Karenia digitata</i>	
E-82	<i>Thal. sp.</i>		<i>P. australis</i>		NO			NO	
F-71			<i>P. australis</i>						<i>A. tamutum</i>
F-98			<i>P. seriata complex</i>		NO			NO	<i>A. tamarense</i>
G-37			<i>P. australis</i>				<i>C.decipiens</i>		<i>A. tamutum</i>
G-88			<i>P. australis</i>				<i>C. decipiens</i>		<i>A. tamutum</i>
G-92			<i>P. australis</i>						<i>A. tamutum</i>
H-26			<i>P. fraudulenta</i>		NO		<i>C. decipiens</i>		<i>A. minutum</i>
H-87			<i>P.fraudulenta</i>		NO		<i>C.decipiens</i>		<i>A.minutum</i>
I-34			<i>P. seriata complex</i>						
I-85			<i>P. australis</i>						<i>A. tamarense</i>

Légende

	Espèce correcte
	Genre correct
	Genre incorrect
NO	Non observé, non identifié

Une majorité d'analystes a su reconnaître correctement les taxons au niveau de l'espèce avec 72.5 % d'identifications correctes. Les identifications correctes au niveau des genres ou espèces cumulées représentent 91.3 % des résultats. Dans le cas d'*Alexandrium*, lorsque le genre a été bien identifié, seuls 39% des résultats sont corrects au niveau spécifique, ce qui indique une performance moyenne des analystes. L'absence d'observation concerne 7.3 % des cas et l'identification incorrecte au niveau du genre 1.4 %.

Thalassiosira gravida

Cinq analystes se sont arrêtés au genre. Il faut noter que ce genre renferme un grand nombre d'espèces, 268 selon AlgaeBase⁵, dont 180 sont acceptées taxonomiquement et 323 selon le WoRMS⁶ avec 164 dont le classement dans ce genre est incertain. Par ailleurs, il peut y avoir confusion aussi avec certaines espèces des genres *Porosira* ou *Coscinodiscus*.

Toutefois, l'épaisseur du filament bien visible qui relie en chaîne droite les cellules, ainsi que la forme rectangulaire des cellules en vue connective représentent des caractéristiques typiques de *T. gravida*.

NB : *Thalassiosira rotula* qui faisait partie de la liste des espèces proposées dans le tableau de rendu des résultats est devenu synonyme de *T. gravida*. Cette réponse est donc considérée comme correcte lorsque renseignée par un analyste.



***Thalassiosira gravida* Cleve, 1896**

(Synonyme : *Thalassiosira rotula* Meunier, 1910)

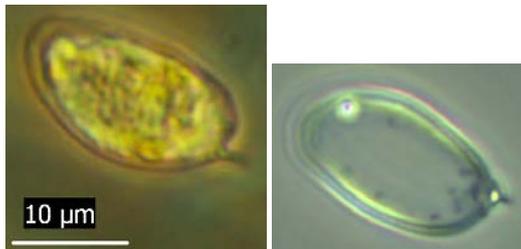
Image 1 : photos N. Neaud Masson (IPI 2016) *Thalassiosira gravida*

⁵ Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2017. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 20 March 2017. <http://www.algaebase.org/about/>

⁶ WoRMS Editorial Board (2017). World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2017-03-20. doi:10.14284/170

Prorocentrum triestinum

Un seul analyste a identifié le *Prorocentrum* comme étant *P. micans*. Compte tenu de la taille et de la répartition des pores de la thèque non arrangés en lignes rayonnantes, *P. micans* était à rejeter.



Prorocentrum triestinum J.Schiller, 1918

Image 2 : photos N. Neaud Masson (IPI 2016) *Prorocentrum triestinum*

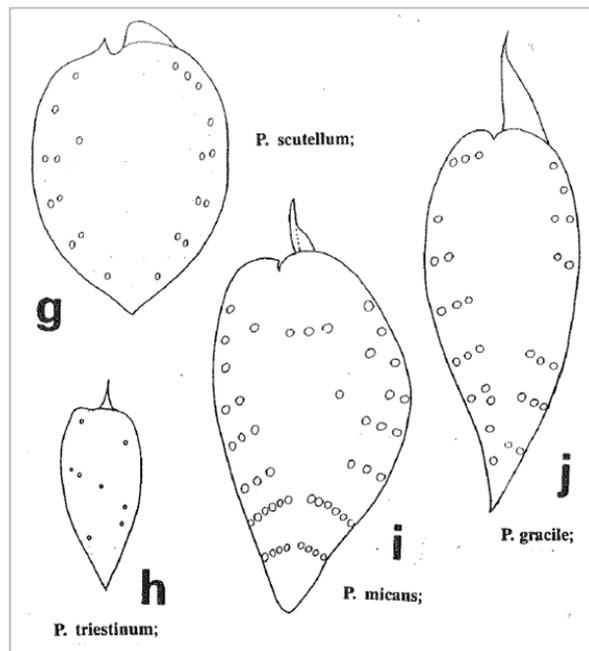


Figure 1 : Image extraite de l'ouvrage P. Lassus, fév 1992 – Stage phytoplancton.

Pseudo-nitzschia australis

Compte-tenu des caractères morphologiques des cellules et plus particulièrement de leur asymétrie, *P. pungens*, *P. multiseriata* et *P. fraudulenta* pouvaient être écartés.



Pseudo-nitzschia australis Frenguelli, 1939

Les réponses *Pseudo-nitzschia seriata* complex sont également correctes. Mais dans le cadre du REPHY et pour les eaux métropolitaines, l'usage est d'aller au-delà en indiquant « large asymétrique » (éliminant ainsi les espèces effilées et les larges symétriques). Le groupe *P. seriata* complex est un regroupement virtuel de toutes les espèces dont la largeur excède 3 µm, ce qui est au final très peu informatif des espèces en présence et on tente d'identifier plus finement.

Note : Pour la bancarisation dans Quadrigé on utilise le taxon virtuel « Pseudo-nitzschia, groupe des larges asymétriques (australis + seriata + subpacificica) »

Image 3 : photo N. Neaud Masson (IPI 2016) *Pseudo-nitzschia australis*

Caractéristiques morphologiques des cellules dans l'échantillon :

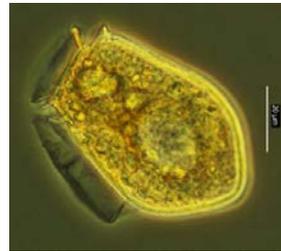
Longueur : 92 – 100 µm
Largeur : 7 – 8 µm
Stries pas ou peu visibles
Chevauchement 25 %
Valves asymétriques

Tableau 3 : Critères morphologiques des différentes espèces proposées dans le cadre de l'exercice IPI des *Pseudo-nitzschia* du complexe *seriata*.

	<i>Pseudo-nitzschia</i> complexe <i>seriata</i>				
	<i>P. pungens</i>	<i>P. multiseriata</i>	<i>P. fraudulenta</i>	<i>P. australis</i>	<i>P. seriata</i>
Longueur (µm)	74 – 142	80 – 140	50 - 119	75 – 144	91 - 160
Largeur valvaire (µm)	2,4 – 4,2	3,4 – 4,5	4,5 - 10	6 – 8	5,5 - 8
Chevauchement	1/4 à 1/3	1/3	1/6 – 1/8	1/4 à 1/3	1/4 à 1/3
Forme valve	Symétrique effilée	Symétrique effilée	Symétrique large	Asymétrique large	Asymétrique large
Visibilité des stries	visibles	visibles	Non visible	Rarement visible	Rarement visible

Dinophysis acuta

Tous les analystes ont correctement identifié ce taxon au niveau de l'espèce.



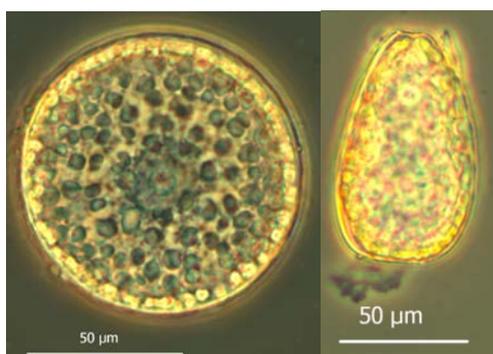
Dinophysis acuta Ehrenberg, 1839

Image 4 : photo N. Neaud Masson (IPI 2016) *Dinophysis acuta*

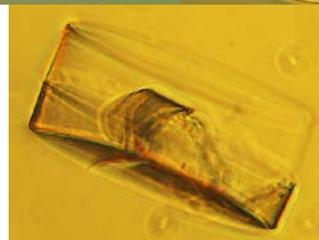
Coscinodiscus wailesii

Lorsqu'elle a été observée, cette espèce a correctement été identifiée par la plus part des analystes. Trois participants ont identifié l'espèce *C. granii*. On peut différencier *C. wailesii* de *C. granii* grâce à la vue connective. Alors que les surfaces des valves de *C. granii* sont bombées avec un côté plus large que l'autre, celles de *C. wailesii* sont plates et symétriques ce qui lui donne une forme bien rectangulaire en vue connective. La taille des cellules et les caractéristiques de la valve, sont aussi des critères permettant de les différencier. Les cellules de *C. wailesii* sont généralement plus grandes, présentent une zone centrale hyaline (non perforée) et sans rosette et contiennent de nombreux petits chloroplastes.

En raison de sa concentration proche du seuil de détection de la méthode, certains participants n'ont pas retrouvé cette cellule dans leurs cuves.



C. granii Gough, 1905

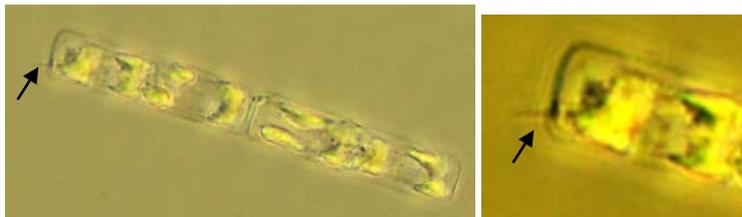


C. wailesii Gran & Angst, 1931

Image 5 : photos N. Neaud Masson (IPI 2015 et 2016) *C. granii* et *C. wailesii*

Guinardia delicatula

Les analystes ont majoritairement identifié cette espèce (87% de réponses correctes). Deux analystes se sont arrêtés au genre. Le genre *Guinardia* renferme des espèces de morphologies très différentes. *Guinardia delicatula* est caractérisé par la formation de chaînes courtes et droites et la présence d'une épine courte, droite et excentrée visible sur la cellule terminale d'une chaîne.



Guinardia delicatula (Cleve) Hasle, 1997

Image 6 : photos N. Neaud Masson (IPI 2016) *Guinardia delicatula* (le processus = épine est indiqué par une flèche)

Chaetoceros didymus

Sept analystes ont confondu cette espèce avec *Chaetoceros decipiens*. ce qui correspond à 30% de réponses erronées.

La principale caractéristique des cellules de *C. didymus*, est la présence d'une forte protubérance en demi-sphère au centre de leurs valves, tout comme chez *C. protuberans*, ce qui rend ces deux espèces difficilement distinguables. Chez *C. decipiens* les soies intercalaires sont soudées par paires à leur base et les cellules possèdent plusieurs chloroplastes ce qui n'est pas le cas pour *C. didymus* dont les soies sont distinctes dès la base et les cellules pourvues de deux chloroplastes.



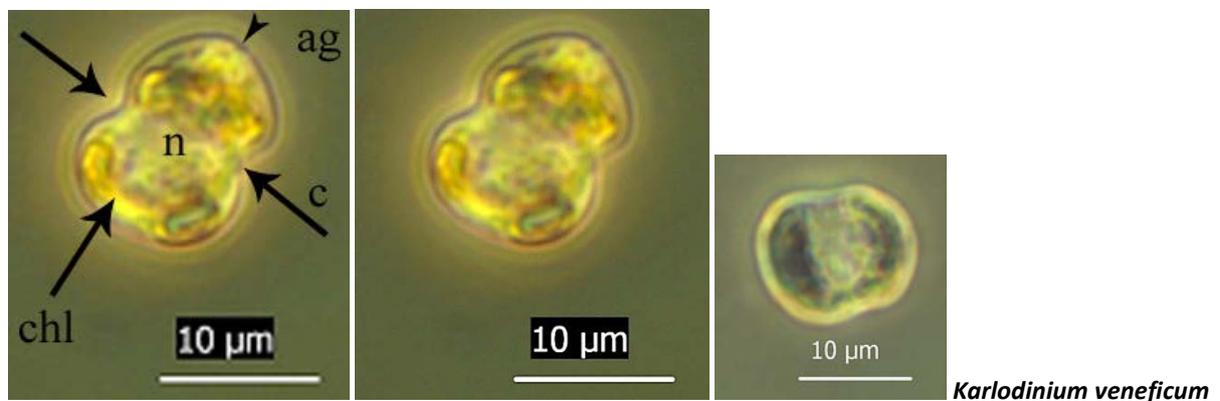
Image 7 : photo N. Neaud Masson (IPI 2016) *Chaetoceros didymus*

Karlodinium veneficum

Cette espèce a causé beaucoup de difficultés aux analystes. Huit analystes n'ont pas été en mesure de l'identifier et ont préféré ne pas la dénombrer. Comparativement, dans le cadre de l'IPI seul six participants (dont deux de l'Ifremer) sur les 81 n'ont pas rendu de résultat pour cette espèce.

Rappelons aussi que les résultats des tests d'homogénéité et de stabilité n'ont pas répondu aux critères requis et que cette espèce a été exclue de l'évaluation dans le cadre de l'IPI. Nous avons tout de même opté pour traiter les résultats car 15 participants ont dénombré ces cellules et leurs résultats apparaissent homogènes.

Note : dans le cadre du réseau d'observation et de surveillance, si de telles cellules sont présentes dans les échantillons, soit elles sont en faible abondance et on les classera dans les Gymnodiniales, soit elles sont en forte abondance et il faut recourir à l'aide du réseau d'observateurs et de l'expertise.



(D.Ballantine) J.Larsen, 2000

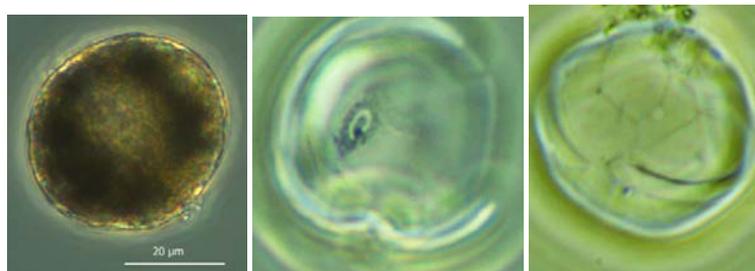
Synonyme : *Karlodinium micrum* (B.Leadbeater & J.D.Dodge) J.Larsen, 2000

Image 8 : photos N. Neaud Masson (IPI 2016) *Karlodinium veneficum*
(la photo de gauche montre clairement une espèce de Karlodinium très reconnaissable alors que l'identification est beaucoup plus ardue sur l'autre cliché)

On peut voir clairement un dinoflagellé gymnodinioïde (sans thèque) avec, sur la photo de gauche, un cingulum (c), le noyau (n), les plastes (chl) plutôt en périphérie et en nombre plutôt limité, cette dernière caractéristique étant confirmée sur la photo de droite. Sur la photo de gauche on observe l'épicône qui est assez conique alors que l'hypocône est plus trapézoïdal. Tous ces caractères, visibles sur la photo de gauche, correspondent bien avec *Karlodinium*. Par contre, on ne peut pas voir le pore ventral (qui distinguerait *Karlodinium* de *Karenia*) ni la gouttière apicale droite (qui distingue les *Kareniaceae* des *Gymnodiniaceae*) mais on reconnaît assez bien un petit dinoflagellé nu ressemblant beaucoup à *Karlodinium* (la taille aussi est importante, les *Karenia* étant généralement plus grands). En faisant varier la mise au point, la gouttière (ag) peut être légèrement perceptible, elle se devine sans certitude dans le plan de la photo. En revanche, il est impossible de reconnaître au niveau spécifique.

Alexandrium ostenfeldii

Un seul analyste n'a pas identifié le genre *Alexandrium* et a confondu avec le genre *Pentaplasodinium*. Les *Alexandrium* ont une forme arrondie à sub-sphérique sans corne apicale ni épine antapicale, alors que les *Pentaplasodinium* (comme les *Scrippsiella* et *Enciculifera*) ont une épithèque sub-conique. Pour les autres analystes, il y a eu confusion avec *A. minutum*, *A. tamarense* et *A. tamutum*. Les performances concernant l'identification de ce taxon au niveau de l'espèce sont donc très moyennes puisque seules 39% des réponses étaient correctes. Il convient donc de rappeler que l'identification des espèces de nombreux dinoflagellés cuirassés, et particulièrement les espèces d'*Alexandrium*, nécessite obligatoirement l'observation de la thèque et de certaines plaques caractéristiques. La confusion avec *A. minutum* (22 % des analystes de 3 laboratoires) n'est pas acceptable étant donnée la grande différence de taille entre les deux espèces (Figure 3). Pour les autres espèces proposées, les tailles sont sensiblement identiques, mais l'observation de thèques aurait sans nul doute permis de réaliser une identification correcte, car le pore ventral chez *A. ostenfeldii* est particulièrement gros et facilement reconnaissable (Figure 2). L'utilisation de coloration spécifique en épifluorescence permet de visualiser directement les plaques et le pore, sans aucune difficulté, permettant ainsi une identification aisée des espèces d'*Alexandrium*.



Alexandrium ostenfeldii (Paulsen) Balech & Tangen, 1985

Image 9 : photos N. Neaud Masson (IPI 2016) *Alexandrium ostenfeldii*

Les cellules de l'échantillon, d'un diamètre de 40 µm, présentent un large pore ventral sur la plaque 1' très typique de l'espèce *A. ostenfeldii*.

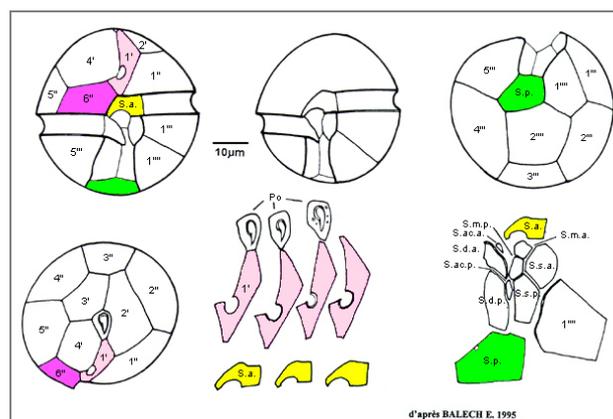


Figure 2 : Illustration *Alexandrium ostenfeldii* extraite de PhytoQuiz1, 1997. Flagellés marins – Marine flagellates, un outil d'auto-formation pour l'identification du phytoplancton, CD-ROM, IFREMER production, ISBN 2-905434-90-2.

Par comparaison, ci dessous les caractéristiques des autres *Alexandrium* choisis par certains participants.

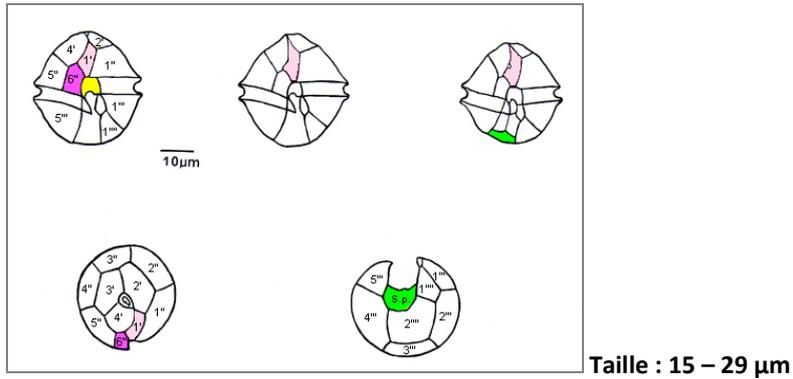


Figure 3 : Illustration *Alexandrium minutum* extraite de PhytoQuiz1, 1997. Flagellés marins – Marine flagellates, un outil d'auto-formation pour l'identification du phytoplancton, CD-ROM, IFREMER production, ISBN 2-905434-90-2.

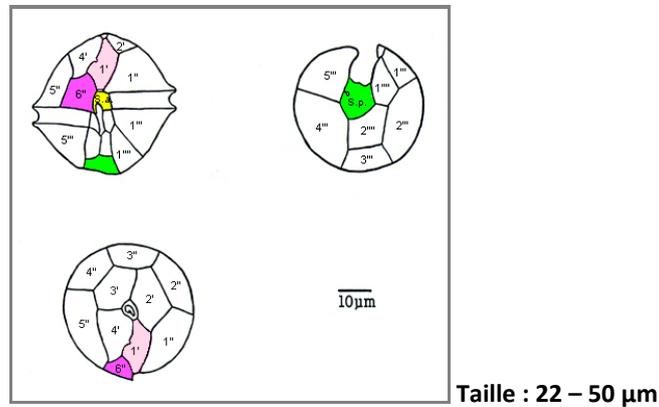


Figure 4 : Illustration *Alexandrium tamarensis* extraite de PhytoQuiz1, 1997. Flagellés marins – Marine flagellates, un outil d'auto-formation pour l'identification du phytoplancton, CD-ROM, IFREMER production, ISBN 2-905434-90-2.

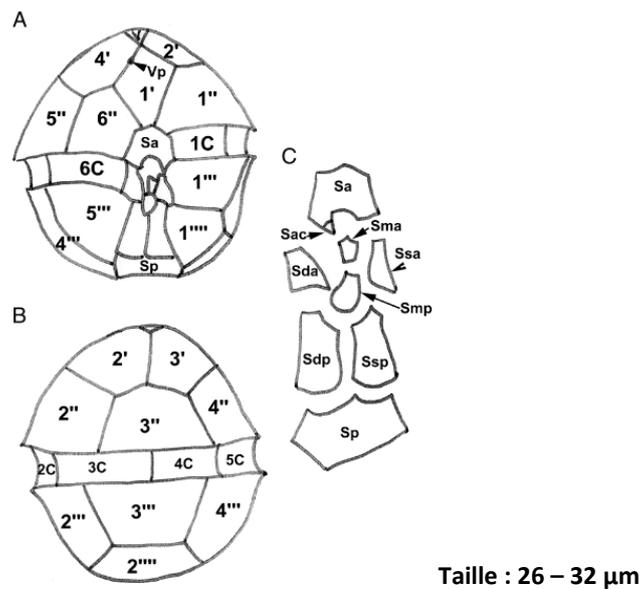


Figure 5 : Illustration *Alexandrium tamutum* in Montresor, M., John, U., Beran, A. and Medlin, L. K. (2004), ALEXANDRIUM TAMUTUM SP. NOV. (DINOPHYCEAE): A NEW NONTOXIC SPECIES IN THE GENUS ALEXANDRIUM1. Journal of Phycology, 40: 398–411. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.03060.x

3.3 RESULTATS QUANTITATIFS ET DISCUSSION

Résultats des tests d'homogénéité et de stabilité

Les résultats des tests d'homogénéité et de stabilité réalisés par un laboratoire expert dans le cadre de l'IPI sont résumés dans le tableau suivant, qui est extrait du rapport (Salas et Larsen, 2016 - PHY-ICN-16-MI1 VR 1.0). Ces tests ont pour but d'évaluer si les échantillons sont entièrement homogènes et stables selon différents critères statistiques ou s'il existe une hétérogénéité des échantillons et un manque de stabilité dans le temps. La méthodologie et les résultats présents dans le rapport de Salas et Larsen (2016) sont rappelés ici. Leur implication sur les résultats de « l'essai Ifremer » est également exposée.

Tableau 4 : résultats des tests d'homogénéité et de stabilité obtenus dans l'IPI (extrait de Salas1 et Larsen, 2016)

ISO13528	F-test	Homogeneity test ISO 13528	ISO 13528:2015 test for adequate homogeneity	ISO 13528:2015 test for adequate heterogeneity	Stability test 13528:2015	Stability test expanded 13528:2015
<i>Dinophysis acuta</i>	ok	not ok	ok	ok	not ok	ok
<i>Prorocentrum triestinum</i>	ok	not ok	not ok	ok	ok	ok
<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	ok	ok	not ok	ok	ok	ok
<i>Karlodinium veneficum</i>	not ok	not ok	not ok	not ok	not ok	not ok
<i>Guinardia delicatula</i>	ok	not ok	not ok	ok	ok	ok
<i>Thalassiosira gravida</i>	ok	not ok	not ok	ok	not ok	ok
<i>Chaetoceros didymus</i>	ok	not ok	not ok	ok	Pass	ok
<i>Coscinodiscus walesii</i>	ok	not ok	not ok	ok	Pass	ok
<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	ok	not ok	not ok	ok	not ok	ok

HOMOGENEITE

Si une espèce n'est pas homogène d'après le F-test, elle est normalement exclue des analyses statistiques. C'est pourquoi *K.veneficum* a été exclue des analyses dans le rapport de l'IPI. Cependant, il nous a paru nécessaire de conserver ces résultats dans les évaluations (cf. section 2.2 pour plus de détails).

Ensuite, si une espèce n'est pas homogène d'après le test « for adequate homogeneity », alors le test « for adequate heterogeneity » est regardé. Le premier test permet de dire si l'écart-type inter-échantillons obtenu sur les échantillons soumis au laboratoire d'experts est inférieur ou égal à 30 % de l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude obtenu dans le cadre de l'IPI. Dans le cas contraire (not ok), le second test permet de dépasser la valeur de 30 % si aucune hétérogénéité significative n'est trouvée d'après le critère exposé dans la section B.2.3 (p49) de la norme ISO 13528 :2015. Malgré un test « for adequate homogeneity » non valide pour la plupart des espèces, le test « for adequate heterogeneity » est valide pour l'ensemble des espèces, à l'exception de *K.veneficum*.

Cependant, d'après la norme ISO17043 citée par Salas et Larsen (2016), si un manque d'homogénéité apparaît, il faut s'assurer que l'incertitude des valeurs assignées ou que l'évaluation des résultats prend en compte cela. L'incertitude des valeurs assignées a donc été calculée selon la formule présente dans la norme ISO13528 :2015 :

$$u(X_s) = 1.25 \times \frac{\hat{\sigma}_s}{\sqrt{p}}, \text{ avec } p \text{ le nombre de participants.}$$

Si cette valeur est strictement inférieure à 30 % de $\hat{\sigma}_s$, alors l'incertitude de la valeur assignée est considérée comme négligeable. Les résultats (Tableau 5) montrent que l'incertitude de la valeur assignée n'est pas négligeable pour *C.wailesii* et *K.veneficum*. Ces résultats devront être pris en compte lors de l'interprétation des z scores.

Tableau 5 : Valeurs pour chaque espèce de la valeurs assignée X_s , de l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude, du nombre de participants (p) pris en compte pour le calcul des valeurs X_s et $u(X_s)$, ainsi que de l'incertitude de la valeur assignée $u(X_s)$.

	<i>A.ostenfeldii</i>	<i>C.didymus</i>	<i>C.wailesii</i>	<i>D.acuta</i>	<i>G.delicatula</i>	<i>K.veneficum</i>	<i>P.triestinum</i>	<i>P.australis</i>	<i>T.gravida</i>
X_s (log10)	3.24	2.99	1.60	3.45	2.53	3.60	3.64	3.76	3.77
$\hat{\sigma}_s$ (log10)	0.08	0.29	0.51	0.03	0.10	0.16	0.16	0.07	0.09
p	23	23	17	23	22	15	23	23	23
$u(X_s)$	0.022	0.077	0.154	0.008	0.026	0.052	0.041	0.018	0.024
Impact de l'incertitude de la valeur assignée	négligeable	négligeable	non négligeable	négligeable	négligeable	non négligeable	négligeable	négligeable	négligeable

STABILITE

Deux critères sont utilisés pour évaluer la stabilité des échantillons. Le premier permet d'évaluer si l'écart entre les moyennes obtenues lors des mesurages dédiés aux tests d'homogénéité d'une part et lors des mesurages réalisés proche de la date butoir de l'IPI d'autre part n'excède pas 30 % de l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude. Le second critère (expanded) permet de prendre en compte l'incertitude de la différence des moyennes. Au regard du critère élargi, toutes les espèces à l'exception de *K.veneficum* sont supposées stables dans les conditions de l'IPI.

Résultats quantitatifs des participants

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 z scores, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats obtenus par analyste 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 score z de chaque analyste et, dans la seconde figure, les abondances dénombrées dans chaque réplica. 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.

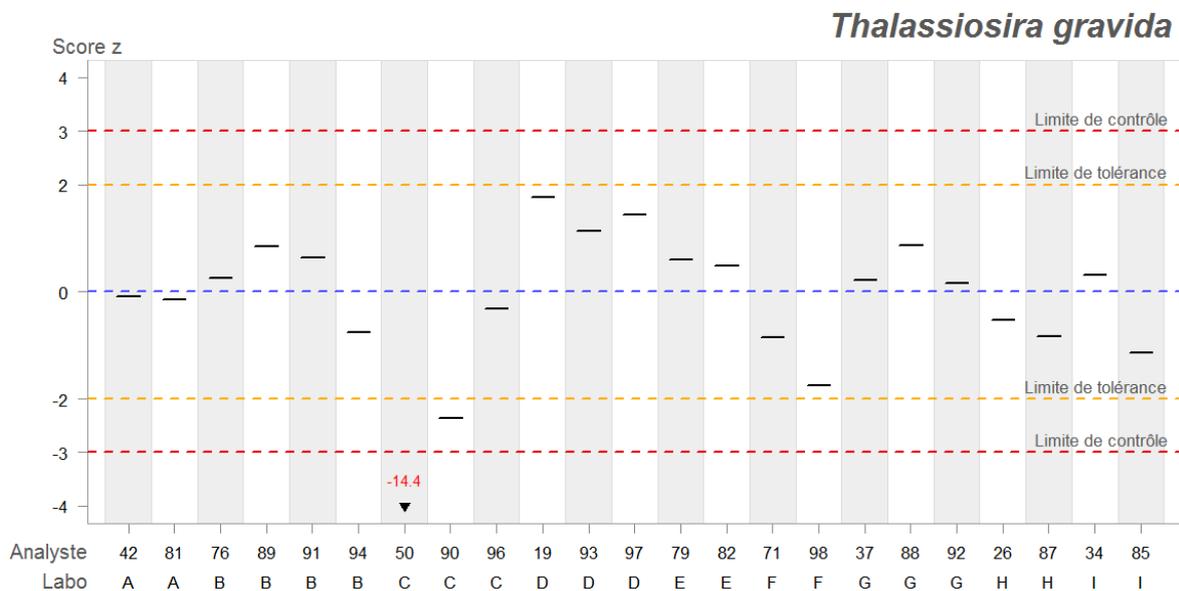


Figure 6 : z scores des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Thalassiosira gravida*.

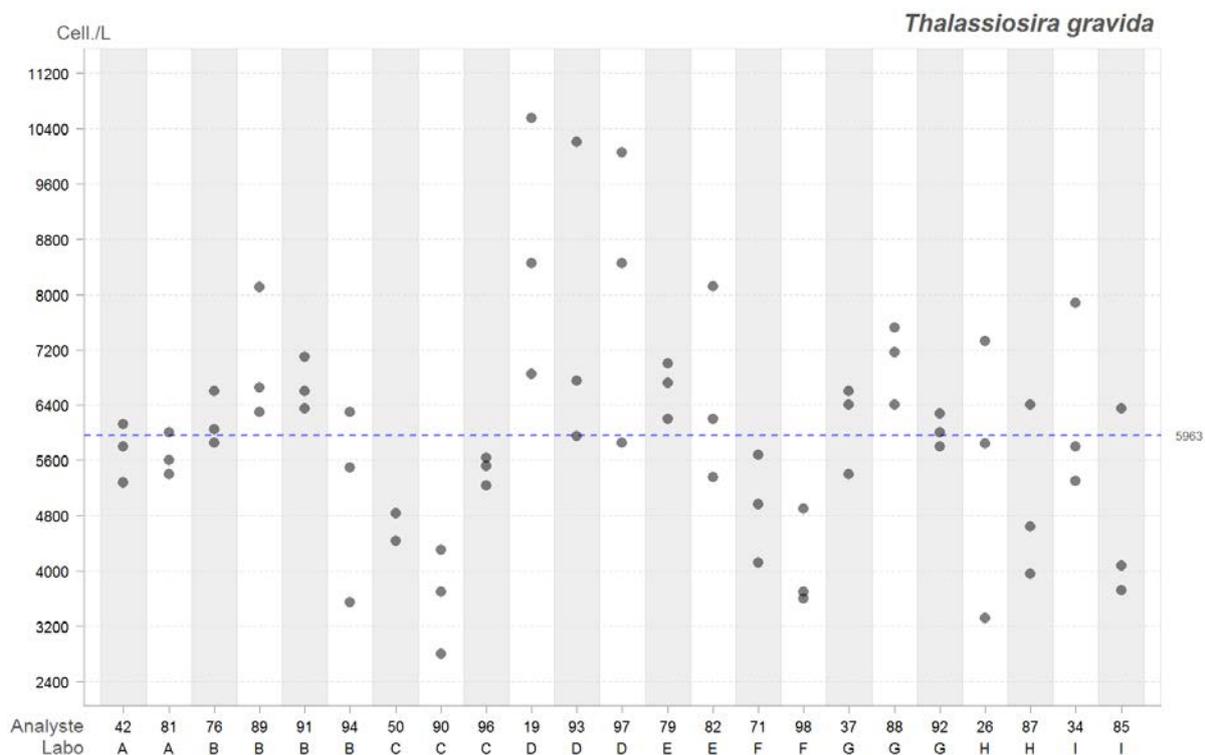


Figure 7 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Thalassiosira gravida*.

La plus part des z scores sont compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement pour tous les analystes sauf deux (C-50 et C-90). La répartition des résultats d'abondances s'étend de 2 800 à 10 550 cell./L. Rappelons que les résultats des tests menés par le Marine Institute ont conclu que pour ce taxon les échantillons étaient homogènes selon le test « for adequate heterogeneity » et stables selon le critère élargi, et l'incertitude de la valeur assignée est négligeable.

Le z score de l'analyste **C-90**, compris entre la limite basse de contrôle et de tolérance implique un signal d'avertissement pour cet analyste. Pour l'analyste **C-50**, le z score est très en dessous de la limite basse de contrôle avec une valeur de -14.4, cet analyste n'a rendu que deux résultats sur trois attendus pour ce taxon. L'absence de dénombrement de ce taxon dans le premier réplica est responsable de la chute de son z score. Pour l'analyste **C-90**, les résultats des trois réplicas sont très inférieurs à la moyenne de référence de 5 963 cell./L, ce qui explique le z score de cet analyste. Il faut noter que l'analyste C-90 a réalisé les dénombrements des trois réplicas en cuve de 10 ml et dans un délai de 50 jours. Dans ce même laboratoire, les résultats de l'analyste C-96, qui a analysé les mêmes échantillons que les analystes C-50 et C-90, sont, en revanche, homogènes et proches de la moyenne de référence.

Dans une moindre mesure, on constate également que pour les analystes F-98 et F-71 appartenant au même laboratoire, les abondances sont toutes inférieures à la moyenne de référence.

A l'inverse, les abondances pour les trois analystes du laboratoire « D » sont homogènes entre ces trois analystes mais représentent les maxima de tous les résultats obtenus.

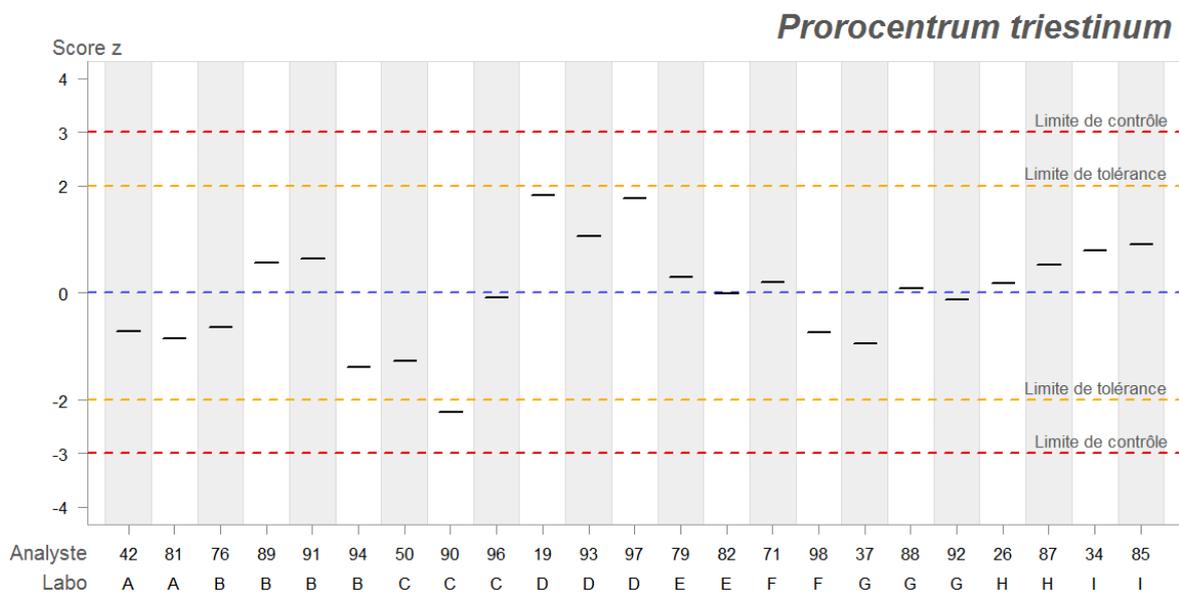


Figure 8 : z scores des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Prorocentrum triestinum*.

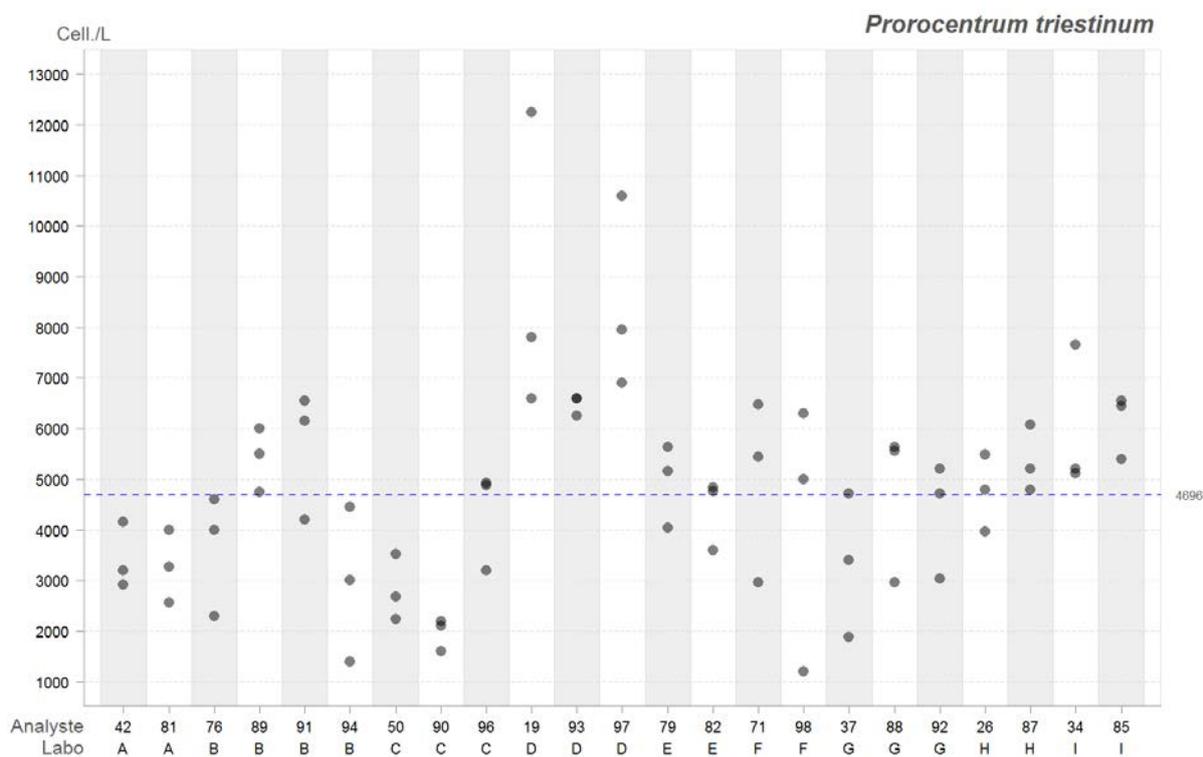


Figure 9 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Prorocentrum triestinum*.

La majorité des z scores sont compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement, sauf pour l'analyste C-90 dont le z score dépasse légèrement la limite basse (valeur : -2.23). Ce signal d'avertissement est dû aux résultats d'abondance très inférieurs à la moyenne de référence pour les trois réplicas (dénombrement en cuve de 10 ml).

Les z scores des analystes **D-19** et **D-97** sont proches de la limite haute (valeurs respectives : 1.83 et 1.76). Comme pour *Thalassiosira gravida*, les résultats de ce laboratoire sont les plus hauts de tous les participants.

La répartition des résultats d'abondance s'étend de 1 200 à 12 250 cell. /L. Pour la plus part des analystes les abondances des trois réplicas sont assez homogènes. On remarque toutefois, qu'un des résultats de l'analyste **F-98** est très inférieur aux deux autres et qu'un des résultats de l'analyste D19 est très supérieur aux deux autres.

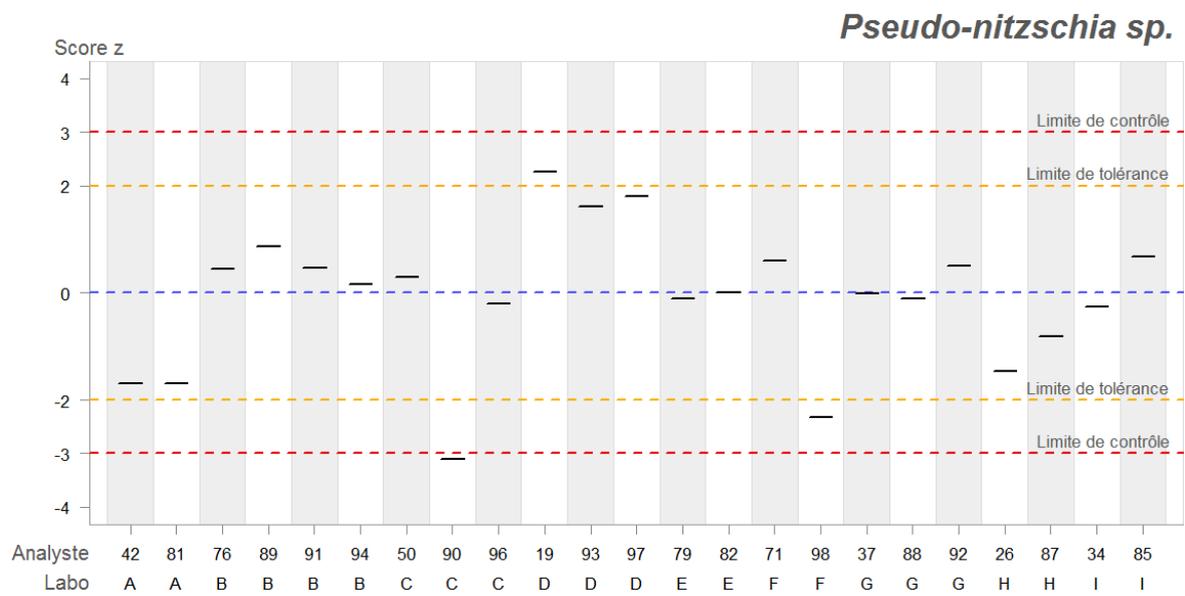


Figure 10 : z scores des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Pseudo-nitzschia australis*.

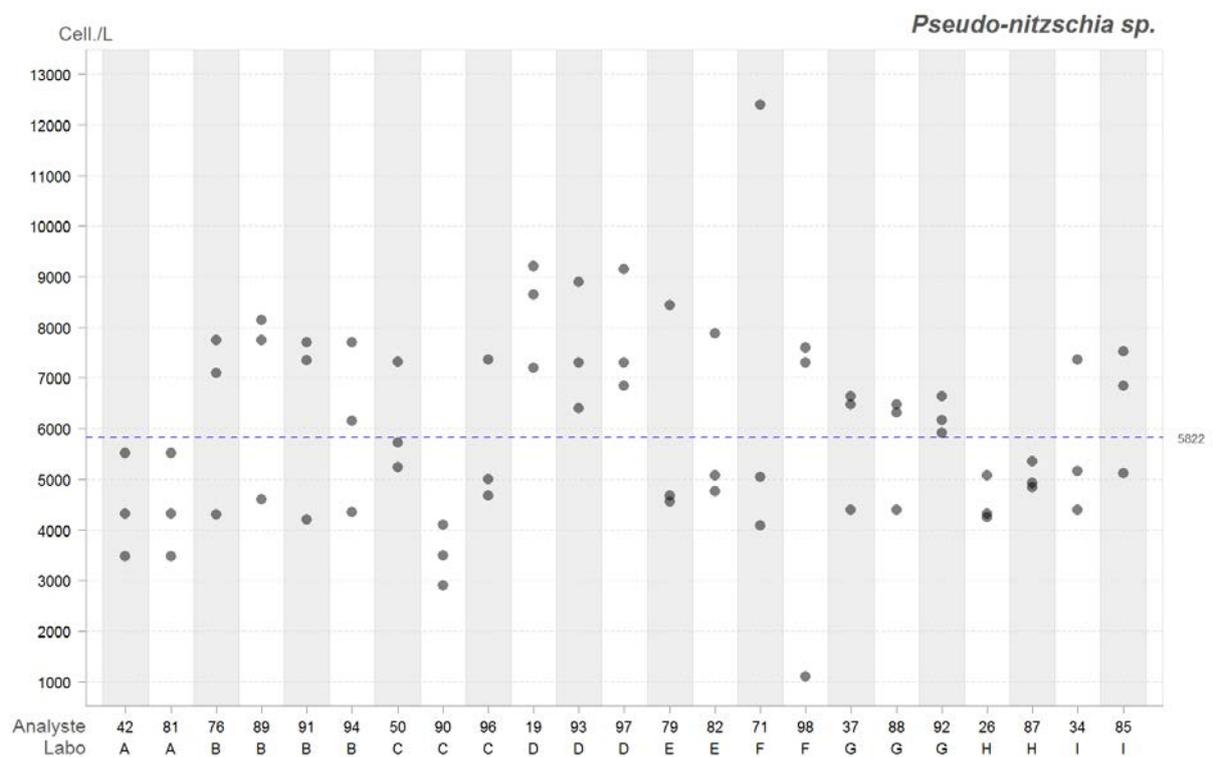


Figure 11 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Pseudo-nitzschia australis*.

A l'exception de trois analystes, tous les z-scores sont compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas signal d'avertissement dans ces cas-là. Pour les analystes **C-90**, **D19** et **F98** les scores z dépassent respectivement la limite basse de contrôle, la limite haute de tolérance et la limite basse de tolérance. On constate à nouveau, que le laboratoire « D » présente les plus forts scores z.

Pour la plus part des analystes, les résultats d'abondance sont assez homogènes et compris entre 2 900 et 9 200 cell. /L. Néanmoins, la répartition des résultats d'abondance s'étend de 1 100 à 12 400 cell. /L. Ces deux valeurs extrêmes sont dues aux résultats obtenus sur deux des répliques. Le maximum concerne l'analyste **F-71** et le minimum l'analyste **F-98**.

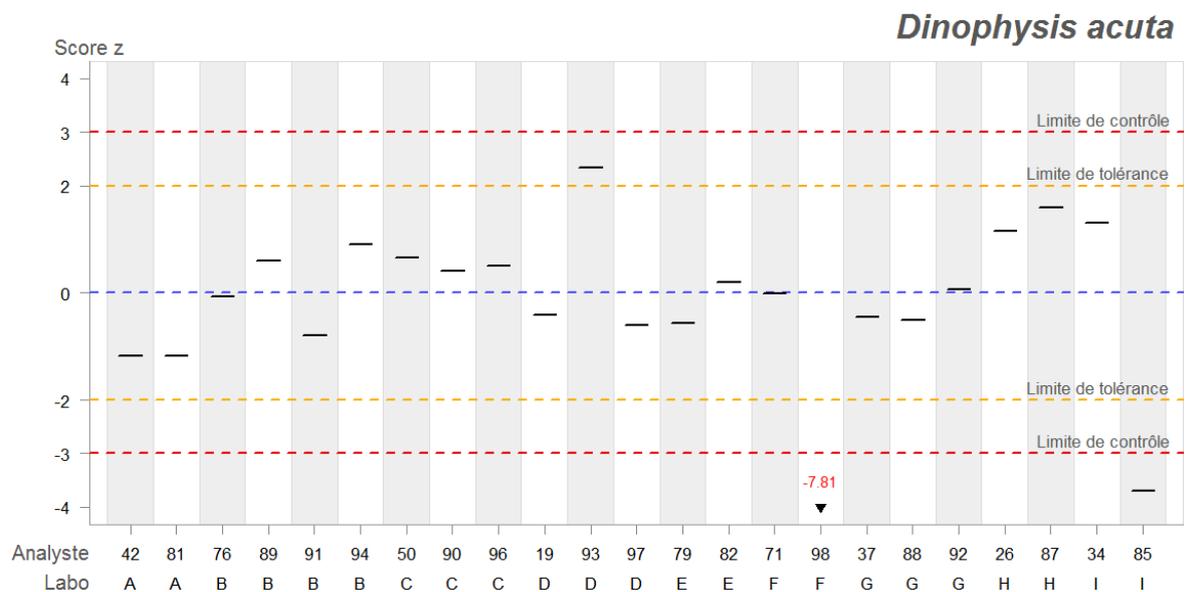


Figure 12 : z scores des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Dinophysis acuta*.

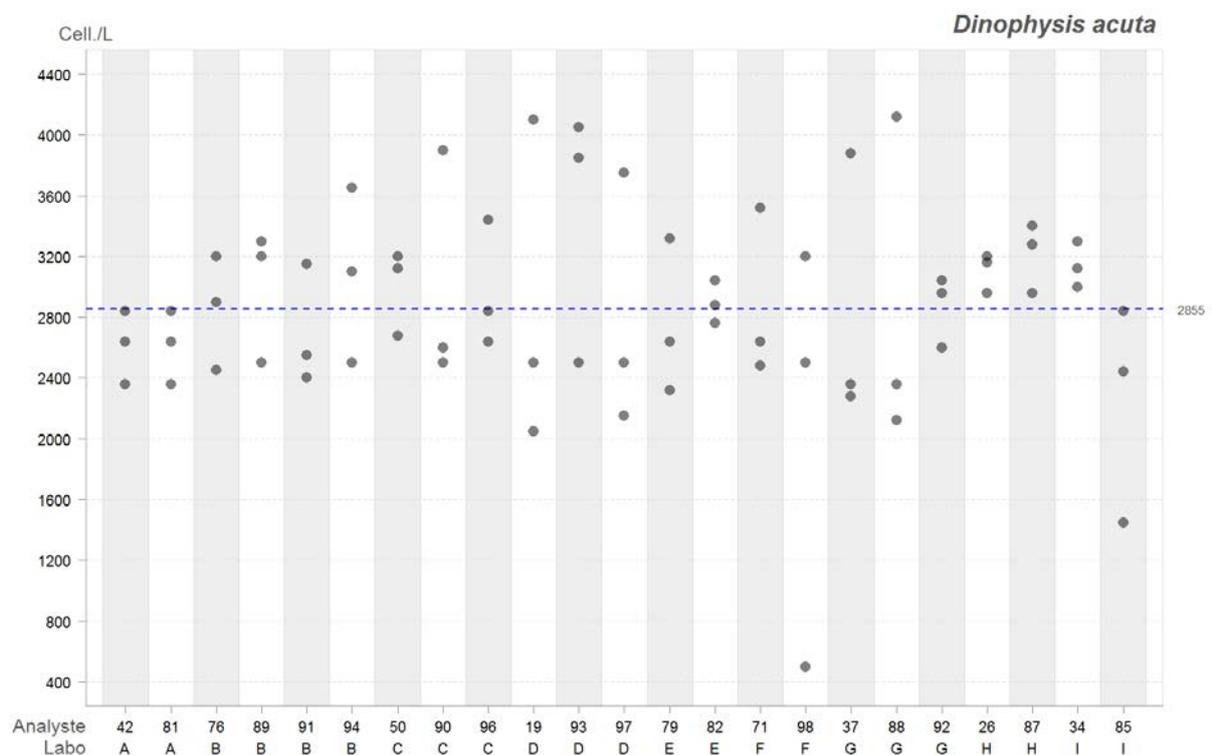


Figure 13 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Dinophysis acuta*.

Pour la majorité des analystes, le z score est compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement sauf pour les analystes **F-98 et I-85**, dont les z-scores sont inférieurs à la limite basse de contrôle en raison d'un résultat sur les trois répliques très inférieur à la moyenne de référence (2 855 cell. /L), et pour l'analyste **D-93** dont le z-score dépasse légèrement la limite haute de tolérance.

En excluant les deux résultats anormalement bas, pour la plus part des analystes les résultats d'abondance sont assez homogènes et compris entre 2 050 et 4 120 cell. /L.

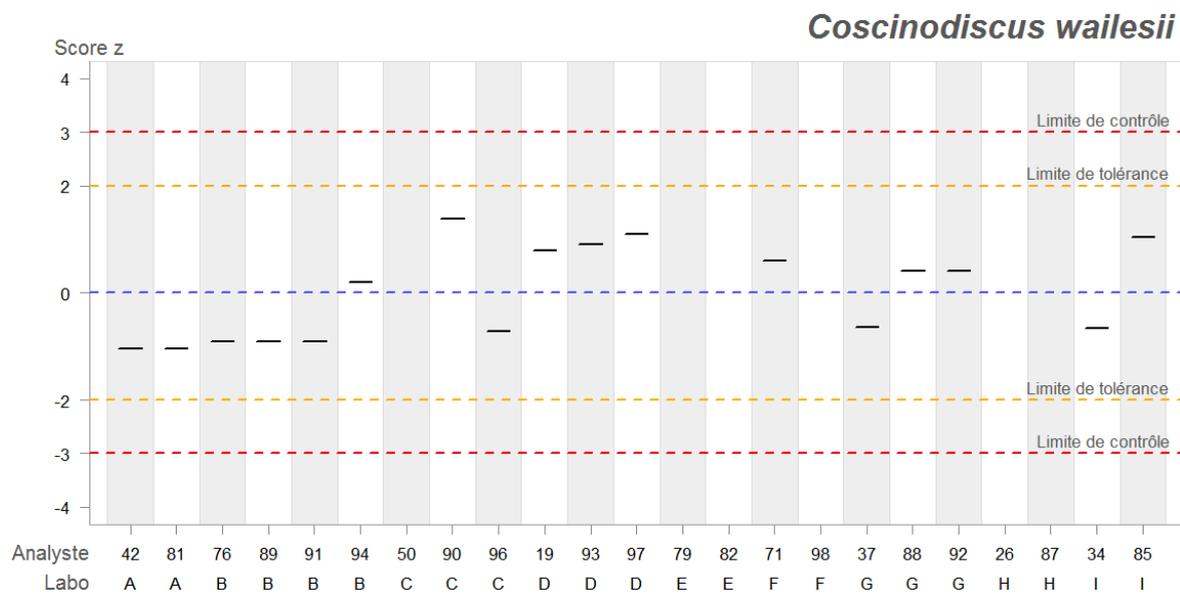


Figure 14 : z scores des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Coscinodiscus walesii*.

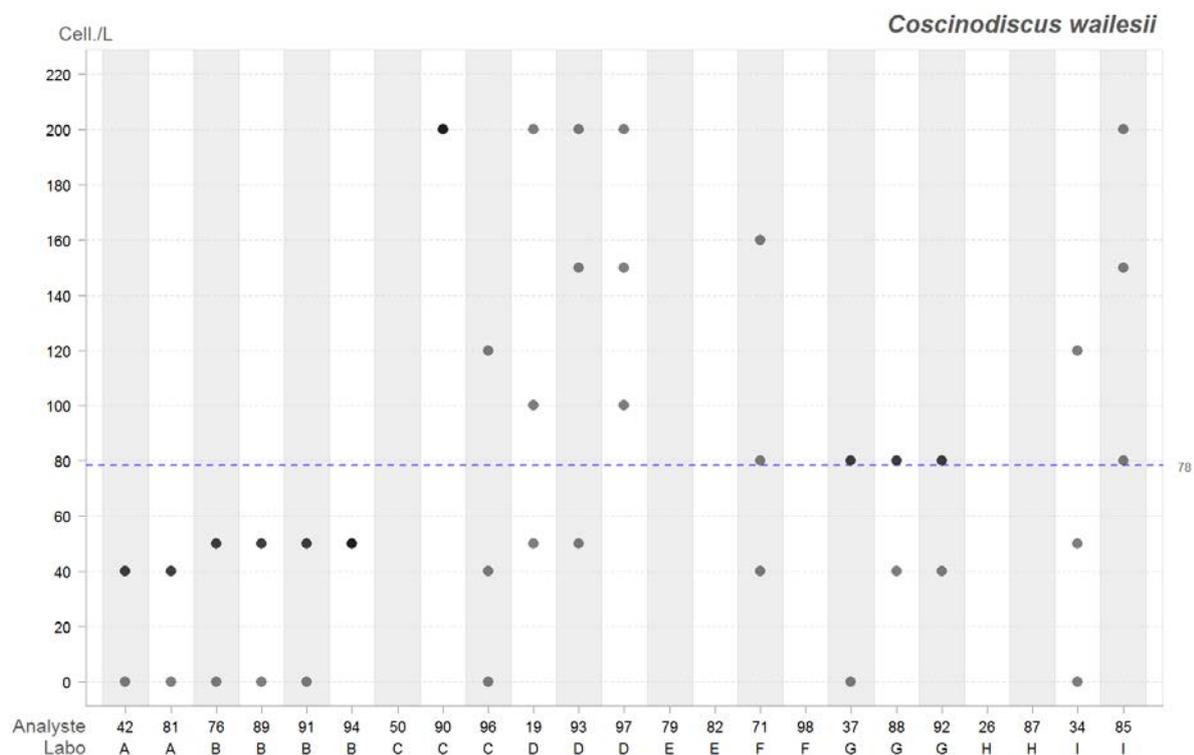


Figure 15 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Coscinodiscus walesii*.

Six analystes n'ont pas observé ce taxon dans leurs échantillons. Pour ces analystes le z-score n'a pas été calculé car la faible abondance de cette espèce dans les échantillons explique le risque de ne pas l'observer dans les cuves. Il faut préciser qu'en raison de sa grande taille, cette espèce, si elle est présente dans la cuve analysée, est certainement prise en compte par l'observateur. Il est nécessaire de rappeler que l'incertitude de la valeur assignée pour cette espèce n'est pas négligeable, du fait du nombre plus réduit d'analystes pris en compte dans les calculs. Certains analystes risquent alors de percevoir un signal d'avertissement ou d'action à tort. Cependant, pour tous les analystes qui ont observé cette espèce, les z-score sont tous compris entre les limites de tolérance n'impliquant aucun signal d'avertissement.

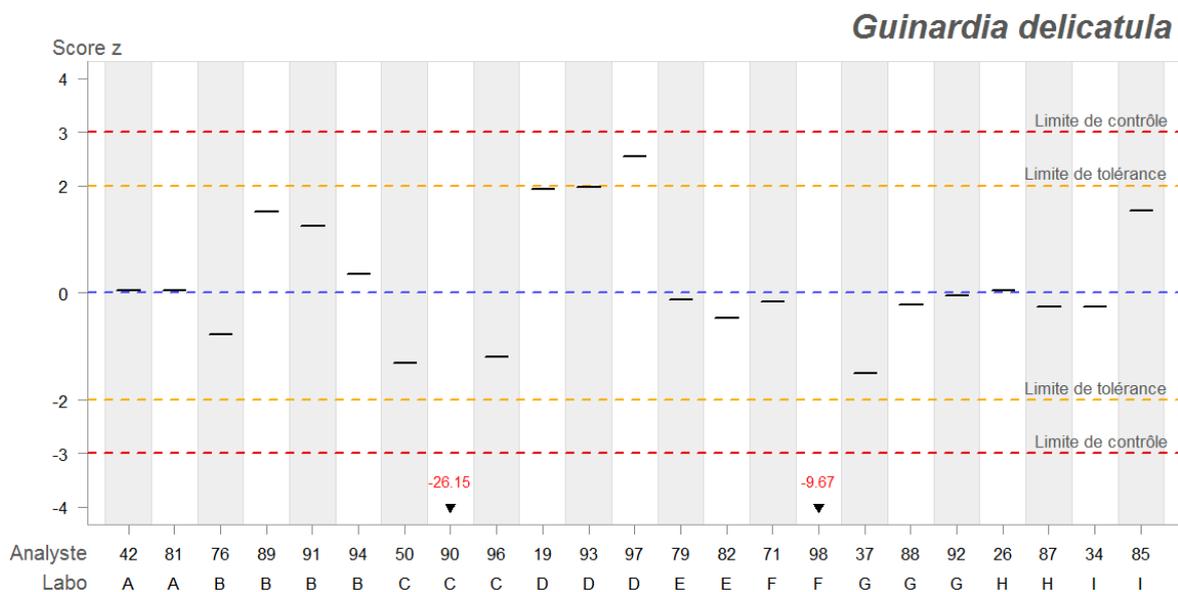


Figure 16 : z scores des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Guinardia delicatula*.

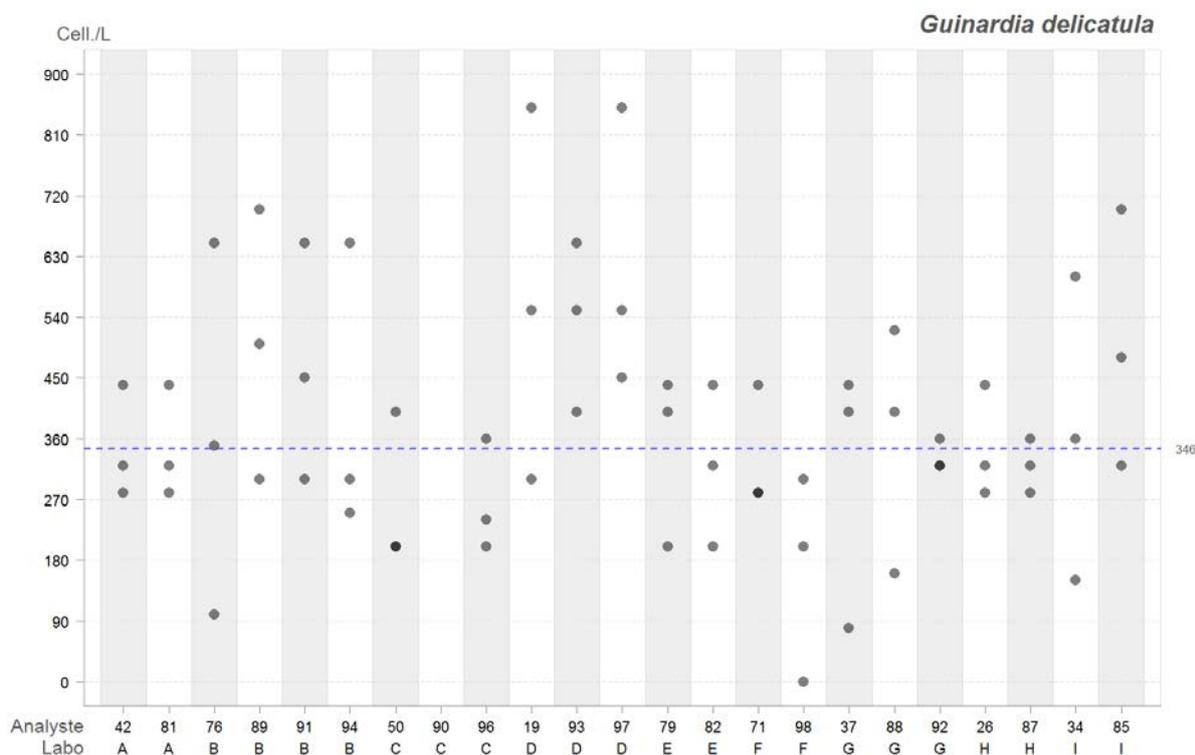


Figure 17 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Guinardia delicatula*.

Comme pour *C. walesii*, mais dans une moindre mesure, l'abondance moyenne de référence de *Guinardia delicatula* est faible. L'analyste **C-90** n'a pas rendu de résultat pour cette espèce et voit son z-score chuter très en dessous de la limite basse de contrôle. L'analyste **F-98**, avec trois résultats inférieurs à la moyenne de référence dont un égal à zéro, voit aussi son z-score dépasser la limite basse de contrôle. Enfin, pour l'analyste **D-97**, le z-score est supérieur à la limite haute de tolérance. Comme cela a été remarqué précédemment, les résultats des trois analystes du laboratoire « D » sont les plus élevés de la série.

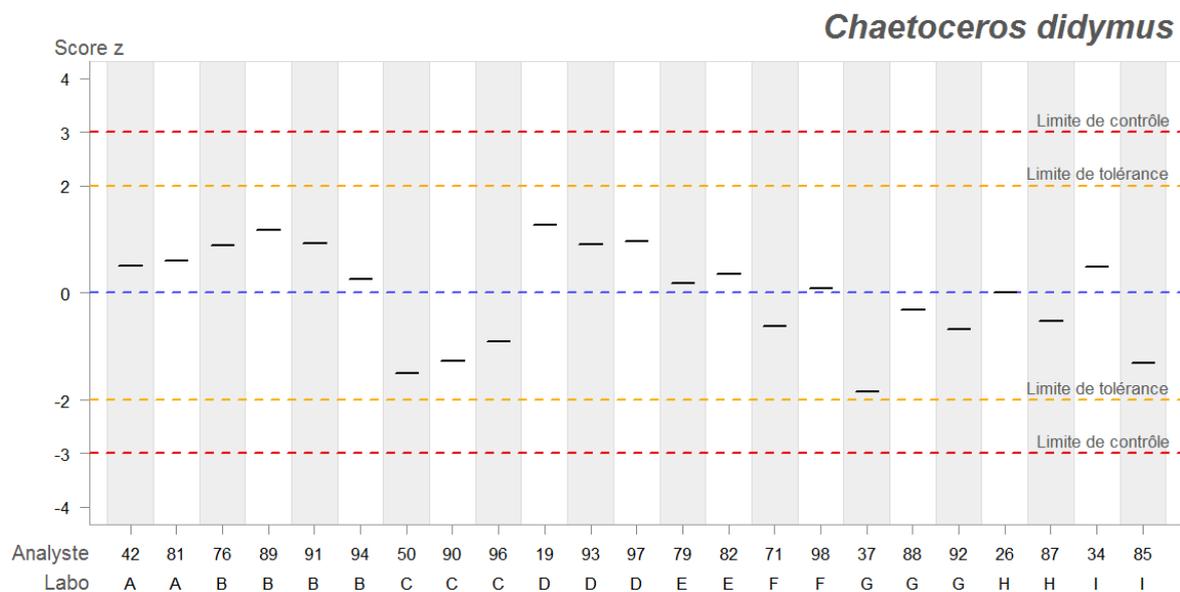


Figure 18 : z scores des analystes, calculés à partir des moyennes des log10 des résultats pour *Chaetoceros didymus*.

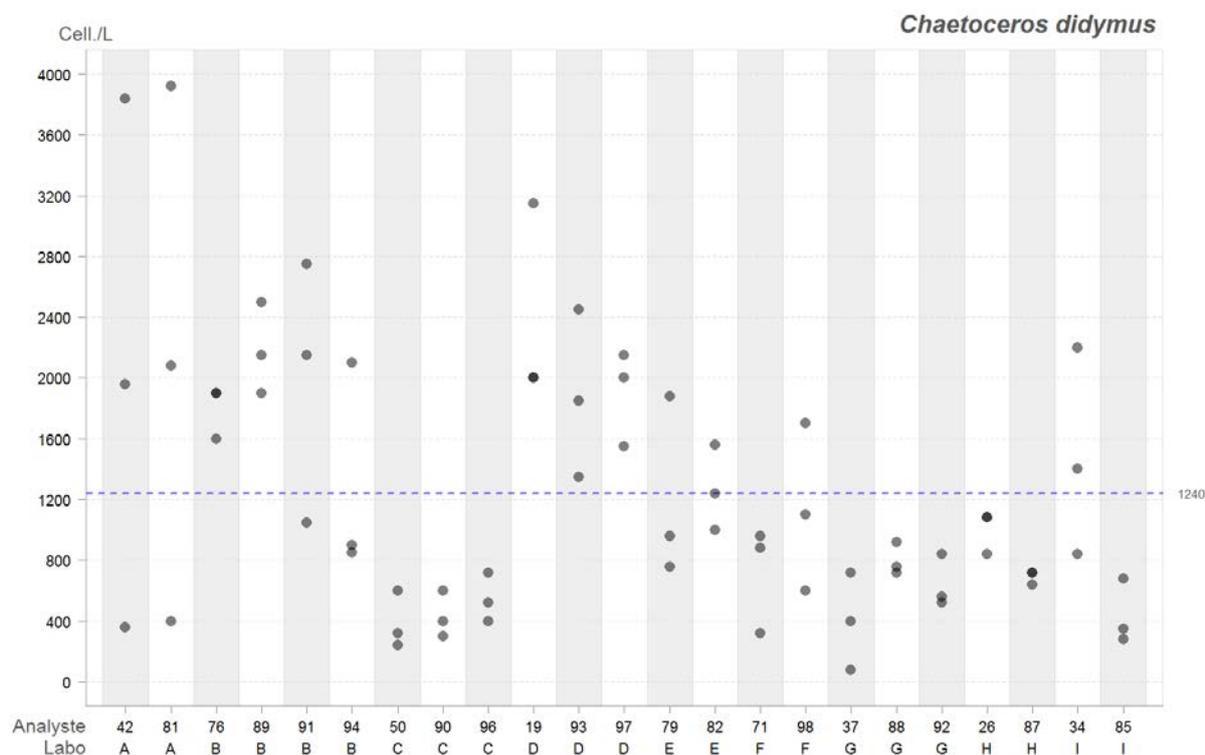


Figure 19 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Chaetoceros didymus*.

Cette espèce a été observée et dénombrée par tous les analystes et tous les z-score sont compris entre les limites de tolérance n'impliquant aucun signal d'avertissement. On remarque une plus grande hétérogénéité dans les résultats des trois répliques du laboratoire « A » que dans les autres laboratoires.

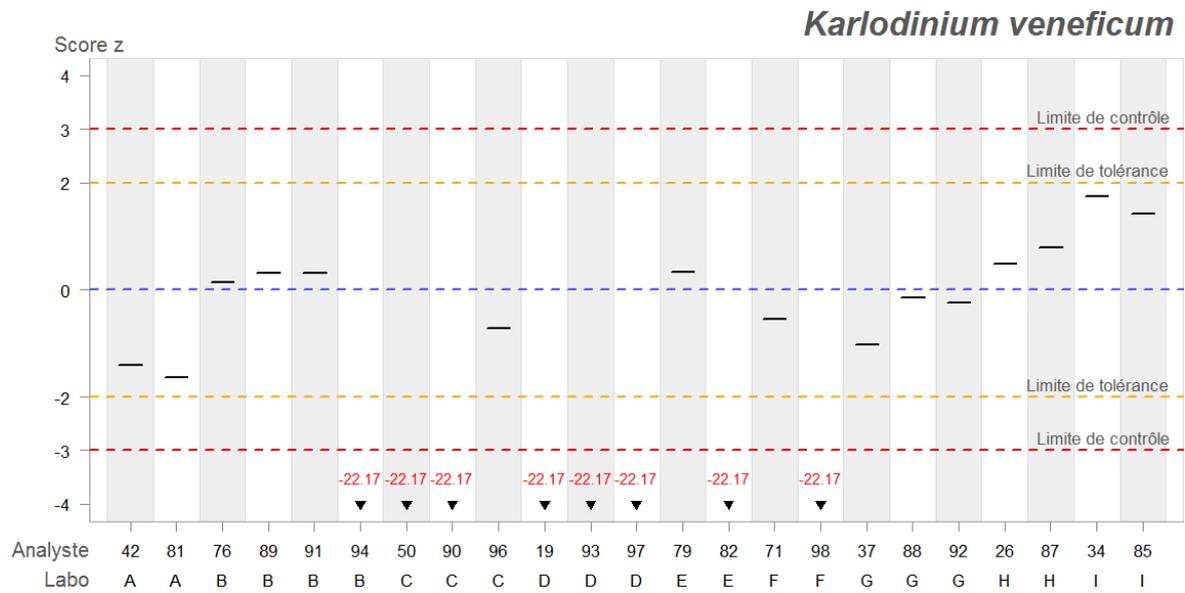


Figure 20 : z scores des analystes, calculés à partir des moyennes des log₁₀ des résultats pour *Karlodinium veneficum*.

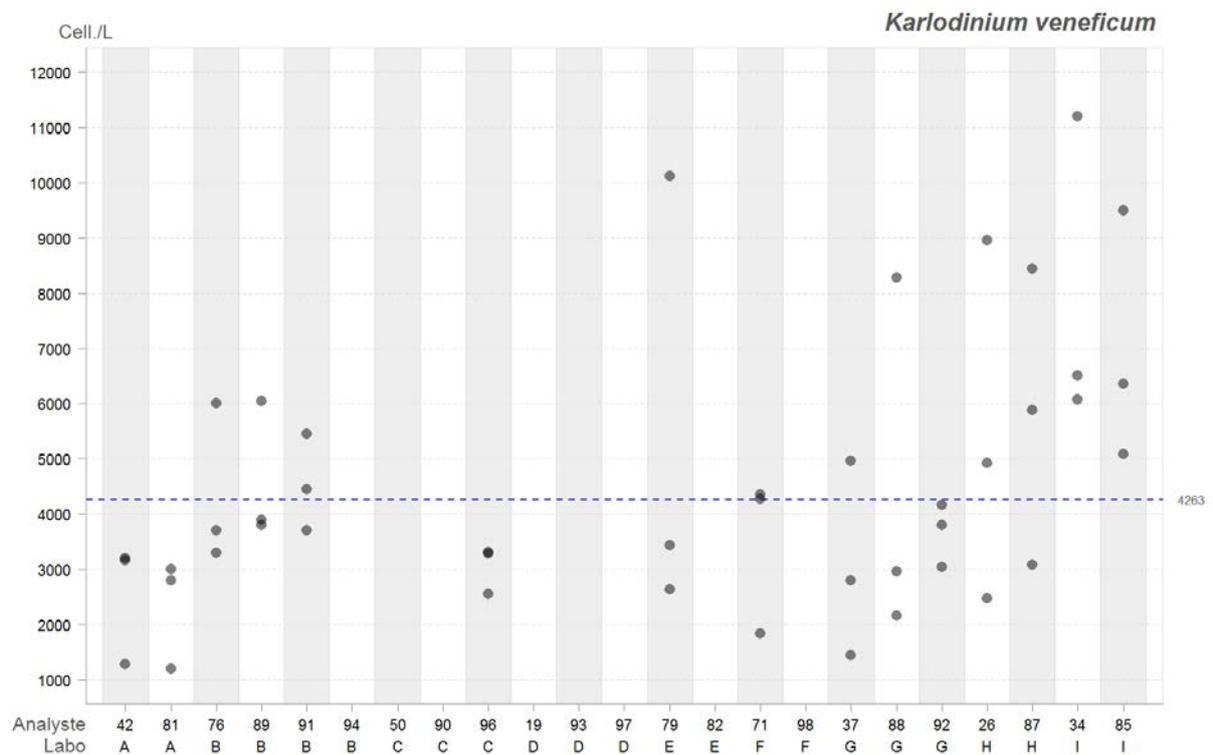


Figure 21 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Karlodinium veneficum*.

Il est nécessaire de rappeler que l'incertitude de la valeur assignée pour cette espèce n'est pas négligeable, du fait du nombre plus réduit d'analystes pris en compte dans les calculs des valeurs assignées. Certains analystes risquent alors de percevoir un signal d'avertissement ou d'action à tort. Huit analystes n'ont pas rendu de résultat, ce qui induit des z-score très inférieurs à la limite de contrôle. Ces signaux d'action ne sont donc pas dus à l'incertitude sur la valeur assignée.

Pour les autres analystes, le z score est compris entre les limites de tolérance, n'impliquant aucun signal d'avertissement.

Rappelons également que cette espèce n'a pas répondu aux critères d'homogénéité et de stabilité dans le cadre des tests réalisés par le Marine Institute, qui n'a donc pas pris en compte les résultats de cette espèce.

Cependant, il nous est apparu important de traiter ces résultats pour souligner ce cas et rappeler que **tous les taxons présents dans l'échantillon doivent être dénombrés, même si leur identification pose problème**.

L'abondance moyenne de référence de 4 263 cell. /L démontre que la présence de ces cellules dans les cuves ne pouvait pas passer inaperçue.

Toutefois, cette espèce peut s'avérer fragile et se détériorer si les conditions de conservation ne sont pas optimales, ou si le délai d'analyse est trop long. Ceci peut être une raison pour laquelle certains analystes ne l'ont pas dénombrée.

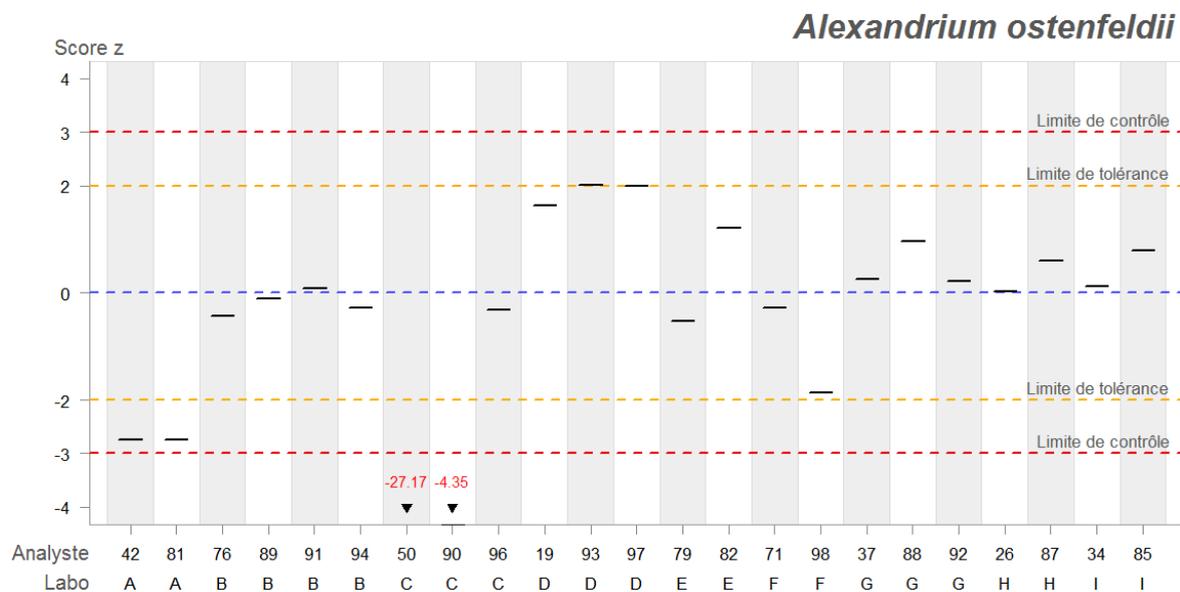


Figure 22 : z scores des analystes, calculés à partir des moyennes des log10 des résultats pour *Alexandrium ostenfeldii*.

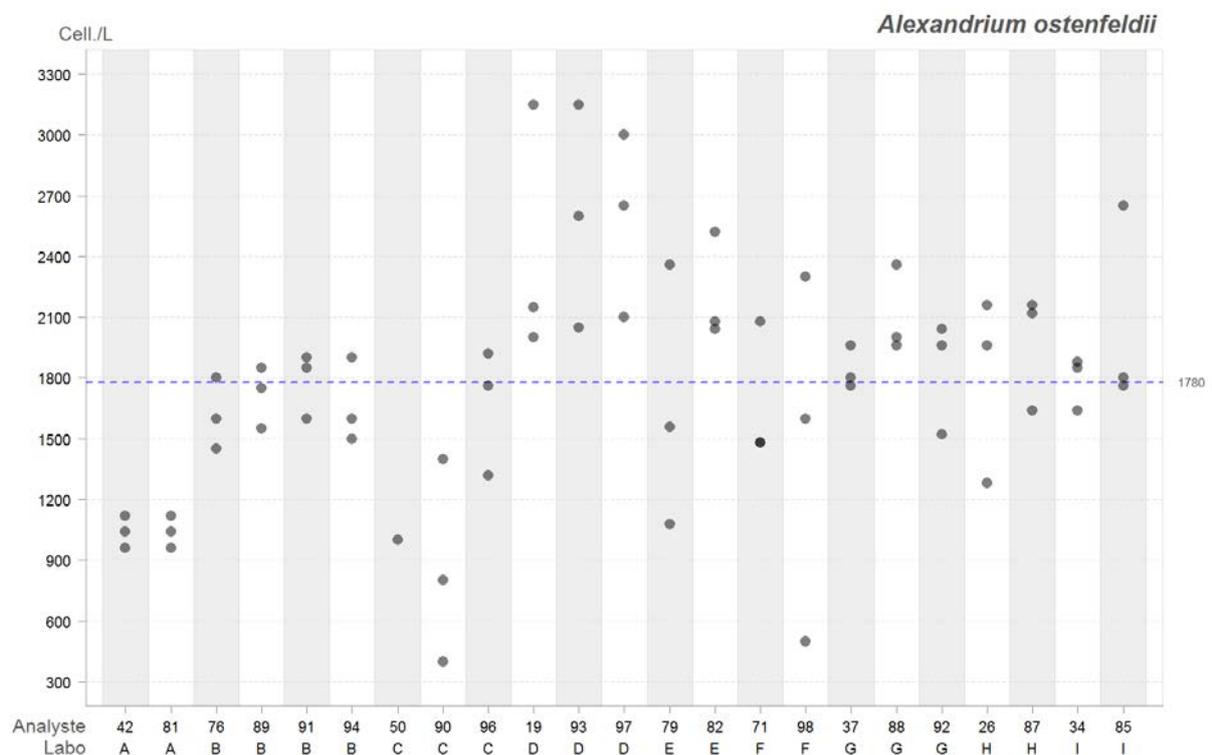


Figure 23 : Abondances des répliques de chaque analyste pour *Alexandrium ostenfeldii*.

L'analyste **C-50** n'a rendu qu'un résultat de dénombrement sur les trois attendus ce qui explique la valeur très basse de son z-score. Pour l'analyste **C-90**, la valeur basse du z-score est expliquée par le fait que les trois dénombrements sont inférieurs à la moyenne de référence dont un résultat très bas. Les résultats des analystes du laboratoire « **A** » sont eux aussi tous inférieurs à la moyenne de référence et leurs z-score dépassent la limite basse de tolérance. Comme pour la plupart des espèces, les valeurs les plus fortes sont celles du laboratoire « **D** », dont deux analyses obtiennent un z score proche ou légèrement supérieur à la limite haute de tolérance. Pour les autres analystes les résultats des trois répliques sont assez homogènes sauf pour l'analyste **F-98** dont un des résultats est très inférieur à la moyenne de référence.

4 DISCUSSION GÉNÉRALE

La proposition d'une liste fermée d'espèce pour le rendu des résultats présente des inconvénients, car cette liste réduite peut être interprétée comme une aide à l'identification des espèces et constituer un biais par rapport à la méthode. Cette liste peut également présenter des « pièges » avec plusieurs réponses correctes pour le même taxon (synonymes, groupement de taxons...). L'utilisation de ce format de rendu des résultats permet en revanche, une meilleure lisibilité des résultats des participants, les erreurs de transcription sont évitées et aucune interprétation n'est nécessaire car elle empêche les identifications comme par exemple : dinoflagellé non identifié, diatomée centrique, dinoflagellé nu, etc.

Concernant les **résultats qualitatifs**, la majorité des analystes a su reconnaître correctement les taxa au niveau de l'espèce (72.5 % des réponses globales). Certains ont identifié correctement le genre mais pas l'espèce (39 cas soit 18.8 %). Les **identifications correctes** au niveau des genres ou espèces cumulés représentent donc **91.3%** des résultats. L'absence de résultat concerne 7,3% des cas et les identifications incorrectes au niveau du genre 1,4%. Cependant, ces résultats doivent être nuancés et il apparaît clairement des performances moyennes pour certains taxons comme le genre *Alexandrium* pour lequel il convient d'identifier un axe d'amélioration.

Dinophysis acuta a été identifié correctement par tous les participants. *Prorocentrum triestinum* également à l'exception d'un analyste qui l'a confondu avec *P. micans*. *Thalassiosira gravida* à majoritairement bien été identifié, seuls cinq analystes se sont arrêtés au niveau du genre.

Tous les analystes ont reconnu le genre *Pseudo-nitzschia*. L'identification de l'espèce *P. australis* a été réalisée par le Marine Institute par sonde génétique spécifique (qPCR Roche Lightcycler). Cette espèce faisant partie du complexe *P. seriata*, les identifications *P. australis* et *P. seriata complex* sont considérées comme correctes au niveau de l'espèce dans le cadre de cet exercice. Néanmoins, dans le cadre du REPHY, il est demandé de tenter une identification plus fine que le « complexe *P. seriata* » qui s'applique à tous les taxons de largeur supérieure à 3 µm et n'est finalement pas suffisamment informatif. Le niveau d'identification requis pour le genre *Pseudo-nitzschia* est donc plus fort au sein du REPHY que celui toléré dans le cadre de l'IPI. Néanmoins, il apparaît que des erreurs sont commises par certains analystes.

Lorsqu'elle a été observée, l'espèce *Coscinodiscus wailesii* a correctement été identifiée sauf par trois analystes qui l'ont confondue avec *C. granii*.

Pour *Guinardia delicatula*, deux analystes se sont limités au genre. Ce genre renferme des espèces de morphologies très variées. Il serait souhaitable que ces analystes perfectionnent leurs connaissances sur l'espèce *G. delicatula*.

Sept analystes ont confondu *Chaetoceros decipiens* avec *C. didymus*. Tous les autres participants ont correctement identifié cette espèce.

Le genre *Alexandrium* a été correctement identifié par tous, sauf par un analyste qui a reconnu *Pentaparsodinium*. Cependant, au niveau spécifique, les résultats montrent des erreurs d'identification (57 % d'identifications erronées dans le genre) et indiquent un besoin manifeste de rappels sur la taxinomie de ce genre et des méthodes d'étude des thèques.

Karlodinium veneficum qui a posé le plus de problème avait été écarté par le Marine Institute en raison de ses mauvais résultats aux tests d'homogénéité et de stabilité. Nous avons opté pour conserver ces résultats dans nos traitements afin de pointer l'absence d'identification et de dénombrement de ces cellules présentes toutefois à une abondance moyenne de référence non négligeable de 4 263 cell. /L. En effet, huit analystes n'ont pas rendu de résultat pour ce taxon, ce qui induit des z scores très inférieurs à la limite de contrôle. S'il est très difficile d'identifier cette espèce, il fallait tout de même fournir un résultat de dénombrement compte tenu de sa présence notable dans l'échantillon, même avec une identification incertaine ou erronée. Notons toutefois que cette espèce peut s'avérer fragile et se détériorer si les conditions de conservation ne sont pas optimum, ou si le délai d'analyse est trop long. Ceci peut être une des raisons pour lesquelles certains analystes ne l'ont pas dénombrée. Notons aussi, que malgré les mauvais résultats aux tests d'homogénéité et de stabilité, ainsi qu'une incertitude non négligeable de la valeur assignée pouvant induire des signaux à tort, les résultats rendus par nos participants, comparés entre eux, sont tous compris entre les limites de tolérance des z-scores.

Pour pouvoir identifier au niveau de l'espèce des cellules d'*Alexandrium*, il est nécessaire de pouvoir observer la tabulation des plaques soit par dissection manuelle, ce qui est destructeur pour les cellules, soit grâce à l'épi-fluorescence et dans ce cas il n'y a pas destruction du matériel (seuls trois laboratoires sont équipés). Dans la mesure où plusieurs analystes doivent se partager les échantillons, les dissections ne sont pas aisément réalisables dans l'immédiat. En revanche, pour toute espèce non identifiable directement au moment du comptage, lorsque tous les analystes ont fini leurs dénombrements, il est recommandé de revenir sur les échantillons qu'on aura pris soin de récupérer et conserver dans un but d'analyse qualitative.

Concernant les **résultats quantitatifs**, on remarque que, globalement et presque pour tous les taxons, les résultats des dénombrements fournis par le laboratoire « D » sont les maxima de tous les résultats. Alors que c'est globalement l'inverse pour le laboratoire « C ».

Six analystes n'ont détecté *Coscinodiscus wailesii* dans aucun des échantillons. Comme ce taxon a été introduit dans les échantillons à une concentration proche de la limite de détection de la méthode d'essai, il est possible qu'il n'y en ait pas eu dans certains réplicas. Les absences de résultats de ces analystes pour ce taxon ne sont donc pas prises en compte pour les calculs de la moyenne et de l'écart-type de référence et ces analystes ne se voient pas attribuer un z score pour cette espèce. Pour tous les analystes qui ont observé ce taxon, tous les z scores sont compris entre les limites de tolérance.

En excluant les résultats obtenus pour *Karlodinium veneficum*, huit z scores sont inférieurs à la limite de contrôle, ce qui induit un signal d'action pour quatre analystes (C-50, C-90, F-98 et I-85) et neuf z-scores dépassent les limites de tolérance impliquant un signal d'avertissement pour cinq analystes supplémentaires aux quatre déjà cités (A-42, A-81, D-19, D-93 et D-97). Les quatorze autres analystes ont tous leurs z-scores compris entre les limites de tolérance n'impliquant aucun signal d'avertissement (cf. ANNEXE IV).

Tous z score < 2	1 seul z score > 2	Plusieurs z score > 2	1 seul z score > 3	Plusieurs z scores > 3
14 analystes	4 analystes A-42, A-81, D-19, D-97	1 analyste D-93	1 analyste I-85	3 analystes C-50, C-90, F-98

5 CONCLUSION

C'est la quatrième année de participation du personnel du réseau d'analystes du REPHY à l'IPI et la deuxième année de l'extension de cet essai à une Comparaison Inter-Analystes interne à l'Ifremer impliquant une majorité des analystes du REPHY.

Ces résultats font l'objet de rapports 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 pour 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'IPI, 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 car les essais sont menés par un laboratoire accrédité, le Marine Institut de Galway apporte cette assurance.

Avec 91.3% d'identifications correctes des taxa, les résultats reçus confirment les compétences des analystes dans l'identification du phytoplancton marin à ce niveau. La plupart des taxons présents ont pu être reconnus et les difficultés d'identification rencontrées lors de cet essai 2016 concernent principalement l'espèce *Karlodinium veneficum*, ce qui n'est pas surprenant car ce dinoflagellé de petite taille n'est pas identifiable facilement en microscopie optique. La liste fermée d'espèces proposée pour le rendu des résultats a permis à certains analystes de déduire cette espèce par élimination et par l'identification de la plus probable.

Le fait que seuls des taxons d'une liste fermée puissent être choisis est néanmoins discutable, car cette liste représente une aide et constitue un biais par rapport à la méthode. Elle peut également présenter des « pièges » avec plusieurs réponses correctes pour le même taxon (synonymes, groupement de taxons...). mais permet en revanche, une meilleure lisibilité des résultats des participants, d'éviter les erreurs de transcription et aucune interprétation n'est nécessaire car elle empêche les identifications comme par exemple : dinoflagellé non identifié, diatomée centrique, dinoflagellé nu, etc.

L'exercice révèle en outre qu'au niveau spécifique, des efforts restent à faire afin d'améliorer les résultats pour des taxons tels que les genres *Pseudo-nitzschia* ou *Alexandrium* car les résultats sont moyens. En effet, autant l'identification générique peut se faire avec l'observation globale des cellules sans technique particulière, autant la détermination spécifique nécessite la prise en compte de détails morphologiques qui requièrent une observation poussée. Comme l'ont montré les résultats, la mesure de la taille des cellules pourrait, dans une certaine mesure, limiter les erreurs. La mise en place d'une formation ciblée rappelant les critères d'identification et méthodes à utiliser pourrait permettre d'améliorer ces performances.

Concernant les dénombrements, l'analyse des résultats obtenus cette année permet principalement de mettre en évidence l'importance de la bonne application des protocoles et des instructions.

Il convient de souligner qu'une erreur est apparue lors de cet essai dans les cas où dès que l'identification d'une espèce a posé problème et n'a pu aboutir, son dénombrement n'a pas été réalisé par certains analystes. Ainsi, soit aucun résultat n'a été fourni, soit le dénombrement a été réalisé sur uniquement une partie des trois réplicas. Dans une telle situation, l'analyste doit dénombrer dans chaque réplica tous les types de cellules qu'il distingue, identifiés ou non dans l'immédiat, et revenir ultérieurement après les dénombrements, dans les échantillons qu'il a pris soin de récupérer et de conserver dans de bonnes conditions, pour une analyse qualitative des cellules qui ont posé difficulté. Les phases de dénombrement et d'identification taxinomique peuvent être complètement dissociées dès lors que l'analyste associe chaque comptage à un type de cellules (morphotype). Pour la phase d'identification, il convient d'observer le taxon dans différentes vues, voire de disséquer la cellule, ce qui est destructeur et incompatible avec le dénombrement qu'il conviendra de réaliser au préalable. Dans de nombreux cas, l'identification spécifique requière une observation approfondie qui ne peut se faire lors du comptage.

Un autre cas, signalé par l'analyste F-98, concerne un défaut de conservation et une contamination (bactéries et ultra-plancton) d'un échantillon. Cet analyste a tout de même rendu les comptages du réplica dégradé, ce qui a impacté ses z scores. Un échantillon dégradé ne peut plus être analysé, particulièrement quantitativement. Il est donc primordial de veiller à la bonne conservation des échantillons et aussi à ne pas les contaminer. Si cela arrive, il faut utiliser le quatrième échantillon de secours. Dans tous les cas, le volume de chaque réplica permet la mise en décantation de 2 cuves de 20 ou 25 ml. Les laboratoires disposent de 4 réplicas, ce qui permet de mettre à décanter au moins 8 cuves. Pour un laboratoire comptant deux analystes, c'est amplement suffisant. Au delà de deux analystes il est souhaitable de se coordonner et de programmer les analyses de chaque analyste dans un délai rapproché. Si la même cuve est analysée par plusieurs analystes il faut bien veiller à la protéger de la chaleur et de la lumière.

Lors de l'essai réalisé en 2015, les risques liés aux conditions ambiantes de stockage, aux délais d'analyse et aux traitements de préparation à l'analyse (homogénéisation, mise en cuve) avaient été pointés. Il est rappelé que la maîtrise de la préservation des échantillons, ainsi que de la préparation des cuves à décanter sont cruciaux.

Une autre difficulté peut engendrer des écarts dans les résultats, lorsqu'un laboratoire est implanté sur deux sites géographiquement éloignés nécessitant le reconditionnement et le transport ou l'expédition des échantillons. Dans l'organisation future, les inscriptions à l'IPI tiendront compte de cela.

ANNEXE I Bibliographie

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/>

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>

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.

Rafael Salas & Jacob Larsen (2016). PHY-ICN-16-MI1 VR 1.0. **International Phytoplankton Intercomparison proficiency test in the abundance and composition of marine microalgae 2016 report** <http://www.nmbaqcs.org/media/1676/phy-icn-16-mi1-final-report-vr1.pdf>

Normes

NF ISO 13528 (octobre 2015). **Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires.**

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.

ANNEXE II Marine Institute – IPI - International Phytoplankton Intercomparison 2016 -
Instructions



IPI Phytoplankton Proficiency Test PHY-ICN-16-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 has continued under the Marine Institute- IOC -BEQUALM-NMBAQC banner until 2015.

From 2016 onwards, the programme BEQUALM no longer exist and the intercomparison exercise has changed its name to IPI (International Phytoplankton Intercomparison) with the continued collaboration of the IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae and in association with NMBAQC in the UK.

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 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: BEQ16 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 22nd 2016.

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.

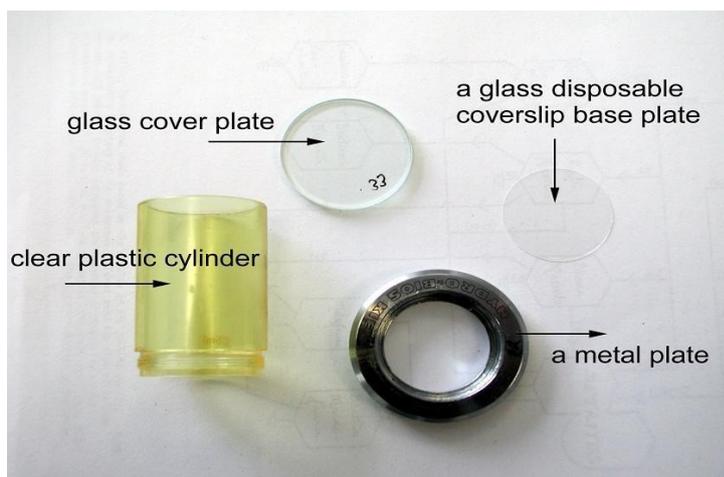


Fig 1: Sedimentation counting chamber

- All sedimentation chambers should be cleaned before start
- Place a new not used disposable cover slip base plate inside a cleaned metal plate.
- 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.
- 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.

- To set up a sample for analysis or sub-sample. Firmly invert the sample 100 times to ensure that the contents are homogenised properly.
 - 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.
 - 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.
 - Label the sedimentation chamber with the sample number from the sterilin tube.
 - Use a horizontal surface to place chambers protected from vibration and strong sunlight.
- 1.1 Allow the sample to settle for a minimum of twelve hours.
 - 1.2 Set the chamber on the inverted microscope and analyse.
 - 1.3 Enumeration and identification results for each sample are to be entered in the Excel workbook Form 2 enumeration and identification results log sheet.
 - 1.4 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 consisting of 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 must be homogenized following the IOC Manual on Harmful Marine Algae technique of 100 times sample inversion before settlement.

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.

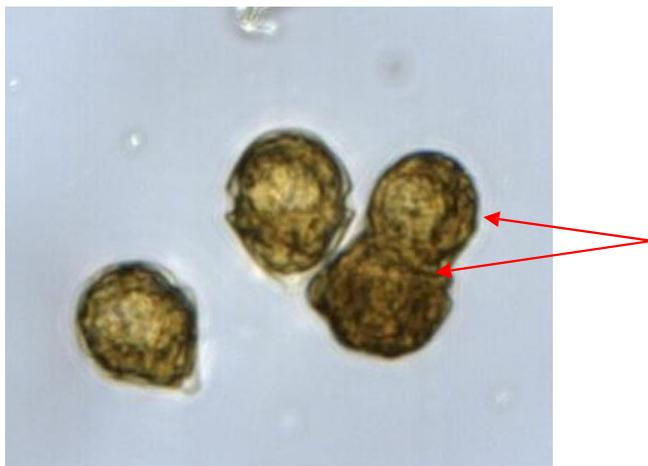


Figure 1: Two Cells fusing

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

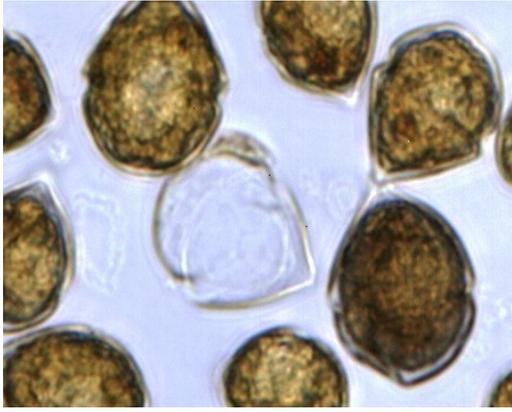


Figure 2: Empty theca

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.

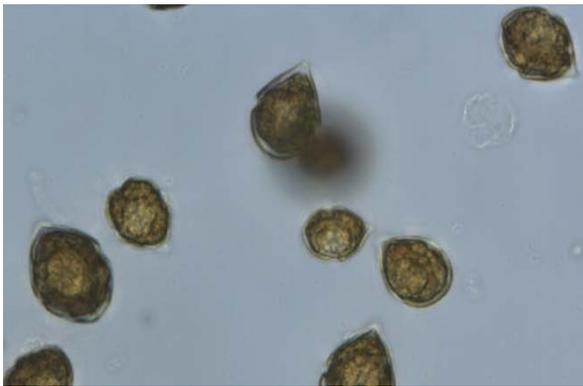


Figure 3: Big versus small cells



Figure 4: Plasmolised cell

When counting diatom cell chains, only count fully intact cells on the chains (fig.5).



Figure 5

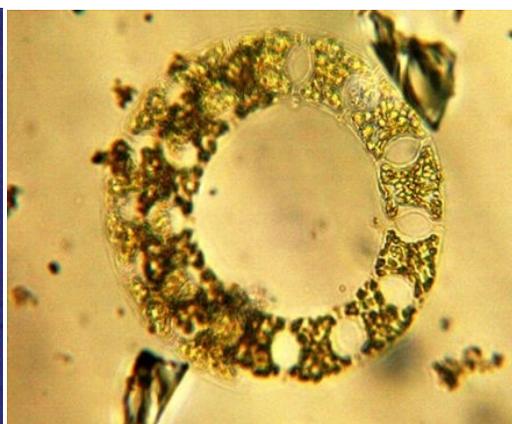


Figure 6

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. Plasmolised cells should not be counted
- d. When counting cell chains, do not count half or broken cells which are part of the chain
- e. if you find single diatom cells in the samples and these are partially broken, do count them as one cell.
- 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 2016. 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 have

already registered between 2011-2015 then 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 IPI2016. 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 (IPI2016) 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, etc..). 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 22nd 2016.

Résultats bruts de chaque réplique en nombre de cellule par litre.

CODE Labo-Analyst	<i>Thalassiosira gravida</i>			<i>prorocentrum triestinum</i>			<i>Pseudo-nitzschia</i>			<i>Dinophysis acuta</i>			<i>Coscinodiscus walesii</i>			<i>Guinardia delicatula</i>			<i>Chaetoceros didymus</i>			<i>Karlodinium veneficum</i>			<i>Alexandrium ostensfeldii</i>		
A-42	6120	5280	5800	3200	4160	2920	3480	5520	4320	2840	2640	2360	40	40	0	440	320	280	1960	3840	360	3160	1280	3200	960	1040	1120
A-81	6000	5400	5600	3280	4000	2560	3480	5520	4320	2840	2640	2360	40	40	0	440	320	280	2080	3920	400	3000	1200	2800	960	1040	1120
B-76	6600	5850	6050	2300	4000	4600	4300	7750	7100	2900	3200	2450	50	0	50	350	100	650	1600	1900	1900	6000	3700	3300	1450	1800	1600
B-89	8100	6300	6650	4750	5500	6000	4600	8150	7750	3200	3300	2500	50	0	50	500	300	700	1900	2150	2500	6050	3900	3800	1550	1850	1750
B-91	7100	6350	6600	4200	6550	6150	4200	7350	7700	3150	2400	2550	50	0	50	450	300	650	2150	1050	2750	5450	4450	3700	1600	1850	1900
B-94	3550	5500	6300	3000	1400	4450	4350	7700	6150	3650	3100	2500	50	50	50	250	300	650	850	900	2100				1500	1600	1900
C-50		4440	4840	2240	3520	2680	7320	5720	5240	3120	2680	3200				200	200	400	240	600	320						1000
C-90	3700	4300	2800	1600	2100	2200	3500	2900	4100	2600	3900	2500	200	200	200				400	300	600				800	1400	400
C-96	5240	5640	5520	3200	4880	4920	5000	4680	7360	2640	2840	3440	40	0	120	200	240	360	720	520	400	3280	3320	2560	1760	1320	1920
D-19	6850	10550	8450	6600	7800	12250	9200	7200	8650	4100	2500	2050	50	200	100	550	300	850	2000	2000	3150				2000	3150	2150
D-93	5950	6750	10200	6600	6600	6250	7300	8900	6400	3850	4050	2500	150	50	200	550	650	400	2450	1350	1850				2600	2050	3150
D-97	8450	5850	10050	10600	6900	7950	9150	6850	7300	2150	3750	2500	100	150	200	850	550	450	2150	1550	2000				2100	2650	3000
E-79	6720	7000	6200	5640	4040	5160	4680	4560	8440	3320	2640	2320				400	200	440	1880	960	760	10120	2640	3440	2360	1560	1080
E-82	5360	6200	8120	4760	3600	4840	4760	5080	7880	3040	2880	2760				200	320	440	1240	1000	1560				2520	2040	2080
F-71	4120	4960	5680	2960	6480	5440	5040	12400	4080	2480	2640	3520	80	160	40	280	440	280	880	960	320	4280	1840	4360	1480	2080	1480
F-98	3700	4900	3600	5000	6300	1200	7300	7600	1100	2500	3200	500				200	300	0	1700	1100	600				2300	1600	500
G-37	6400	6600	5400	3400	4720	1880	4400	6480	6640	2280	3880	2360	80	80	0	440	80	400	720	80	400	4960	2800	1440	1960	1760	1800
G-88	7160	7520	6400	5640	5560	2960	4400	6320	6480	2120	4120	2360	80	80	40	400	160	520	760	720	920	8280	2960	2160	2360	2000	1960
G-92	6280	6000	5800	3040	4720	5200	6160	6640	5920	2600	2960	3040	80	80	40	360	320	320	560	840	520	3040	4160	3800	1520	1960	2040
H-26	3320	5840	7320	3960	4800	5480	4240	4320	5080	2960	3200	3160				320	440	280	1080	1080	840	4920	8960	2480	1280	1960	2160
H-87	4640	3960	6400	5200	4800	6080	4840	5360	4920	3280	3400	2960				360	320	280	720	640	720	8440	5880	3080	2160	1640	2120
I-34	5300	5800	7880	7650	5120	5200	4400	7360	5160	3300	3000	3120	50	0	120	150	600	360	2200	840	1400	6500	11200	6080	1850	1880	1640
I-85	3720	4080	6350	5400	6440	6550	5120	7520	6850	2440	2840	1450	200	80	150	480	320	700	680	280	350	5080	6360	9500	1760	1800	2650

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

CODE Labo-Analyst	<i>Thalassiosira gravida</i>		<i>prorocentrum triestinum</i>		<i>Pseudo-nitzschia</i>		<i>Dinophysis acuta</i>		<i>Coscinodiscus wailiesii</i>		<i>Guinardia delicatula</i>		<i>Chaetoceros didymus</i>		<i>Karlodinium veneficum</i>		<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	
	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	Moyenne des Log10	Z score
A-42	3.758	-0.089	3.530	-0.712	3.640	-1.688	3.416	-1.183	1.068	-1.039	2.532	0.042	3.144	0.511	3.371	-1.408	3.016	-2.744
A-81	3.753	-0.141	3.509	-0.845	3.640	-1.688	3.416	-1.183	1.068	-1.039	2.532	0.042	3.171	0.603	3.334	-1.631	3.016	-2.744
B-76	3.789	0.258	3.542	-0.634	3.791	0.452	3.452	-0.067	1.133	-0.912	2.452	-0.782	3.254	0.884	3.622	0.137	3.207	-0.433
B-89	3.844	0.847	3.732	0.561	3.821	0.872	3.474	0.599	1.133	-0.912	2.674	1.509	3.336	1.165	3.651	0.318	3.234	-0.110
B-91	3.825	0.640	3.743	0.630	3.792	0.462	3.428	-0.801	1.133	-0.912	2.648	1.240	3.264	0.920	3.651	0.318	3.250	0.090
B-94	3.697	-0.754	3.424	-1.380	3.771	0.169	3.484	0.906	1.699	0.201	2.563	0.360	3.069	0.254	0.000	-22.166	3.220	-0.278
C-50	2.444	-14.400	3.442	-1.268	3.780	0.298	3.476	0.659			2.401	-1.309	2.555	-1.496	0.000	-22.166	1.000	-27.174
C-90	3.550	-2.355	3.290	-2.227	3.540	-3.097	3.468	0.418	2.301	1.384	0.000	-26.150	2.619	-1.276	0.000	-22.166	2.884	-4.348
C-96	3.738	-0.308	3.629	-0.090	3.745	-0.196	3.470	0.495	1.227	-0.726	2.413	-1.194	2.725	-0.915	3.482	-0.724	3.216	-0.317
D-19	3.929	1.774	3.933	1.831	3.919	2.259	3.441	-0.418	2.000	0.793	2.716	1.942	3.367	1.268	0.000	-22.166	3.377	1.632
D-93	3.871	1.144	3.812	1.064	3.873	1.604	3.530	2.335	2.059	0.908	2.718	1.971	3.262	0.913	0.000	-22.166	3.408	2.008
D-97	3.899	1.448	3.922	1.757	3.887	1.799	3.435	-0.603	2.159	1.105	2.774	2.549	3.275	0.955	0.000	-22.166	3.408	1.998
E-79	3.822	0.608	3.690	0.298	3.752	-0.105	3.436	-0.564			2.516	-0.128	3.046	0.176	3.654	0.340	3.200	-0.519
E-82	3.810	0.486	3.640	-0.020	3.760	0.010	3.461	0.205			2.483	-0.462	3.096	0.345	0.000	-22.166	3.343	1.217
F-71	3.688	-0.845	3.673	0.189	3.802	0.605	3.454	-0.006	1.903	0.602	2.513	-0.158	2.811	-0.624	3.512	-0.538	3.220	-0.280
F-98	3.605	-1.753	3.526	-0.737	3.595	-2.315	3.201	-7.806			1.593	-9.674	3.017	0.077	0.000	-22.166	3.088	-1.870
G-37	3.786	0.220	3.493	-0.943	3.759	-0.003	3.440	-0.446	1.269	-0.644	2.383	-1.500	2.454	-1.837	3.434	-1.020	3.264	0.263
G-88	3.846	0.871	3.656	0.082	3.752	-0.104	3.438	-0.503	1.803	0.405	2.507	-0.212	2.901	-0.318	3.575	-0.152	3.322	0.963
G-92	3.780	0.153	3.624	-0.117	3.795	0.500	3.456	0.061	1.803	0.405	2.522	-0.059	2.796	-0.673	3.561	-0.238	3.261	0.226
H-26	3.717	-0.528	3.673	0.188	3.656	-1.454	3.492	1.158			2.532	0.042	2.997	0.010	3.680	0.494	3.245	0.025
H-87	3.690	-0.824	3.727	0.531	3.702	-0.808	3.506	1.594			2.503	-0.259	2.840	-0.523	3.728	0.793	3.292	0.597
I-34	3.795	0.315	3.770	0.800	3.741	-0.258	3.497	1.298	1.259	-0.663	2.504	-0.252	3.138	0.488	3.882	1.741	3.252	0.114
I-85	3.661	-1.138	3.786	0.902	3.807	0.674	3.334	-3.703	2.127	1.042	2.677	1.544	2.608	-1.314	3.829	1.415	3.308	0.792
Moyenne de référence Xs	3.766		3.643		3.759		3.454		1.597		2.528		2.994		3.599		3.243	
Ecart-type de référence $\hat{\sigma}_s$	0.092		0.159		0.071		0.033		0.509		0.097		0.294		0.162		0.083	

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);
- 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