

ODE/UL
LER Arcachon

BOISMAL Katleen

ifremer

Evaluation des performances de la méthode de dosage de la chlorophylle *a* en milieu marin par fluorimétrie



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

Evaluation des performances de la méthode de dosage de la chlorophylle a en milieu marin par fluorimétrie

Table des matières

1. Introduction	14
1.1. Les principales chlorophylles du phytoplancton	14
1.2. La structure des chlorophylles <i>a,b,c</i>	14
1.3. Les principaux produits de dégradation des chlorophylles.....	15
1.4. Méthode appliquée au laboratoire	16
1.4.1. Protocole.....	16
1.4.2. Dosage de la chlorophylle <i>a</i> par fluorimétrie.....	16
1.5. Domaine d'application	19
2. Evaluation des performances de la méthode selon les normes NF T90-210 : 2009 et NF V03-110 : 2010	20
2.1. Etude de la fonction d'étalonnage (Plan A de la norme NF T90-210 (2009))	20
2.1.1. Organisation du plan de l'étude	22
2.1.2. Résultats et commentaires	22
2.2. Etude de la limite de quantification présumée (Plan B selon la norme NF T90 210 : 2009)	24
2.2.1. Limite de quantification présumée choisie	25
2.2.2. Organisation des essais.....	25
2.2.3. Résultats et conclusion :	25
2.3. Etude de rendements (Plan C selon la norme NF T90 210 : 2009).....	26
2.3.1. Organisation des essais.....	27
2.3.2. Résultats et commentaires	27
2.4. Etude des interférences	28
2.5. Evaluation de l'exactitude (justesse et fidélité) de la méthode.....	29
2.5.1. Evaluation de l'exactitude de la méthode d'analyse sans l'étape d'extraction....	31
2.5.2. Evaluation de la fidélité de la méthode pour les étapes de {filtration + extraction}	33
2.6. Evaluation de l'incertitude de la méthode.....	34
2.6.1. Résultats et commentaires	36
3. Conclusion	38

Définition des termes utilisés dans ce document

Ces définitions sont issues du Guide ISO/CEI 99 version 2007 ¹.

Exactitude : étroitesse d'accord entre des résultats et la valeur de référence acceptée. Le terme « exactitude » appliquée à un ensemble de résultats résulte d'une combinaison de composantes aléatoires (fidélité) et d'une erreur systématique globale ou relative à une composante (biais).

Fidélité : étroitesse d'accord entre les résultats d'essais indépendants obtenus sous des conditions stipulées.

Conditions de répétabilité : conditions dans lesquelles les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

Conditions de reproductibilité : conditions dans lesquelles les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

Conditions de fidélité intermédiaire : conditions dans lesquelles les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode avec des changements de conditions parmi lesquelles : opérateur, étalonnage, équipements, environnement, temps écoulé entre mesures.

Justesse : étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence.

Valeur de référence acceptée : valeur qui sert de référence, agréée pour une comparaison et qui résulte :

- D'une valeur théorique ou établie, fondée sur les principes scientifiques (a);
- D'une valeur assignée ou certifiée, fondée sur les travaux expérimentaux d'une organisation nationale ou internationale (b);
- D'une valeur de consensus ou certifiée, fondée sur un travail expérimental en collaboration et placée sous les auspices d'un groupe scientifique ou technique (c);
- Dans les cas où a), b), et c) ne sont pas applicables, de l'espérance de la quantité (mesurable), c'est-à-dire de la moyenne d'une population spécifiée de mesures.

Méthode d'analyse : procédure écrite décrivant l'ensemble des moyens et modes opératoires nécessaires pour effectuer l'analyse de l'analyte, c'est-à-dire : domaine d'application, principe et/ou réactions, définitions, réactifs, appareillage, mode opératoires, expression des résultats, fidélité, rapport.

¹ ISO/IEC Guide 99 version 2007. Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM)

Ecart-type de répétabilité : écart-type de nombreuses répétitions obtenues dans un seul laboratoire par un même opérateur sur un même instrument, c'est-à-dire dans des conditions de répétabilité.

Ecart-type de fidélité intermédiaire : écart-type de répétitions obtenues par le même laboratoire dans des conditions de fidélité intermédiaire, c'est-à-dire avec des changements de conditions, parmi lesquelles : opérateur, étalonnage, équipements, environnement, temps écoulé entre mesures.

Limite de quantification de la méthode : plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une exactitude définie.

Fonction d'étalonnage : fonction mathématique qui relie une valeur d'information à une grandeur, par exemple la concentration en analyte, à l'intérieur d'un certain intervalle.

EMA (écart maximal acceptable) : valeurs extrêmes d'une erreur acceptable sur un résultat.

Remerciements

Tout d'abord, mes remerciements s'adressent à ma tutrice Laure Gouriou qui m'a accompagnée tout au long de ce stage. Elle a toujours été disponible et ses conseils avisés m'ont permis de progresser.

Je remercie vivement Florence d'Amico pour m'avoir guidée et m'avoir enseigné les techniques de dosage de la chlorophylle.

Un grand merci à Claire Meteigner et à Loïc Rigouin pour toute l'aide apportée pendant la rédaction de ce rapport de stage.

Merci également à Marie-Pierre Tournaire, Myriam Rumèbe-Perrière pour avoir fait preuve de patience lors de mes sorties sur le terrain.

Un immense merci à Florence et Gilles Trut pour leur accueil et leur immense gentillesse.

Merci à Danièle Maurer, Hélène Oger-Jeanneret et Isabelle Auby pour, leur formidable accueil, leur amabilité et leur sens de l'humour !

Mes remerciements vont ensuite à Florian, Mathis et Quentin pour m'avoir si bien accueillie au sein de l'équipe.

Je remercie aussi mes professeurs de l'Institut Universitaire et Technologique de Sète pour avoir été présents tout au long de l'année.

Je souhaite également adresser un grand merci à mes parents, ma sœur, ainsi qu'à tous mes amis qui ont été à mes côtés et me soutiennent dans tout ce que j'entreprends.

Merci pour tout.

Abstract

Chlorophyll *a* is a photosynthetic pigment principal in plants and algae, it is an indicator of the microalgae's biomass and that are at the foundation of the food chain.

Measurement of concentration's chlorophyll *a* is carried out by fluorimetry (method described in Aminot and K erouel 2004) This method is required by the Framework Directive (WFD).

Arcachon laboratory, when I realized this internship, is accredited ISO 17025 for the analysis of nutriments. It also carries out chemical analysis like for example the dosage of chlorophyll *a*.

In this quality assurance process, it is essential to validate the method of determination of chlorophyll *a* in the marine environment.

The validation of this method is carried out through two standard NF-T90-210 and NF V03-110 that allow the study of differents parameters. And then allow us to validate or not the method.

The parameters used are the study of the calibration function, quantification limit, the study yields, according to NF-T90-210. But also study the accuracy and uncertainty estimates according to NF V03-110

.

Préambule

L'Ifremer, institut français de recherche pour l'exploitation de la mer est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC). Créé en 1984, il est né de la fusion entre CNEXO² et l'ISTPM³. Il est placé sous la tutelle conjointe des ministères de l'enseignement supérieur et de la recherche et de l'environnement, de l'énergie et de la mer.

L'Ifremer a pour mission d'évaluer les ressources des océans et permettre leur exploitation durable, d'améliorer les méthodes de surveillance du milieu marin, et favoriser le développement économique du milieu marin.

Le Laboratoire Environnement-Ressources d'Arcachon (LER/AR) fait partie des 9 laboratoires côtiers du département Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes de l'Ifremer. Il est rattaché administrativement au centre de Nantes et compte un effectif de 12 personnes. Il a pour mission la mise en œuvre de plusieurs réseaux : nationaux (REPHY, REMI, ROCCH, RESCO...)⁴, régional (ARCHYD)⁵ et communautaire (DCE)⁶, de surveillance de la qualité des eaux littorales et de la ressource conchylicole. A ce titre, le laboratoire est amené à réaliser des prélèvements, des mesures sur le terrain, et des analyses chimiques notamment dans le cadre des suivis hydrologiques.

Les analyses chimiques consistent en des dosages de chlorophylle *a* phytoplanctonique et de nutriments dans les eaux marines. Dans ce contexte, le laboratoire a engagé depuis plusieurs années une démarche de mise sous assurance qualité de ces activités techniques selon le référentiel ISO 17025. Le LER/AR est accrédité pour l'analyse des nutriments depuis 2011.

Les objectifs de l'étude effectuée dans le cadre du stage au sein du LER/AR était **d'évaluer les performances de la méthode de dosage de la chlorophylle *a*** mise en place au laboratoire, selon les protocoles proposées par les normes NF T90-210 (2009)⁷ et NF V03-010 (2010)⁸ et **d'estimer le niveau d'incertitude sur le résultat**.

² Centre National pour l'Exploitation des Océans

³ Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes

⁴ REMI http://envlit.ifremer.fr/surveillance/microbiologie_sanitaire;
REPHY http://envlit.ifremer.fr/surveillance/phytoplancton_phycotoxines/presentation
RESCO http://envlit.ifremer.fr/surveillance/cheptels_conchylicoles/cheptels_conchylicoles

⁵ ARCHYD http://envlit.ifremer.fr/surveillance/reseaux_regionaux/archyd

⁶ DCE : Directrice Cadre sur l'Eau (2000/60/CE). Elle établit un cadre pour une politique globale communautaire dans le domaine de l'eau. C'est l'élément majeur de la réglementation européenne concernant la protection des ressources en eau douces, saumâtres ou salées, superficielles ou souterraines, de « transition » et côtières.

⁷ NF T90-210 version 2009 - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire ».

⁸ NF V03-110 version 2010 - Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude

1. Introduction

La chlorophylle *a*, principal pigment photosynthétique des plantes, est utilisée comme indicateur de la biomasse phytoplanctonique et figure parmi les éléments de qualité biologique retenus pour la classification de l'état écologique des masses d'eau littorales dans le contexte de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE)⁶.

La méthode préconisée pour le dosage de chlorophylle *a* en milieu marin a été élaborée par Yentsh et Menzel (1963) et a été décrite par Holm-Hansen *et al* (1965) et Strickland et Parsons (1972). Elle utilise les propriétés spectroscopiques des pigments chlorophylliens, c'est à dire leur capacité à émettre une fluorescence rouge lorsqu'ils sont excités par de la lumière bleue ou ultra-violette. Il est donc possible de doser la chlorophylle *a* à l'aide d'un fluorimètre équipé d'un filtre d'excitation bleu (446-500nm) et d'un filtre d'émission rouge (> 665nm).

Cette méthode qui fait l'objet d'un protocole défini, est utilisée depuis plusieurs années au laboratoire. Dans le cadre de la démarche qualité du laboratoire, le LER/AR a souhaité évaluer les performances de la méthode et estimer le niveau d'incertitude sur le résultat.

1.1. Les principales chlorophylles du phytoplancton

Le phytoplancton est constitué de microalgues dont les plastes (organites cellulaires qui sont le siège de la photosynthèse) contiennent des pigments photosynthétiques, dont les principaux sont les chlorophylles.

Toutes ces microalgues contiennent de la chlorophylle *a*, tandis que certains groupes possèdent également de la chlorophylle *b* ou *c* (Tableau 1).

Tableau 1: Composition en chlorophylle en fonction du groupe microalgal

Groupe microalgal	Type(s) de chlorophylle(s)
Algues bleu-vertes (Cyanobactéries)	Chlorophylle <i>a</i>
Algues vertes : Chlorophytes (Chlorophycées, Euglenophycées, Prasinophycées)	Chlorophylle <i>a</i> et <i>b</i>
Algues brunes : Chromophytes (Dinophycées = Dinoflagellés, Cryptophycées, Bacillariophycées = diatomées,..)	Chlorophylle <i>a</i> et <i>c</i>
Algues rouges	Chlorophylle <i>a</i>

Dans les eaux côtières étudiées par le LER d'Arcachon, le phytoplancton observé est principalement composé d'algues brunes (dinoflagellés et diatomées) et d'algues vertes.

1.2. La structure des chlorophylles *a,b,c*

Les structures des chlorophylles présentées dans la Figure 1 se caractérisent par un noyau tétrapyrrolique ou chlorine, complexant un ion magnésium par deux liaisons ioniques et deux liaisons de coordination.

Dans le cas des chlorophylles *a* et *b*, le cycle tétrapyrrolique est substitué par une chaîne terpénique ou phytol, constituée de vingt atomes de carbone. Les structures des chlorophylles *a* et *b* sont quasiment identiques à l'exception d'une fonction aldéhyde située sur la chlorine pour la chlorophylle *b*.

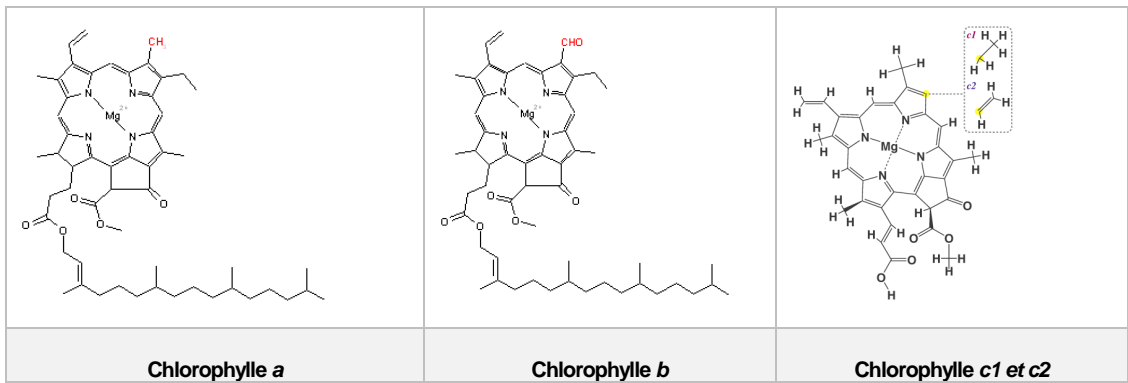


Figure 1: Les différentes structures des chlorophylles a,b,c

1.3. Les principaux produits de dégradation des chlorophylles

Les principaux produits de dégradation des chlorophylles sont la phéophytine, la phéophorbide et la chlorophyllide. La phéophytine et la phéophorbide sont regroupées sous le nom de phéopigments.

Les trois principales formes dégradées de la chlorophylle a sont présentées Figure 2, ainsi que leurs longueurs d'onde d'absorption maximum.

En milieu acide (pH 2.6-2.8), le macrocycle tétra pyrole de la chlorophylle a est protoné et l'ion magnésium est libéré pour former la phéophytine a. La chlorophyllide a est obtenue par hydrolyse enzymatique du groupement phytol et est transformée en phéophorbide en milieu acide.

Il est important de noter que la chlorophylle a et la chlorophyllide a présentent leur maximum d'absorbance à la même longueur d'onde. Aussi dans le cadre de la méthode fluorimétrique non séparative, la chlorophylle a dosée est en réalité un mélange de chlorophylle a et de chlorophyllide a.

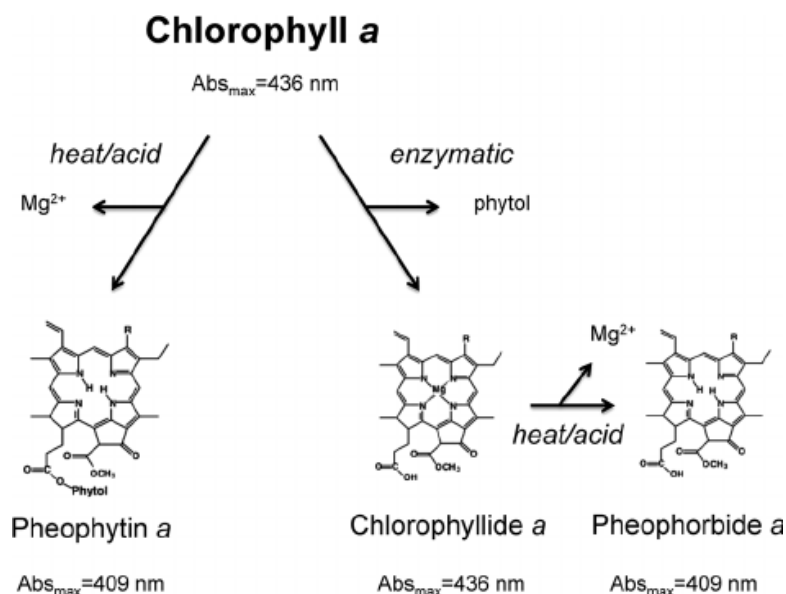


Figure 2 : Schéma représentant la dégradation de la chlorophylle a (Karolina Östbring et al (2014))

1.4. Méthode appliquée au laboratoire

1.4.1. Protocole

Conformément aux recommandations d'AQUAREF⁹ et de la DCE⁶, le laboratoire utilise le protocole décrit dans Aminot et Kérouel (2004) pour le dosage de la chlorophylle *a* en milieu marin. Ce protocole est composé de 4 étapes qui vont du prélèvement à l'analyse (Figure 3) :

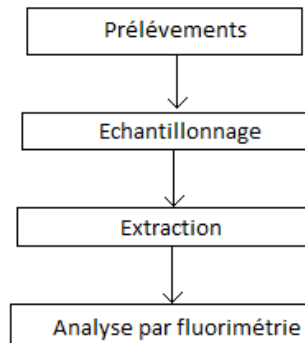


Figure 3 : Les principales étapes du protocole pour le dosage de la chlorophylle *a* en milieu marin

Etape 1 –Prélèvement. L'échantillon d'eau de mer est prélevé à l'aide d'une bouteille Niskin et stocké au frais et à l'abri de la lumière jusqu'au retour au laboratoire.

Etape 2 – Echantillonnage. Au laboratoire, après homogénéisation du prélèvement, une prise d'essai de 100 ml est filtrée sur un filtre de porosité 0,7 μm , afin de récupérer le phytoplancton présent. Le filtre est ensuite soit analysé directement soit stocké au congélateur (-25°C) (au maximum pendant un mois) pour une détermination ultérieure de la chlorophylle *a*.

Etape 3 – Extraction. L'extraction de la chlorophylle contenue dans les cellules est réalisée manuellement en triturant le filtre à l'aide d'une spatule dans 10 ml d'acétone à 90%. L'extraction se poursuit une nuit au réfrigérateur. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés à 3500 tr/min pendant 10 minutes.

Etape 4 - Analyse : Le surnageant de l'essai extrait est transféré dans un tube à essai pour analyse. Conformément au protocole d'Aminot et Kerouel (2004) une lecture de la fluorimétrie est réalisée avant et après acidification (ajout de 70 μl d'HCl 0.3M) afin d'appliquer l'équation d'Holm-Hansen *et al* (1965).

1.4.2. Dosage de la chlorophylle *a* par fluorimétrie

Le dosage de la chlorophylle *a* par fluorimétrie repose sur les équations proposées par Holm-Hansen *et al* (1965) (équations 1 et 2). Cette méthode apporte une correction pour la présence des phéopigments *a* qui absorbent à une longueur d'onde voisine de la chlorophylle *a* mais avec un coefficient d'extinction molaire beaucoup plus faible. Les fluorescences sont mesurées avant et après acidification. L'acidification dégrade la chlorophylle en phéopigments par élimination de l'ion magnésium. La chute de fluorescence qui en résulte permet de calculer la concentration en chlorophylle *a*

⁹ AQUAREF : laboratoire national de référence pour la surveillance des milieux aquatiques, - <http://www.aquaref.fr/accueil>

([Chla]) et les concentrations en phéopigments a ([phéopigments]) (Aminot et Kérouel, 2004).

Dans les équations de Holm-Hansen *et al* (1965), k est le coefficient d'étalonnage, R_{\max} est le rapport moyen des fluorescences avant (F^{na}) et après acidification (F^a) obtenu pour les étalons de chlorophylle a pur lors de l'étalonnage. $V_{filtré}$ correspond au volume d'eau filtré et $V_{extrait}$ au volume d'acétone à 90% ajouté lors de l'étape d'extraction.

$$[Chla]_i = k \times R_{\max} \times \left[\frac{\left(\frac{F^{na}}{F^a} \right) - 1}{(R_{\max} - 1)} \right] \times \left[\left(\frac{V_{extrait}}{V_{filtré}} \right) \right] \quad (1)$$

$$[phéopigments]_i = k \times R_{\max} \times \left[1 - \left(\frac{\left(\frac{F^{na}}{F^a} \right) - 1}{R_{\max} - 1} \right) \right] \times \left[\left(\frac{V_{extrait}}{V_{filtré}} \right) \right] \quad (2)$$

1.4.2.1. Détermination du coefficient d'étalonnage

Le coefficient d'étalonnage k est déterminé expérimentalement à partir de standards de chlorophylle a .

Méthode 1

La méthode classique consiste à tracer la droite $F^{na} = f[Chla_{étalon}]$ à partir de standards de chlorophylle a couvrant le domaine d'application de la méthode. Le coefficient directeur de la droite ainsi obtenu correspond à k^{-1} (équation 3). Cette méthode nécessite de travailler dans le domaine de linéarité de la méthode.

$$F_{étalon}^{na} = \frac{[Chla_{étalon}]}{k} \quad (3)$$

Méthode 2

La méthode proposée par le logiciel de *Turner Designs* utilisé au laboratoire consiste à segmenter le domaine de travail en plusieurs domaines d'étalonnage. Un coefficient d'étalonnage, k , est déterminé entre chaque étalon et le résultat fourni par le logiciel est exprimé directement en équivalent de chlorophylle a .

Un exemple de calcul appliqué est présenté ci-dessous (Figure 4). Sur cette courbe sont représentées les valeurs de fluorescence mesurées à partir d'un blanc et de cinq concentrations connues de chlorophylle. Cinq segments de droite unissent ces points. La concentration en chlorophylle d'un échantillon présentant une fluorescence correspondant sur la figure au segment 3 sera calculée en utilisant la pente de la droite (segment 3) entre les points 2 et 3.

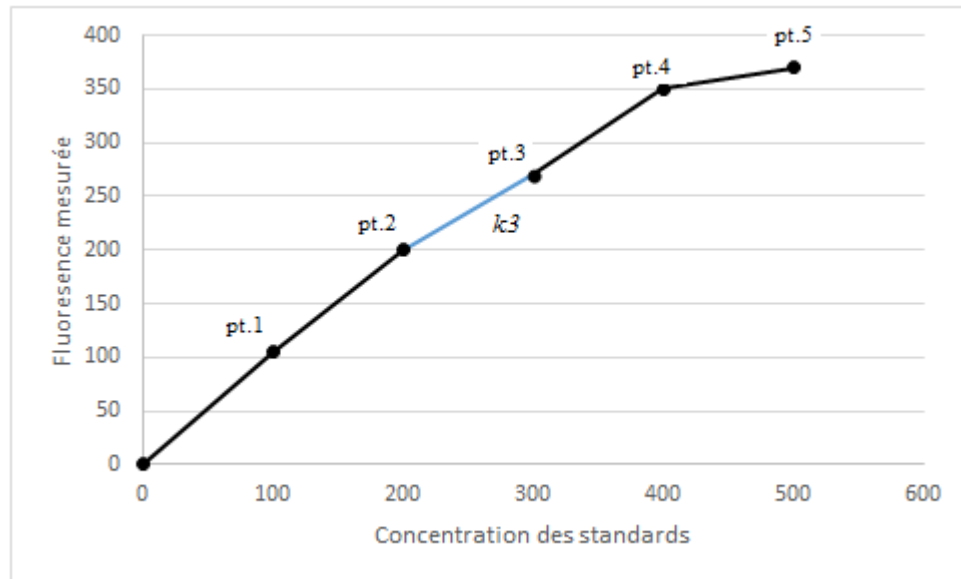


Figure 4 : Méthode d'étalonnage proposé par Turner Designs

L'équation (4) suivante est alors appliquée par le logiciel pour calculer la concentration de cet échantillon.

$$[Conc.] = (F_s - F_{\text{étalon2}}) * k_3 + [Chla_{\text{étalon2}}] \quad (4)$$

Avec :

F_s : fluorescence de l'échantillon

$F_{\text{étalon2}}$: fluorescence du standard 2

k_3 : pente de la droite entre les points 2et 3

$[Chla_{\text{étalon-2}}]$: concentration du standard en $\mu\text{g/L}$

$[Conc.]$: concentration de l'échantillon en équivalent de chlorophylle a en $\mu\text{g/L}$

Afin d'intégrer directement les informations en concentration données par le fluorimètre, les équations (1) et (2) sont réarrangées pour donner les équations (5) et (6), avec C^{na} la concentration non acidifiée en équivalente de chlorophylle a et C^a la concentration acidifiée en équivalent de chlorophylle a . Dans ce cas, R_{max} est le rapport des concentrations non acidifiées et des concentrations acidifiées.

$$[Chla]_i = R_{\text{max}} \times \left[\frac{\left(\frac{C^{na}}{C^a} \right) - 1}{(R_{\text{max}} - 1)} \right] \times \left[\left(\frac{V_{\text{extrait}}}{V_{\text{filtré}}} \right) \right] \quad (5)$$

$$[phéopigments]_i = R_{\text{max}} \times \left[1 - \left(\frac{\left(\frac{C^{na}}{C^a} \right) - 1}{R_{\text{max}} - 1} \right) \right] \times \left[\left(\frac{V_{\text{extrait}}}{V_{\text{filtré}}} \right) \right] \quad (6)$$

1.4.2.2. Détermination de la concentration des solutions étalons préparées au laboratoire

Les solutions standard de chlorophylle a certifiées n'étant pas disponibles, des solutions standards « maison » sont préparées. Une solution mère de chlorophylle a est préparée à partir de chlorophylle a commerciale (*Sigma Aldrich, Spinach C5753*) et est ensuite diluée afin d'obtenir des standards à différentes concentrations.

La concentration de la solution mère préparée est déterminée par spectrophotométrie monochromatique en appliquant la loi de Beer-Lambert et le coefficient d'absorption spécifique de $87.67 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ déterminée par Jeffrey et Humphrey (1975), (équation 7). Pour plus de détails sur le mode opératoire, on peut se reporter à l'annexe 4.

$$A = \varepsilon \times l \times [Chla] \quad (7)$$

$$\varepsilon = 87.7 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

l = longueur de la cuve

$[chla]$ = concentration de la chlorophylle a en $\mu\text{g/L}$

Contrairement à la fluorimétrie, la spectrophotométrie est une méthode directe qui ne nécessite pas d'étalonnage. On notera que le laboratoire n'utilise pas cette technique pour le dosage de la chlorophylle a en milieu marin car elle est moins sensible que la fluorimétrie et exigerait la filtration d'un volume d'eau beaucoup plus important.

1.5. Domaine d'application

La méthode mise en place au laboratoire permet de doser des concentrations en chlorophylle a dans l'eau de mer comprises entre $0,35 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, et $9,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les concentrations généralement mesurées par le laboratoire se situent autour de $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Considérant le domaine d'application de la méthode et les volumes de filtration de 100 mL et d'extraction de 10 mL (cf § 1.4.1), la gamme de travail suivante a été développée au laboratoire pour doser la chlorophylle a extraite dans l'acétone à 90%. Cette gamme est composée de 5 points de gamme et varie de $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $90 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tableau 2).

Tableau 2 : Gamme de travail pour le dosage de la chlorophylle a dans l'acétone 90% en fluorimétrie

Point 1	Point 2	Point 3	Point 4	Point 5
$[chla] \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ acétone 90%				
3,5	10	20	45	90

2. Evaluation des performances de la méthode selon les normes NF T90-210 : 2009 et NF V03-110 : 2010

Dans le cadre des méthodes d'analyses physico-chimique appliquées au domaine de l'eau, la norme NF T90-210 (2009)⁷ est fortement recommandée pour l'évaluation initiale des performances d'une méthode. Ce protocole permet de caractériser, dans des conditions de fidélité intermédiaire, la fonction d'étalonnage, la limite de quantification, l'influence de l'étape de préparation des échantillons et l'exactitude de la méthode sur des échantillons associés à une valeur de référence.

Le laboratoire a fait le choix de suivre ces recommandations pour l'étude de la fonction de réponse, la limite de quantification et l'influence de l'étape de préparation des échantillons. Pour l'étude de l'exactitude le laboratoire a fait le choix de suivre la proposition de la SFSTP 2003-2006¹⁰, reprise dans le cadre des agroalimentaires NF V03-010 : 2010⁸. La stratégie de la SFSTP consiste à construire un outil de décision graphique simple appelé « profil d'exactitude ». Cet outil repose sur l'utilisation d'un intervalle de tolérance de type β -acceptation comme méthodologie statistique. Elle permet d'obtenir un outil de diagnostic simple et à chaque niveau de concentration. De plus cette approche permet une bonne estimation de l'incertitude de mesure en utilisant les données de validation sans avoir recours à des expériences supplémentaires.

2.1. Etude de la fonction d'étalonnage (Plan A de la norme NF T90-210 (2009))

La norme NF T90-210 (2009)⁷ propose deux outils permettant d'évaluer la fonction d'étalonnage :

- Comparaison entre les biais observés et les écarts maximum acceptables,
- Adéquation entre l'erreur du modèle mathématique et l'erreur expérimentale.

Les deux démarches sont complémentaires ; elles sont basées sur l'étude des **concentrations prédites inverses**. Comme représenté

Figure 5, les concentrations prédites inverses, \hat{x}_{ij} , sont les valeurs recalculées de x_{ij} obtenues à partir de l'équation du modèle j, pour chacune des valeurs de y_{ij} (réponse instrumentale).

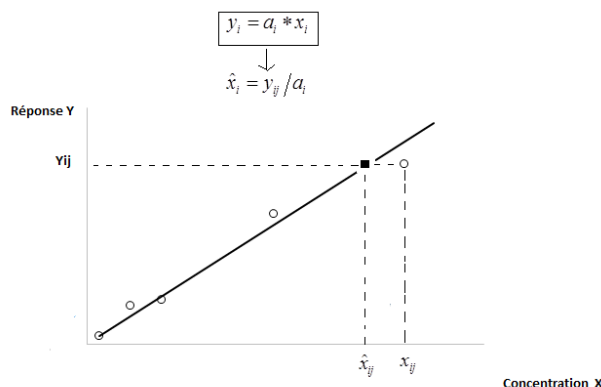


Figure 5 : Décomposition des écarts entre la concentration prédite inverse et la concentration vraie

¹⁰ SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques) - <http://www.sfstp.org/>

- **Approche par les écarts maximum acceptables**

Il s'agit ici de vérifier que les écarts relatifs entre les concentrations prédites inverses \hat{x}_{ij} , et les valeurs vraies x_{ij} sont acceptables par rapport à un EMA d'étalonnage fixé par l'expérimentateur. Pour ce faire un biais (δ_{ij}) relatif est calculé à chaque niveau (équation 7).

$$\delta_{ij} = 100 * \left(\frac{\hat{x}_{ij} - x_{ij}}{x_{ij}} \right) \quad (7)$$

Par cette approche, une interprétation graphique des résultats est réalisée. Les biais relatifs en fonction des niveaux de concentration sont portés sur un graphique. Si l'ensemble des n biais est inférieur à l'écart maximum acceptable correspondant, alors la fonction d'étalonnage est considérée acceptable dans le domaine étudié.

- **Approche statistique globale : analyse des variances**

Il s'agit de vérifier l'adéquation entre l'erreur expérimentale et l'erreur du modèle mathématique appliqué. Les variances de l'erreur expérimentale ne doivent pas être significativement différentes des variances de l'erreur du modèle. Pour ce faire, le test d'égalité des variances de Fisher-Snedecor est conduit au seuil de confiance de 99 %.

Conduite des calculs :

Comme présentée à la

Figure 6, l'erreur totale peut être estimée par la somme des carrés des écarts (SCE_{tot}) entre les valeurs retrouvées \hat{x}_{ij} et les valeurs vraies x_{ij} .

La somme des carrés des écarts, SCE_{tot} , se décompose en la somme des carrés des écarts de l'erreur expérimentale (SCE_{exp}) et de l'erreur du modèle mathématique (SCE_{mod}).

La SCE_{exp} correspond aux écarts entre les valeurs retrouvées de \hat{x}_{ij} et la valeur moyenne retrouvée de $\bar{\hat{x}}_{ij}$ correspondante. La SCE_{mod} correspond aux écarts entre les valeurs vraies de x_{ij} et la valeur moyenne retrouvée de $\bar{\hat{x}}_{ij}$ correspondante.

$$SCE_{tot} = SCE_{exp} + SCE_{mod}$$

$$\sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^n (\hat{x}_{ij} - x_{ij})^2 = \sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^n (\hat{x}_{ij} - \bar{\hat{x}}_{ij})^2 + \sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{\hat{x}}_{ij})^2$$

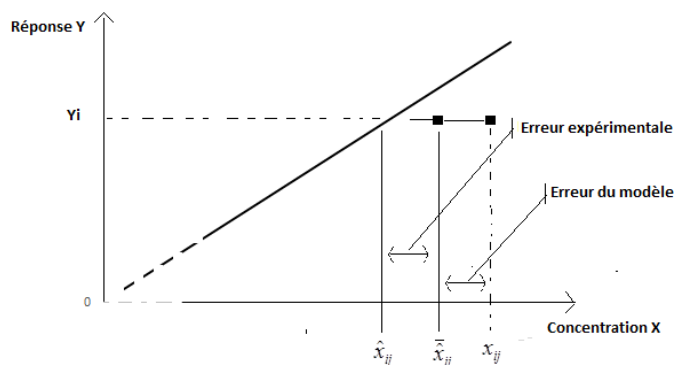


Figure 6: Décomposition de la variance totale en ses deux composantes (variance de l'erreur expérimentale et de l'erreur du modèle)

Les variances de l'erreur du modèle et de l'erreur expérimentale sont ensuite calculées comme suit ; avec p , le nombre de niveaux de concentration et n , le nombre de répétitions par niveau :

$$\text{Variance de l'erreur du modèle : } S_{\text{mod}}^2 = \frac{SCE_{\text{mod}}}{p} \quad (8)$$

$$\text{Variance de l'erreur expérimentale : } S_{\text{mod}}^2 = \frac{SCE_{\text{exp}}}{p(n-1)} \quad (9)$$

Le test d'égalité de variance selon le critère de Fisher-Snedecor est ensuite réalisé :

$$C_{\text{mod}} = \frac{S_{\text{mod}}^2}{S_{\text{exp}}^2} \quad (10)$$

Si C_{mod} est inférieur à la valeur de la table de Fisher-Snedecor pour p et $p(n-1)$ degrés de liberté, au seuil de confiance de 99%, alors l'erreur du modèle n'est pas significativement différente de l'erreur expérimentale et le modèle est accepté.

2.1.1. Organisation du plan de l'étude

Afin d'effectuer ces tests, le plan d'étude suivant est conduit :

Six gammes d'étalonnage sont préparées dans des conditions de fidélité intermédiaire (jour différent) à partir de standards « maison » (préparée à partir de *Spinach* - C5753 de Sigma). Les 5 niveaux de concentrations de la gamme d'étalonnage sont étudiés et la mesure de fluorimétrie est répétée 3 fois pour chaque échantillon. (Tableau 3).

Tableau 3: Organisation du plan d'étude de la droite d'étalonnage

	Niveau 1 #3.5 µg.L ⁻¹	Niveau 2 #10 µg.L ⁻¹	Niveau 3 #20 µg.L ⁻¹	Niveau 4 #45 µg.L ⁻¹	Niveau 5 #90 µg.L ⁻¹
Série 1 (jour 1)	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions
Série 2 (jour 2)	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions
Série 3 (jour 3)	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions
Série 4 (jour 4)	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions
Série 5 (jour 5)	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions
Série 6 (jour 6)	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions

2.1.2. Résultats et commentaires

Dans le cadre de cette étude, certains choix ont été réalisés :

- Les données des séries sont réalignées par rapport à la moyenne des valeurs par niveau selon l'équation proposée par Feinberg (2009). Pour plus de détails, on peut se reporter à l'Annexe 5.

- Le test de Grubbs¹¹ est appliqué afin de détecter un résultat singulier pour un même niveau et l'homogénéité des variances est vérifiée à travers le test de Cochran¹¹. Les résultats de ces tests sont présentés en Annexe 7. Seul le test de Cochran a permis de mettre en évidence une valeur dite « aberrante ». Cette valeur a été exclue de l'étude.

- Les EMA sont fixés à 5 % par convention.

La Figure 7 présente la répartition des résidus en fonction des niveaux par rapport aux EMA d'étalonnage. On observe une forte dispersion des résultats par niveau, à l'exception de la plus forte concentration (88 µg.L⁻¹). De plus, on constate que les concentrations prédites inverses ne sont pas dans les EMA fixés, pour les niveaux de 3,5 à 11 µg.L⁻¹. Enfin, il apparaît que les concentrations retrouvées ne sont pas correctement centrées pour l'ensemble des niveaux, à l'exception du point à 88 µg.L⁻¹.

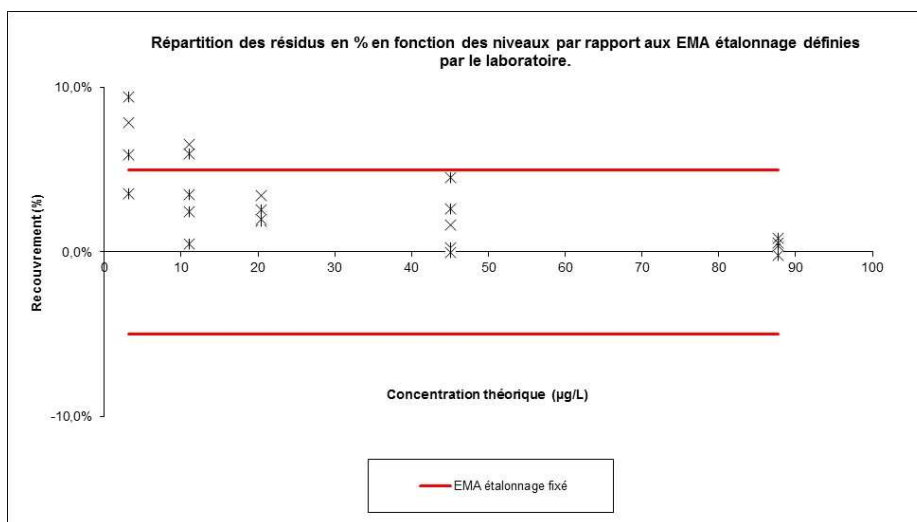


Figure 7 : Répartition des résidus (%) en fonction des niveaux par rapport aux EMA étalonnage – fonction d'étalonnage $Y = 1/k * [Chla]$

Le test de Fisher-Snedecor conduit sur le jeu de données est présenté dans le Tableau 4. Ces résultats indiquent que C_{mod} est supérieur à F_{tab} pour 5 et 25 degrés de libertés au risque d'erreur α égale à 1%. En conséquence, on peut conclure que les variances sont significativement différentes, c'est à dire que l'erreur du modèle n'explique pas l'erreur expérimentale et donc que le modèle n'est pas validé au sens de Fisher-Snedecor.

Tableau 4 : Test d'adéquation à la fonction d'étalonnage $Fna = (1/k) * [Chla]$ - Test de Fisher –Snedecor

Source des variations	Somme des carrés (SCE)	Degrés de liberté	Variance estimée (S ²)	C_{mod}	$F_{tabulé} ; \alpha=1\%$
Erreur due au modèle	8,159461131	5	1,631892226	10,25054498	3,8549
Erreur expérimentale	3,98001333	25	0,159200533		
Totale	13,14079407	30			

Au vu de ces deux tests, il apparaît que le modèle adopté n'est pas acceptable pour le domaine de travail étudié. En conséquence, pour la suite de notre étude, il a été décidé de segmenter le domaine de travail en cinq domaines d'étalonnage et d'utiliser pour la calibration du fluorimètre la méthode 2 décrite dans le chapitre 1.4.2.1.

¹¹ NF ISO 5725-2 version 1994 - Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 2 : méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée

2.2. Etude de la limite de quantification présumée (Plan B selon la norme NF T90 210 : 2009)

Plusieurs méthodes d'estimation existent pour évaluer la capacité de quantification d'une méthode. Le guide de l'ICH¹² en propose deux, basées sur des mesures du rapport « signal sur bruit » ou de données d'étalonnage. Toutefois, notre étude ne s'intéresse pas à la capacité de quantification réelle de la méthode mais cherche à valider une LQ présumée.

Pour ce faire, une étude d'exactitude est conduite selon le principe décrit dans la norme ISO 5725-2¹³ et reprise dans la norme NF T90-210 (2009)⁷. Son but est de démontrer que le biais éventuel (erreur systématique) sur le résultat est acceptable compte tenu des spécifications du dosage et de la variabilité de la réponse (erreur aléatoire).

Cette vérification de l'exactitude est basée sur les deux inégalités ci-dessous, à partir d'un EMA préalablement défini par l'expérimentateur. Si au moins une des deux inégalités n'est pas vérifiée, alors l'exactitude sur l'échantillon analysé n'est pas vérifiée. La limite de quantification présumée est déterminée et comparée par rapport à un EMA de 60% (fixé par convention).

$$\bar{\bar{Z}}_{LQ} - 2 * S_{LQ} > LQ - 60\% * LQ \quad (11)$$

$$\bar{\bar{Z}}_{LQ} + 2 * S_{LQ} > LQ + 60\% * LQ \quad (12)$$

Avec $\bar{\bar{Z}}_{LQ}$: concentration moyenne calculée

Avec S_{LQ} : écart type de fidélité intermédiaire calculée

L'écart type de fidélité intermédiaire de la LQ, S_{LQ}^2 est calculé à partir des variances inter séries S_B^2 et de la variance de la répétitivité S_{repet}^2

$$S_{LQ}^2 = \sqrt{S_B^2 + S_{repet}^2} \quad (13)$$

Dans le cas d'un plan équilibré (même nombre de valeurs par série), la variance de répétitivité se résume en une simple moyenne des variances ; avec n : nombre de répétitions et S_i^2 : variance de la série i

$$S_{repet}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (S_i^2)}{n} \quad (14)$$

La variance inter série est obtenue par différence entre la variance des moyennes et la contribution des variances de répétitivité selon l'équation suivante ; avec $S(\bar{Z}_i)$ variance des moyenne et r : nombre de valeurs par série

$$S_B^2 = S(\bar{Z}_i) - \frac{S_{repet}^2}{r} \quad (15)$$

¹² ICH : International Conference on Harmonization <http://www.ich.org/home.html>

¹³ NF ISO 5725-2 version 1994 - Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 2 : méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée

Remarque : Dans le cas où la variance de moyenne est plus faible que la contribution de la répétitivité, alors la variance inter série, S_B^2 , est arbitrairement fixée à zéro.

$$S_B^2 = S(\bar{Z}_i) - \frac{S_{repet}^2}{r} \leq 0 \quad \text{alors} \quad S_{LQ}^2 = \sqrt{s_{repet}^2} \quad (16)$$

2.2.1. Limite de quantification présumée choisie

Il n'existe aucune donnée bibliographique sur la limite de quantification (LQ) de la méthode. Seul l'avis du 27 octobre 2011¹⁴, relatif aux limites de quantification de l'agrément des laboratoires effectuant des analyses dans le domaine des milieux aquatiques, fait état d'une valeur de 0,5 µg.L⁻¹.

Pour notre étude, nous choisissons de valider une LQ présumée de 0,5 µg.L⁻¹ de chlorophylle *a* dans l'acétone 90% soit, pour un volume filtré de 100 mL, une concentration dans le milieu marin de 0,05 µg.L⁻¹.

2.2.2. Organisation des essais

Afin d'effectuer le test d'exactitude sur la LQ, le plan d'étude suivant est conduit :

Cinq échantillons sont constitués à partir de solutions d'acétone à 90% dopées à la concentration cible de 0,5 µg.L⁻¹ de chlorophylle *a*. La solution de chlorophylle est préparée à partir d'une source de chlorophylle *a* commerciale (*Spinach* - C5753 de Sigma) différente de celle utilisée pour l'étalonnage.

Ces solutions ainsi préparées sont analysées dans des conditions de fidélité intermédiaire ; à savoir des jours différents à partir d'étalonnages indépendants avec 3 mesures de fluorimétrie par analyse (Tableau 5).

Tableau 5 : Tableau représentant le protocole expérimental permettant l'étude de la limite de quantification.

	Série 1 (Jour 1)	Série 2 (Jour 2)	Série 3 (Jour 3)	Série 4 (jour 4)	Série 5 (Jour 5)	Série 6 (Jour 5)
Limite de quantification fixée à 0.5 µg.L ⁻¹	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions

2.2.3. Résultats et conclusion :

Dans le cadre de cette étude, certains choix ont été réalisés :

- Les données des séries ont été réalignées par rapport à la valeur moyenne cible recalculée de 0,4 µg.L⁻¹ selon l'équation proposée par Feinberg (2009) (Annexe 5).

¹⁴ Arrêté du 27 octobre 2011 portant modalités d'agrément des laboratoires effectuant des analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques au titre du code de l'environnement-
https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=7F3E8FFC7CAB280DAEC1E0C0725152F3.tpdila15v_2?cidTexte=JORFTEXT000024767945&dateTexte=29990101

La concentration cible recalculée est légèrement inférieure à la concentration visée de $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Cette différence est due aux incertitudes liées à la préparation des solutions et notamment aux difficultés du pipetage de l'acétone par micropipette.

- Par le test de Grubbs¹⁷ aucun résultat singulier n'a détecté. Le test de Cochran¹⁷ a mis en évidence une non homogénéité des variances. Cependant les valeurs de variances étant extrêmement faibles, on considèrera le jeu de données satisfaisant pour notre étude. Les résultats de ces tests sont présentés en Annexe 9.

Les différents paramètres d'exactitude de la limite de quantification présumée sont présentés en annexe 8.

Une représentation graphique des résultats pour la limite de quantification est présentée Figure 8.

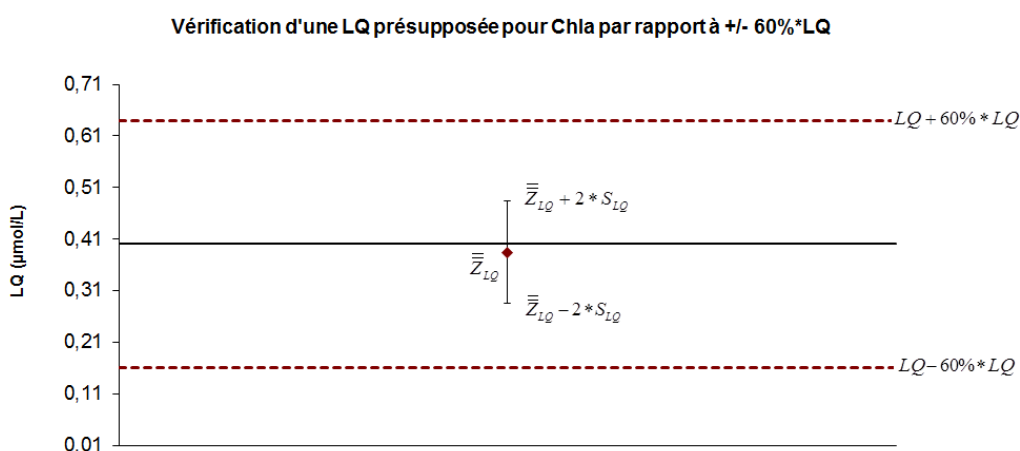


Figure 8 : Graphique représentant la validation de la limite de quantification présumée par rapport à +/- 60%

On constate que les inégalités $\bar{z}_{LQ} \pm 2s_{LQ}$ se situent bien dans l'intervalle défini de $[LQ \pm 60\%]$.

L'exactitude de la limite de quantification présumée de $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ est donc vérifiée et par voie de conséquence celle de $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ imposée par le texte réglementaire de 2011¹⁴.

2.3. Etude de rendements (Plan C selon la norme NF T90 210 : 2009)

L'étape d'extraction peut apporter un biais qu'il faut considérer. Le biais peut provenir du **rendement d'extraction** et de la **stabilité** de chlorophylle *a* lors de l'étape d'extraction.

Dans notre cas, seule la stabilité de la chlorophylle *a* peut-être étudiée. En effet le rendement d'extraction de la méthode ne peut être évalué car il n'existe pas de standard phytoplanctonique de concentration en chlorophylle *a* connue.

Pour ce faire, un test d'exactitude est conduite sur des standards de chlorophylle *a* subissant l'étape d'extraction en présence de filtre. Les calculs statistiques mis en œuvre pour cette étude sont ceux décrits au §2.2; le rendement moyen et les écarts de type de fidélité intermédiaires S_{FI} sont calculés.

2.3.1. Organisation des essais

Afin d'effectuer le test d'exactitude, le plan d'étude suivant est conduit :

Des solutions d'essais de chlorophylle *a*, issues d'une même préparation sont extraites comme décrit au §1.4. Les solutions des essais sont préparées à partir de chlorophylle *a* commerciale pure. Deux niveaux de concentrations sont étudiés : 20 et 80 µg.L⁻¹. Pour chaque niveau de concentration, 5 extractions (séries) sont réalisées et analysées 3 fois (répétitions). Pour cette étude la condition de fidélité intermédiaire choisie est l'extraction de l'échantillon.

Les concentrations des solutions de chlorophylle *a* sont déterminées avant extraction (T0) par fluorimétrie sur 5 répliquats analysés, le jour de l'étude. Trois mesures de fluorimétrie sont réalisées sur chaque répliquat.

L'organisation des essais est présentée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Organisation des essais permettant de calculer le rendement de la méthode

	Concentration cible à 20 µg.L ⁻¹	Concentration cible à 80µg.L ⁻¹
Analyse au fluorimètre T=0	5 répliquats (filtration + extraction), 3 répétitions	5 répliquats (filtration + extraction), 3 répétitions
Analyse au fluorimètre après extraction	5 répliquats (filtration + extraction), 3 répétitions	5 répliquats (filtration + extraction), 3 répétitions

2.3.2. Résultats et commentaires

Le tableau 7 présente les résultats qui permettent le calcul final du rendement. La variance et l'écart type de fidélité intermédiaire sont ainsi calculés. Les calculs intermédiaires sont présentés en Annexe 10

Tableau 7 : Paramètres d'exactitude pour chaque ajout

Ajout	19.84 µg/L (CV _{SFI} : 5.07%)	73.17 µg/L (CV _{SFI} :1.26%)
Nombre de séries n	5	5
Nombre de répétitions par séries : r	2	2
Variance de répétabilité : $S_{répét}^2$	0.103398997	75.91
Variance des moyennes : $S(\bar{Z}_i)^2$	7.28463E-05	0.23
Variance inter série : s_B^2	0.103374714	0.00
Variance de fidélité intermédiaire : s_{FI}^2	0.321632649	0.2257
Rendement moyen en % : \overline{Rdt}	0.016211247	0.4754
Ecart type de fidélité intermédiaire : s_{FI}	104.87%	103.74 %
CV de fidélité intermédiaire : CV _{SFI}	1.62%	0.63%

Un recouvrement de 104-105 % est observé pour les deux concentrations testées avec des CV_{FI} respectifs de 1,62% et 0,63%.

Le rendement des différentes extractions indique qu'il n'y a aucune perte significative lors de l'extraction sur filtre.

2.4. Etude des interférences

La méthode est sujette à des interférences dites non spécifiques, c'est à dire des interférences liées à la présence d'un composé (différent de l'analyte) qui produit un signal y compris en absence de l'analyte.

Ces interférences sont dues au zooplancton recueilli sur les filtres et aux chlorophylles b et c présentes dans les microalgues phytoplanctoniques.

Dans le cas du zooplancton, il peut être éliminé manuellement, lors de l'étape de filtration.

Dans le cas des chlorophylles b et c la situation est plus délicate. En effet, comme présenté au §2.1, les chlorophylles ont des longueurs d'ondes très proches. Leur présence joue sur la justesse du calcul appliqué pour détermination de la concentration en chlorophylle a .

Il a été démontré que la concentration en chlorophylle a est sous-estimée en présence de chlorophylle b et surestimée en présence de chlorophylle c . En effet, lors de l'acidification, la chlorophylle b est convertie en phéophytine b , laquelle est dosée comme étant de la phéophytine a , étant donné le chevauchement des spectres d'émission des phéophytines a et b (Figure 9). La présence de chlorophylle c entraîne l'effet inverse, c'est-à-dire une surestimation de la chlorophylle a . En effet, les spectres des chlorophylles a et c se chevauchent alors que les phéophytines a et c sont séparées (Figure 9).

La Figure 9 présente les spectres d'excitation et d'émission des chlorophylles a , b et c , ainsi que ceux des phéophytines correspondantes. Ces spectres ont été normalisés à une unité.

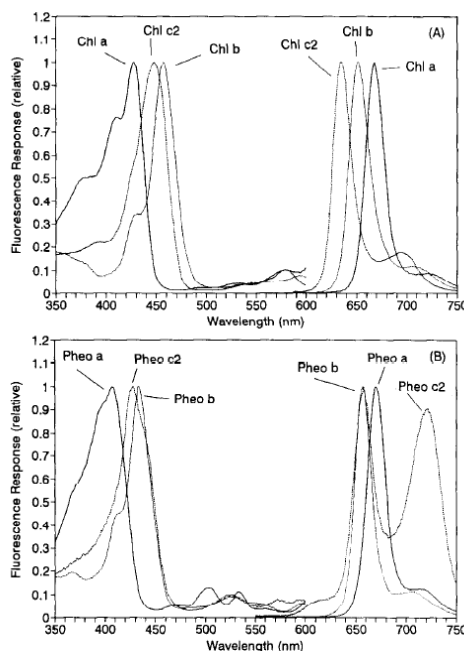


Figure 9 : Spectre d'absorption des chlorophylles et de leurs produits principaux de dégradation (Welschmeyer, 1994)

D'après les travaux d'Arar (1994), la méthode fluorimétrique par acidification peut sous-estimer jusqu'à 19 % de la concentration de la chlorophylle a lorsque le ratio Chl a : Chl b est de 1 : 1 et que la concentration en chlorophylle a est de 180 $\mu\text{g/l}$. Il est important de noter que ces résultats sont obtenus avec des standards de chlorophylle a et b et que le ratio 1 : 1 est le maximum pouvant être trouvé en milieu naturel.

Aminot et Kérouel (2004) recommandent une utilisation de la méthode fluorimétrique par acidification pour un ratio chlorophylle a/b inférieur à 0,4.

Au vu de ces informations, il apparait essentiel de connaître la composition de la communauté algale du milieu étudié afin d'estimer la justesse de la méthode utilisée.

Dans le cas des eaux analysées par le LER d'Arcachon, les espèces phytoplanctoniques dominantes sont des *diatomées* (caractérisées par la présence de chlorophylles *a* et *c*) et des *chlorophycées* (caractérisées par la présence de chlorophylles *a* et *b*). Dans notre cas, la présence simultanée de chlorophylle *b* et *c* permet un effet d'annulation des interférences. De plus des travaux non publiés rapportent, pour les échantillons provenant du bassin d'Arcachon, des ratios Chl a : Chl b et Chl a : Chl b bien inférieurs à 0,4.

En conséquence la méthode de dosage de la chlorophylle a par fluorimétrie est adaptée au milieu étudié par le LER d'Arcachon.

2.5. Evaluation de l'exactitude (justesse et fidélité) de la méthode

Le profil d'exactitude décrit dans la norme NF V03-110 (2010)⁸ reprend les informations de justesse et de fidélité obtenues à chaque niveau de concentration. Il permet de déterminer les limites de tolérance haute et basse, soit l'intervalle de tolérance censé contenir une proportion attendue des futures mesures.

Un exemple de représentation graphique du profil d'exactitude est présenté Figure 10.

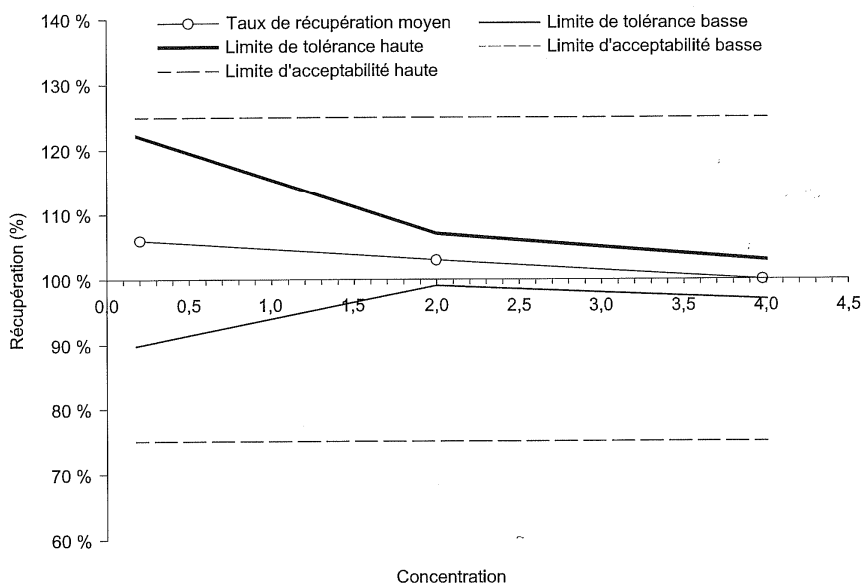


Figure 10: Exemple d'un profil d'exactitude 8

La concentration théorique des niveaux (soit les valeurs de référence assignées aux niveaux) est reportée sur l'axe des abscisses.

Les limites relatives de l'intervalle de tolérance (IT) délimitant l'intervalle dans lequel se trouve en moyenne une proportion connue, notée β , de futures mesures, sont

représentées sur l'axe des ordonnées et sont exprimées en pourcentage de recouvrement. Cette limite de tolérance combine les paramètres de justesse et de biais. Est également représentée sur l'axe des ordonnées, en % de recouvrement, la limite d'acceptabilité servant à chiffrer les objectifs de la méthode.

Les limites relatives de l'intervalle de tolérance (IT) sont calculées de la façon suivante pour chaque niveau de concentration étudié ; avec s_{IT} , écart type de l'Intervalle de tolérance, k_{IT} , facteur de couverture de l'intervalle de tolérance et $\bar{\bar{Z}}$ la concentration moyenne retrouvée

$$\left(\frac{\bar{\bar{Z}} - k_{IT} \times s_{IT}}{\bar{\bar{X}}} \right) \times 100 \quad (17) \quad \text{limite de tolérance basse relative}$$

$$\left(\frac{\bar{\bar{Z}} + k_{IT} \times s_{IT}}{\bar{\bar{X}}} \right) \times 100 \quad (18) \quad \text{limite de tolérance haute relative}$$

La concentration moyenne retrouvée est calculée comme suit

$$\bar{\bar{Z}} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J Z_{ij}}{I \times J} \quad (19)$$

L'intervalle de tolérance s_{IT} et le facteur de couverture k_{IT} sont calculés à partir des équations ci-dessous, selon la méthodologie proposée par Mee (1984). Dans ces formules, I désigne le nombre de séries, J le nombre de répétitions et s_{FI} , l'écart type de fidélité intermédiaire.

L'écart-type de l'intervalle de tolérance s_{IT} est calculé selon l'équation (20) :

$$s_{IT} = s_{FI} \sqrt{1 + \frac{1}{IJ \times B^2}} \quad (20)$$

$$\text{Avec } B = \sqrt{\frac{Q + 1}{J \times Q + 1}} \quad (21)$$

$$\text{Et } Q \text{ le rapport des variances inter et intra série } Q = \frac{s_B^2}{s_r^2} \quad (22)$$

Le facteur de couverture de l'intervalle de tolérance vaut : $k_{IT} = t_{\nu, \frac{1+\beta}{2}}$ avec $t_{\nu, \frac{1+\beta}{2}}$ le quantile de la distribution t de Student pour la probabilité $(1+\beta)/2$ et de degrés de liberté ν .

Le nombre de degrés de liberté est calculé selon l'approximation Satterthwaite. Il est pondéré par le rapport des variances et permet de traduire l'importance relative de l'effet série par rapport à la répétabilité.

$$v = \frac{(Q+1)^2}{\left(\frac{Q + \frac{1}{J}}{I-1}\right)^2 + \frac{1 - \frac{1}{J}}{IJ}} \quad (23)$$

Remarque : la pondération apportée par le rapport des variances augmente lorsque que le rapport $Q < 1$. Inversement, elle diminue lorsque le rapport Q augmente, le degré de liberté est alors plus petit et donc l'intervalle de tolérance est large.

Le taux de recouvrement moyen par niveau est calculé selon l'équation (24)

$$R\% = \frac{\bar{Z}}{\bar{X}} \quad (24)$$

Avec \bar{Z} la moyenne des concentrations prédites inverses et \bar{X} la valeur de référence

2.5.1. Evaluation de l'exactitude de la méthode d'analyse sans l'étape d'extraction

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la méthode seule sans l'étape d'extraction. Le profil d'exactitude est établi à partir de standards « maison » préparés à partir de matériaux de référence.

2.5.1.1. Organisation des essais :

Pour réaliser cette étude le plan suivant est conduit :

La gamme de travail, composée des 5 niveaux de concentration, est analysée dans des conditions de fidélité intermédiaires ; à savoir 5 séries journalières et 3 répétitions par niveau. Les répétitions correspondent à trois mesures en fluorimétrie. Pour chaque série, un nouvel étalonnage du fluorimètre est effectué.

Les solutions standards utilisées pour ces essais sont réalisées à partir d'une source commerciale de chlorophylle *a* différente de celle utilisée pour l'étalonnage du fluorimètre (*Anacystis nidulans alga* - C6144 de Sigma)

Dans le tableau 9 est présentée une synthèse du plan de l'étude.

Tableau 8 : organisation des essais pour réaliser l'étude du profil d'exactitude de la méthode

	Concentration Chl <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dans acétone 90%				
	Niveau 1 3.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Niveau 2 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Niveau 3 21 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Niveau 4 45 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Niveau 5 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Série 1 (jour 1)	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions)
Série 2 (jour 2)	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions
Série 3 (jour 3)	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions
Série 4 (jour 4)	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions
Série 5 (jour 5)	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions	3 répétitions

2.5.1.2. Choix des limites d'acceptabilité

A ce jour la DCE⁶ ne donne aucune indication sur les performances attendues des méthodes pour le dosage de la chlorophylle *a* dans les eaux marines.

Cependant, il existe quelques données dans la littérature, les plus récentes étant celles présentées par Smith *et al.* (2007). Ces auteurs font état de CV% variant de 8 à 14 % pour une solution de standard de chlorophylle *a* (*Anacystis nidulans* alga - C6144 de chez Sigma) (Tableau 9).

Tableau 9 : % CV sur des standards de chlorophylle a commerciales

		Moyenne ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Ecart type	%CV
Standard <i>Anacystis nidulans</i> algae / Sigma aldrich	n=7 reliquats le jour même	180.71	10.703	5.942
		22.136	1.820	8.220
	n=7 reliquats le jour différents	103.249	7.280	7.051
		99.923	13.271	13.282

Au vu de ces résultats, nous avons fixé des limites d'acceptabilité à 15%.

2.5.1.3. Résultats et commentaires

Les choix réalisés dans le cadre de cette étude sont les suivants :

- Un réalignement des données par niveau est effectué selon la méthodologie proposée par Feinberg (2009) (Annexe 5).
- Le β d'acceptation est fixé à 80 % et les limites d'acceptabilité à 15 %.

Le profil d'exactitude ainsi obtenu est présenté Figure 11 et les résultats des calculs statistiques sont présentés en Annexe 11

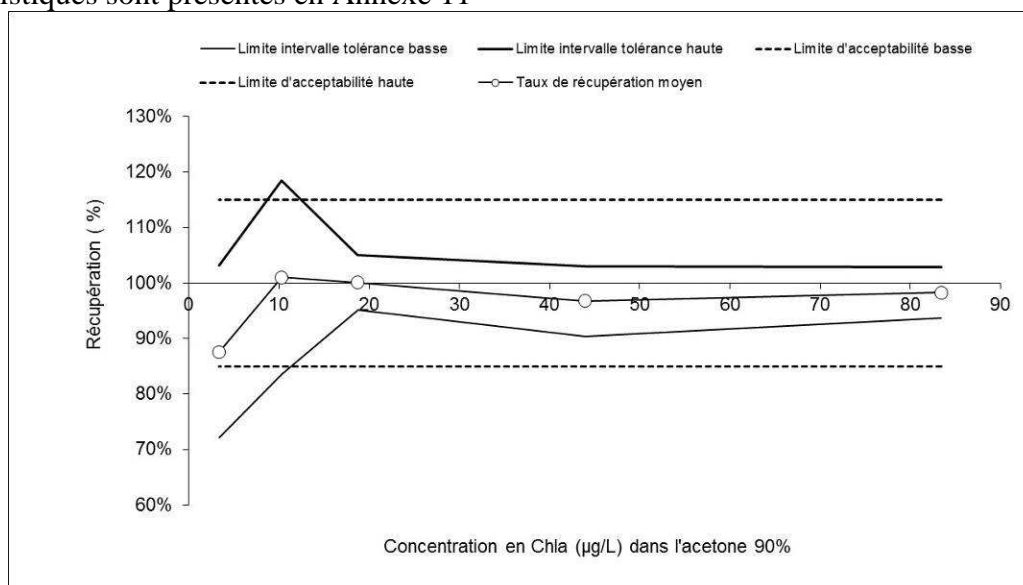


Figure 11 : Profil d'exactitude pour le dosage de la chlorophylle a dans l'acétone 90%

Les limites de tolérance haute et basse sont comprises dans les EMA pour les niveaux de $19 \mu\text{g.L}^{-1}$ à $83 \mu\text{g.L}^{-1}$. La méthode présente un biais particulièrement faible, de moins de 5 %, pour les concentrations de 10 à $83 \mu\text{g.L}^{-1}$. A contrario, on observe une fidélité intermédiaire très importante pour les concentrations au-dessous de $19 \mu\text{g.L}^{-1}$ et un biais de justesse de plus de 10% pour la concentration à $3.5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Globalement, la méthode est satisfaisante pour des concentrations de 19 à $83 \mu\text{g.L}^{-1}$. On rappellera que les concentrations dosées dans le milieu marin par le LER/AR se situent autour de $2 \mu\text{g/L}$ soit par notre méthodologie $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans l'acétone à 90%. En conséquence, la méthode n'est donc pas satisfaisante en l'état.

2.5.2. Evaluation de la fidélité de la méthode pour les étapes de {filtration + extraction}

Ne disposant pas de solution algale avec une concentration en chlorophylle *a* connue, l'exactitude (justesse + fidélité intermédiaire) pour les étapes de préparation des échantillons d'eau mer qui sont la filtration et l'extraction ne peut être évaluée. Dans notre cas, on s'intéresse donc à la fidélité de la méthode pour les étapes d'extraction et de filtration.

Pour réaliser cette étude, la méthodologie du profil d'exactitude est utilisée et les valeurs des concentrations cibles sont posées arbitrairement comme étant égales à la moyenne des concentrations mesurées. Le profil ainsi obtenu ne tient pas compte du paramètre de justesse et est appelé profil de « fidélité intermédiaire ».

2.5.2.1. Organisation du plan de l'étude

Pour réaliser cette étude, trois différents volumes du même prélèvement d'eau mer sont filtrés afin de couvrir le domaine d'application de la méthode (0.035 µg à 0.9 µg par filtre).

La chlorophylle *a* présente dans les cellules phytoplanctoniques n'étant pas stable, les essais sont réalisés le jour même, menés par trois opérateurs différents. Chaque opérateur réalise trois filtrations et extractions par niveau.

Les échantillons extraits sont ensuite analysés par un même opérateur avec la même gamme d'étalonnage. La lecture en fluorimétrie des échantillons est répétée 3 fois

Cette étude a été effectuée deux fois à un mois d'intervalle, en avril et mai, à partir d'eau provenant du même lieu de prélèvement. Pour la première étude les volumes filtrés sont $V_1 = 50$ ml, $V_2 = 100$ ml, $V_3 = 200$ ml et pour la seconde étude $V_1 = 50$ ml, $V_2 = 100$ ml, $V_3 = 150$ ml.

Tableau 10 : Organisation des essais pour l'étude du « profil de fidélité intermédiaire » de la méthode pour les étapes « filtration + extraction »

	Volume 1 # 0.19 µg/filtre	Volume 2 # 0.37 µg/filtre	Volume 3 # 0.74 µg/filtre
Série 1 (Manipulateur 1)	3 réplicats (filtration + extraction)	3 réplicats (filtration + extraction)	3 réplicats (filtration + extraction)
Série 2 (Manipulateur 2)	3 réplicats (filtration + extraction)	3 réplicats (filtration + extraction)	3 réplicats (filtration + extraction)
Série 3 (Manipulateur 3)	3 réplicats (filtration + extraction)	3 réplicats (filtration + extraction)	3 réplicats (filtration + extraction)

2.5.2.2. Choix des limites d'acceptabilité

A ce jour la DCE ne donne aucune indication sur les performances attendues des méthodes pour le dosage de la chlorophylle *a* dans les eaux marines. Cependant, Il existe quelques données dans la littérature, les plus récentes étant celles présentées par Smith *et al.* (2007). L'auteur fait état de CV% variant de 9 à 11 % pour des solutions échantillons préparées à partir de *Thalassiosira sp.* (Tableau 11).

Tableau 11 : % CV sur des standards de chlorophylle *a* commerciales

		Moyenne (µg.L ⁻¹)	Ecart type	%Cv
Echantillon préparé à partir <i>Thalassiosira sp.</i> (diatomée)*	n=7 reliquats le jour même	2.592	0.235	9.057
		0.281	0.021	7.408
	n=7 reliquats le jour différent	2.526	0.255	10.110
		0.262	0.029	10.939

*Remarque : Présence de Chl c

Au vu de ces résultats, nous fixons des limites d'acceptabilité à 15%.

2.5.2.3. Résultats et commentaires

Les deux études ayant été effectuées sur le même point de prélèvement, et ne considérant dans cette étude que le paramètre fidélité intermédiaire, nous avons fait le choix de traiter les données ensemble afin d'augmenter le nombre de séries par niveau.

Pour la réalisation de ce profil de « fidélité intermédiaires », on a fixé β à 80 % et les limites d'acceptabilité à 15 %.

Le profil d'exactitude ainsi obtenu est présenté

Figure 10 et les résultats des calculs statistiques sont présentés en Annexe 12.

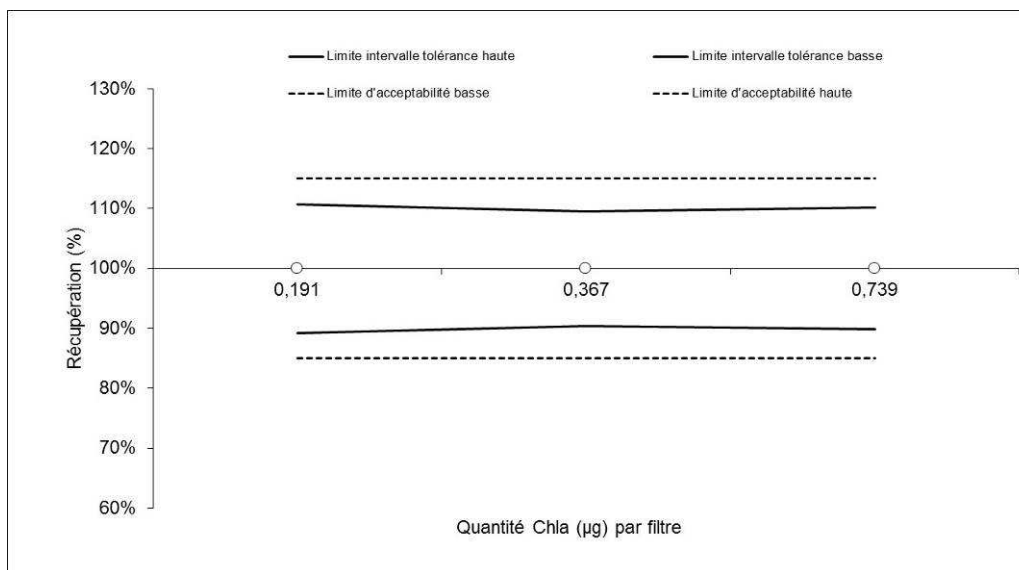


Figure 12 : Profil de fidélité intermédiaire de la méthode {extraction filtration}

Au vu du profil obtenu, on constate que la fidélité intermédiaire est constante pour les trois niveaux (de 0,19 µ/filtre à 0,74 µg/filtre) et les limites de tolérance haute et basse sont comprises dans les EMA.

Globalement le résultat est donc satisfaisant.

2.6. Evaluation de l'incertitude de la méthode

Une estimation des incertitudes aux différents niveaux de concentration peut être déterminée directement à partir des calculs effectués lors de la construction du profil d'exactitude, Feinberg (2009).

En effet si on applique la loi de propagation des variances et que l'on néglige l'incertitude sur la préparation des solutions étalons, l'incertitude de type composé pour chaque niveau de concentration $u_c(z)$ peut se résumer à l'équation (24).

$$u_c(z) = \sqrt{(s_{FI}^2 + u(\partial)^2)} \quad (24)$$

avec $u(\partial)$ le biais moyen

et S_{FI}^2 l'écart type de fidélité intermédiaire par niveau

L'incertitude sur le biais δ moyen pour chaque niveau est calculée selon l'équation 25 ; elle peut se décomposer en la somme quadratique de la variance de la moyenne générale et de l'incertitude liée à la préparation des solutions étalons (X) (équation 26)

$$\delta = \bar{Z} - X \quad (25)$$

avec \bar{Z} la moyenne des concentration retrouvées
et X la valeur de la concentration cible.

$$u(\delta) = \sqrt{S_{\bar{Z}}^2 + u_{c_{réf}}^2} \quad (26)$$

avec $S_{\bar{Z}}^2$ la variance de la moyenne générale

et $u_{c_{réf}}$ incertitude sur la préparation des étalons.

Si on considère, dans un premier temps que l'incertitude sur la préparation des échantillons est négligeable, soit $u_{c_{réf}} \ll u_{u_{réf}}$, alors la variance de $u(\delta)^2$ est égale à la variance de la moyenne générale $S_{\bar{Z}}^2$.

L'écart type de la moyenne générale se calcule comme suit :

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S_B^2}{I} + \frac{S_r^2}{IJ}} \quad (27)$$

Avec I le nombre de séries

J le nombre de répétitions

En introduisant le rapport des variances Q inter et intra série $Q = \frac{S_B^2}{S_r^2}$ (22)

L'équation (27) s'écrit alors sous la forme suivante (25):

$$S_{\bar{Z}} = S_{FI} * \sqrt{\left(\frac{1}{IJ * B^2}\right)} \quad (27) \quad \text{avec } B = \sqrt{\left(\frac{Q+1}{J * Q+1}\right)}$$

Si on additionne ces deux variances, on trouve que l'incertitude composée de $u_c(z)$ est égale à :

$$u_c(z) \approx S_{FI} \sqrt{\left(1 + \left(\frac{1}{IJ * B^2}\right)\right)} \quad (28)$$

Cette quantité correspond à l'écart type de l'intervalle de tolérance s_{IT} déterminée chapitre 2.5.

A partir de ces données on peut calculer par niveau l'incertitude composée relatives qui prends en compte l'incertitude liée à la méthode de dosage et l'incertitude liée aux étapes de filtration et d'extraction.

$$u_c(z) \approx \sqrt{u(z)_{\text{extraction+filtration}}^2 + u(z)_{\text{méthode}}^2} \quad (29)$$

L'incertitude élargie relative à 95% est calculée en appliquant un facteur d'élargissement $k=2$

$$u(z)_{\text{extraction+filtration,rel}} = k * u_{\text{extraction+filtration}} \quad (30)$$

$$u(z)_{\text{méthode,rel}} = k * u_{\text{méthode}} \quad (31)$$

$$u_{c,rel} = k * u_c(z) \quad (32)$$

2.6.1. Résultats et commentaires

2.6.1.1. Estimation de l'incertitude élargie à 95% liée à la méthode de dosage

Le profil d'exactitude illustrant l'incertitude élargie à l'aide de barres d'erreur est présenté Figure 13.

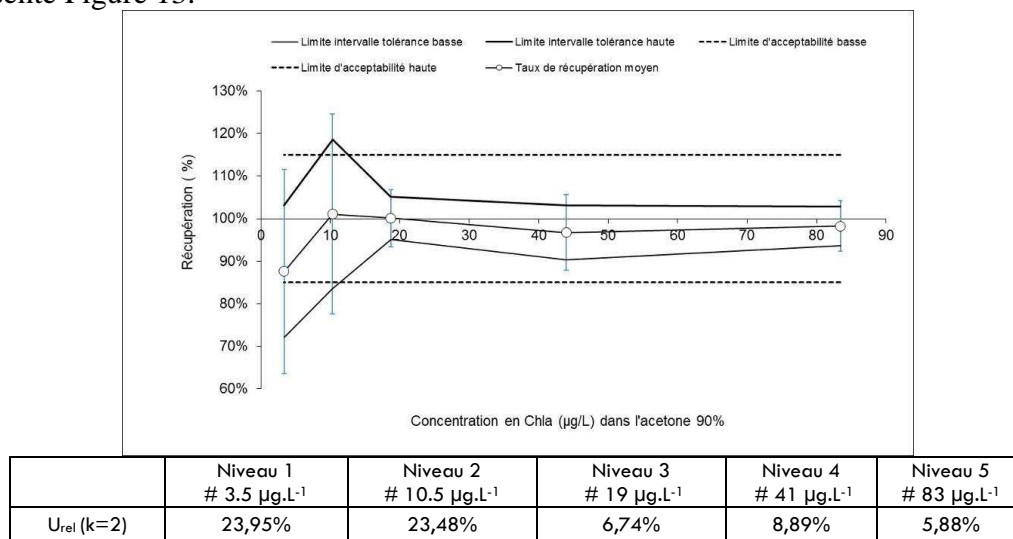


Figure 13 : Profil d'exactitude de la méthode de dosage illustrant l'incertitude élargie à l'aide de barres d'erreur

L'incertitude de la méthode pour le dosage de la chlorophylle *a* dans l'acétone 90% est inférieure à 10% pour les concentrations de 19 à 83 µg.L⁻¹. Une forte augmentation des incertitudes est observée pour les concentrations inférieures à 19 µg.L⁻¹.

2.6.1.2. Estimation de l'incertitude élargie à 95% liée à l'étape de préparation de l'échantillon {filtration + extraction}

Le profil de fidélité intermédiaire de l'étape de préparation de l'échantillon illustrant l'incertitude élargie à l'aide de barres d'erreur est présenté Figure 14.

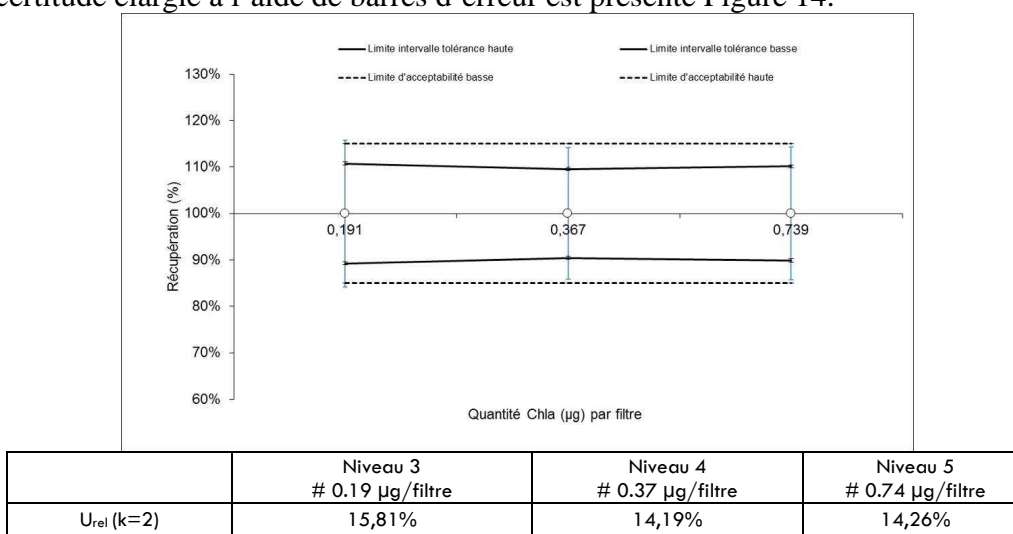


Figure 14 : Profil de fidélité intermédiaire de la méthode de préparation de l'échantillon illustrant l'incertitude élargie à l'aide de barres d'erreur

L'incertitude liée à la préparation de l'échantillon *a* varie de 16 à 14% pour des quantités sur filtre en chlorophylle *a* de 0,19 à 0,74 µg.

2.6.1.3. Estimation de l'incertitude élargie à 95% liée à la méthode {dosage + préparation de l'échantillon} (incertitude composée)

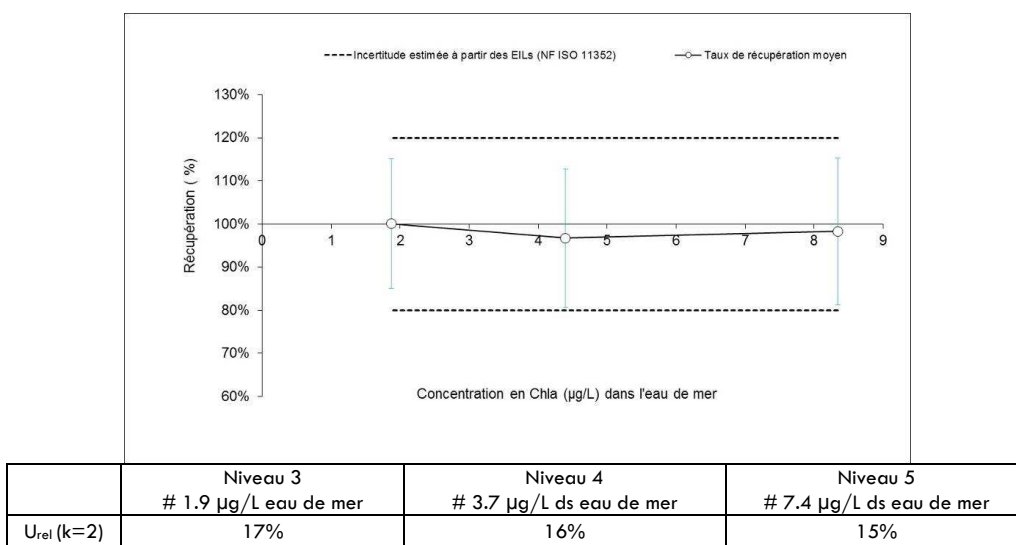


Figure 15 : Profil de l'incertitude de la méthode {dosage + préparation de l'échantillon} illustrant l'incertitude élargie à l'aide de barres d'erreur et biais de justesse.

La Figure 15 présente les résultats des incertitudes par niveau de concentration. Pour les trois concentrations étudiées, le niveau d'incertitude est proche de 15 %. Ces résultats sont en adéquation avec ceux déterminés à partir des résultats d'essais inter laboratoires selon la norme NF 11352 (2013): le résultat obtenu était de 20%.

3. Conclusion

En prenant en considération les résultats obtenus au cours de cette étude, **le domaine de validité de la méthode d'analyse de la chlorophylle *a* dans l'acétone 90%, mise en place au laboratoire, est compris entre 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$** . En dessous de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, la fidélité de la méthode augmente fortement (+20%) et le biais de justesse est important pour des concentrations inférieures à 3.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (-12%).

Concernant l'étape d'extraction, les résultats de fidélité obtenus pour des quantités en chlorophylle *a* variant de 0,19 à 0,74 $\mu\text{g}/\text{filtre}$ sont acceptables, avec une valeur de 15%. Ils ne varient pas en fonction de la quantité de chlorophylle par filtre.

Au vu de ces résultats, on peut conclure que la méthode appliquée au laboratoire pour mesurer des concentrations en chlorophylle *a* à 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans le milieu marin n'est pas satisfaisante. Des adaptations vont devoir être faites et les recommandations suivantes peuvent être faites :

- Il serait intéressant d'adapter les volumes de filtration d'eau de mer, afin de se situer dans la gamme de validité de la méthode d'analyse. Une filtration de 200 mL d'eau de mer au lieu des 100 mL actuellement pratiquée permettrait d'obtenir des concentrations après extraction dans l'acétone à 90% à 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ au lieu des 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ actuelle.
- Il serait également possible, tout en gardant le même volume de filtration, de réaliser deux essais par échantillonnage. Dans ce cas la fidélité serait divisée par $\sqrt{2}$ et le domaine de validité de la méthode dans l'acétone à 90% pourrait être élargi à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Cette étude a également permis de valider la limite de quantification présumée de 0.5 $\mu\text{g/L}$ imposée par le texte réglementaire de 2011 et de réaliser une première estimation des incertitudes sur le résultat.

L'incertitude élargie de la méthode englobant l'étape de préparation de l'échantillon et l'analyse est estimée entre 16-17% (pour $k=2$) pour un domaine d'application de la méthode de dosage dans l'acétone 90% variant de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à 3,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Ces résultats de validation vont permettre également de fixer des EMA d'étalonnage afin de valider les calibrations du fluorimètre et de fixer des EMA pour de futurs contrôles qualité lors des analyses.

Bibliographie

- Aminot A., Kérouel R., **2004**. *Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses*. Ed. Ifremer. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin. 336 p.
- Arar E.J., Collins G.B., **1997**. *In Vitro Determination of Chlorophyll a and Pheophytin a in Marine and Freshwater Algae by Fluorescence*, Method 445.0-1, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, USEPA, Cincinnati.
- Feinberg M., 2009. *Labo Stat - Guide de validation des méthodes d'analyses*. Ed Lavoisier, 361p
- Holm-Hansen O., C.J. Lorenzen, R.W. Holmes et J.D.H. Strickland (**1965**). *Fluoremetric determination of chlorophyll*. J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer., 30(1) : 3-15
- Jeffrey, S.W. et G. Humphrey, **1975**. *New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a,b,c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton*. Biochem. Physiol. Pflanzen 167: 191-194.
- Karolina  stbring, Marilyn Rayner, Ingegerd Sj holm, Jennie Otterstr m, Per- ke Albertsson, Sinan Cem Emek, et Charlotte Erlanson-Albertsson (**2014**). *The effect of heat treatment of thylakoids on their ability to inhibit /in vitro/ lipase/co-lipase activity*. Food Funct.5, 2157-216.
- Manuel d'instructions du TD-700 Fluorimètre de laboratoire - Fisher Bioblock Scientific
- Mee, R. W. (1984). β -expectation and β -content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model. *Technometrics*, 26(3), 251-254.
- Smith, K., Webster, L., Bresnan, E., Fraser, S., Hay, S., & Moffat, C. (2007). *A review of analytical methodology used to determine Phytoplankton pigments in the marine environment and The development of an analytical method to determine Uncorrected chlorophyll a, corrected chlorophyll a and phaeophytin a in marine phytoplankton*. Fisheries research services internal report, 3(07).
- Strickland H. J. D. et Parsons T. R., **1972**. *A practical handbook of sea water analysis*, Bull. 167 (2nd edition), Fish Res. Board. Can., Ottawa.
- Welschmeyer, N. A. (1994). *Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments*. Limnology and Oceanography, 39(8), 1985-1992.
- Yentsch, C.S. et D.W. Menzel, **1963**. *A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence*. Deep-Sea Res., 10 : 221-231

Annexes

Annexe 1 : Matériel de mesure

Spectrophotomètre

Le spectrophotomètre utilisé est le **Shimadzu UV-300** dont les caractéristiques sont les suivantes : UV visible, bande passante < 2nm, double faisceau

La mesure de la chlorophylle au spectrophotomètre ne nécessite pas d'étalonnage ; elle exige par contre un spectrophotomètre performant et bien calibré.



Les spectrophotomètres à large bande passante ne conviennent pas pour la mesure des chlorophylles sinon la chlorophylle *a* est fortement sous-estimée. On choisira des cuves à bouchon car l'évaporation engendre des mouvements de convection modifiant l'absorbance.

Plusieurs sources d'erreurs liées aux cuves ont été identifiées :

- On doit s'assurer que le niveau de l'extrait dans la cuve est suffisant pour que la totalité du faisceau traverse la solution.
- Les cuves aux parois épaisses peuvent produire des données erronées si une partie du faisceau passe par la paroi et non dans l'extrait : utiliser des cuves à parois opaques et se méfier des faisceaux optiques très convergents.
- Repérer toujours l'emplacement de la cuve dans le compartiment pour la remplacer exactement au même endroit !

Fluorimètre

Le fluorimètre utilisé est le modèle TD-700 (Turner Designs) dont les caractéristiques sont les suivantes :

1 lampe lumière blanche du jour

Filtre d'excitation 340-550 nm

Filtre d'émission > 665 nm

Photomultiplicateur sensible au rouge, R446

Filtre 10 % neutre, destiné à réduire l'intensité en cas de saturation du photomultiplicateur à la plus faible sensibilité



.Chlorophylle *a* commerciale (C5753-1mg):

Conclusion

- Issue de la Spinach, se présente sous forme de poudre que l'on dissout dans 500 ml d'acétone 90%
- Permet l'étalonnage du fluorimètre

Annexe 2: Mode opératoire pour l'étalonnage du fluorimètre

A partir de la solution pure de chlorophylle *a* on effectue au spectrophotomètre les mesures suivantes :

Estimation de la qualité de la solution de chlorophylle

Il faut s'assurer de l'absence de phéopigments :

Transférer dans la cuve de 5 cm assez de volume de la solution pure de chlorophylle *a* pour réaliser la mesure

Mesurer les absorbances brutes de l'extrait non acidifié aux longueurs d'ondes suivantes : 665 et 750 nm

Ajouter dans la cuve 300µl d'acide chlorhydrique 0.3M et agiter.

Après 2 mn (l'abréviation de minute est mn, à corriger partout), mesurer à nouveau les absorbances brutes des extraits acidifiés à 665 et 750 nm

Calcul des concentrations de pigments selon la méthode monochromatique :

$$[\text{chlorophylle } a] (\mu\text{g/l}) = 27.7 \cdot (A_{665}^{\text{na}} - A_{665}^{\text{a}}) \cdot (v/V \cdot l)$$

$$[\text{Phéopigments } a] (\mu\text{g/l}) = 27.7 \cdot [(1.7 \cdot A_{665}^{\text{a}}) - A_{665}^{\text{na}}] \cdot (v/V \cdot l)$$

V : volume d'eau filtrée (litre)

v : volume de solvant d'extraction (millilitre)

L : longueur du trajet optique de la cuve de mesure (centimètre)

Détermination de la concentration de la solution de chlorophylle

Mesurer l'absorbance de la solution pure de chlorophylle *a* à 664 nm en cuve de 1 cm de trajet optique

Calculer la concentration de chlorophylle *a* de la solution étalon connaissant le coefficient d'absorption spécifique :

$$[\text{chl}a] = A_{664} / 87.67 \cdot l$$

Préparation de la gamme de solutions étalons

On prépare 5 solutions nous permettant de couvrir la gamme à savoir 90/45/20/10/3.5 µg/l

Etalonner le fluorimètre avec une gamme de concentrations choisies :

90/45/20/10/3.5 µg/l

Allumer l'appareil une heure avant les mesures.

Pour chaque gamme, régler le zéro de fluorescence sur le solvant (acétone 90%)!

Mesurer la fluorescence de chaque échantillon non acidifié C_0

Ajouter 70µl /l d'acide chlorhydrique, attendre 2 mn et mesurer à nouveau la fluorescence de l'échantillon acidifié : C_a

Déterminer le rapport $C_{0\text{max}}$:

$$C_{0\text{max}} = \text{Moyenne } (C_0/C_a)$$

Annexe 3: Mode opératoire pour la mesurer la fluorescence des échantillons

Les extraits doivent être à la même température que lors de l'étalonnage (+. 3°C). Comme pour l'étalonnage, l'appareil est allumé 1 heure avant et on règle le zéro sur l'extrait centrifugé d'un filtre vierge.

Mesurer la fluorescence de l'échantillon non acidifié : F^{na}

Ajouter 70 µl d'acide chlorhydrique 0.3 M, les tubes sont alors placés pendant 2 min à l'abri de la lumière.

Mesurer ensuite la fluorescence de l'échantillon acidifié : F^a

Une fois les concentrations F^{na} et F^a lues, appliquer la relation d'Holm-Hansen :

$$[Chla]_i = k \times R_{max} \times \left[\frac{\left(\frac{F^{na}}{F^a} \right) - 1}{(R_{max} - 1)} \right] \times \left[\left(\frac{V_{extrait}}{V_{filtré}} \right) \right]$$

$$[phéopigments]_i = k \times R_{max} \times \left[1 - \frac{\left(\frac{F^{na}}{F^a} \right) - 1}{R_{max} - 1} \right] \times \left[\left(\frac{V_{extrait}}{V_{filtré}} \right) \right]$$

K coefficient d'étalonnage

R_{max} rapport d'acidification de la chlorophylle a pour l'appareillage donné. La constante R_{max} est déterminée lors de l'étape d'acidification. Il correspond au ratio.

F^{na} fluorescence de l'échantillon en équivalent de chlorophylle a (µg/L) avant acidification de l'échantillon

F^a fluorescence de l'échantillon en équivalent de chlorophylle a (µg/L) après acidification de l'échantillon

V_{ext} volume d'extraction (dans notre cas 10 ml)

$V_{filtré}$ volume échantillon filtré (dans notre cas 100ml)

Z_d facteur de dilution

$Chla$ concentration de Chlorophylle a (en µg/L)

$Phéo$ concentration de Phéopigments (en µg/L)

Annexe 4: Mode opératoire pour la mesure en spectrophotométrie

On utilise le spectrophotomètre pour déterminer la concentration de la solution mère de chlorophylle a.

Grâce au programme prédéfini (longueurs d'onde) sélectionné sur le spectrophotomètre « chlamère », nous pouvons calculer la concentration de la solution en utilisant la loi de Beer-Lambert.

Des précautions opératoires sont nécessaires : les extraits ne doivent pas être froids, les laisser revenir à température ambiante (et à l'abri de la lumière) avant les mesures afin d'éviter la condensation sur les faces optiques.

Transférer l'extrait dans la cuve de 1cm de trajet optique (le volume doit être suffisant pour que la totalité du faisceau traverse la solution) et réaliser la mesure.

La valeur obtenue est l'absorbance de notre solution.

Avec la formule de la loi de Beer-Lambert, le calcul de la concentration de la solution mère de la chlorophylle a est possible.

$$A = \varepsilon * l * [chl a]$$

$$\varepsilon = 87.7 \text{ l. g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

L = longueur de la cuve

[chl a] = concentration de la chlorophylle a en µg/l

Annexe 5 : Réalignement des niveaux

Afin que toutes les valeurs des différentes expériences aient la même valeur de concentration cible, un réalignement des niveaux s'avère nécessaire.

Selon la notation, \overline{X} désigne la valeur de référence obtenue la moyenne des concentrations des échantillons. $Y_{ij(k)}$ désigne quant à lui la réponse du fluorimètre des échantillons, dont la valeur de référence est $X_{ij(k)}$ peut être corrigée par une simple règle de trois :

$$Y_{ij(k)}^* = Y_{ij(k)} * \left(\frac{\overline{X}}{X_{ij(k)}} \right)$$

Annexe 6 : Etude de la fonction d'étalonnage

e-arC11en15v01.xls
Approuvé par : L.G, le 08/10/2015
Date de mise en application : 08/10/2015

P. 1 / 1

Etude de l'étalonnage						
Laboratoire : ARCACHON						
Plan A - Etude du modèle d'étalonnage - Cas 1 (EMA)						
Paramètre	Chlorophylle a					Domaine d'étalonnage
	Etalon de grandeur théorique (µmol/L) et valeurs d'information					Droite de régression
	87,73	45,13	20,39	11,11	3,21	a ₁
Spinach 29/03/2016 (1)	755,44	397,38	178,68	101,04	30,17	8,58239
Spinach 29/03/2016 (2)	783,05	402,26	184,65	102,24	30,25	8,89232
Spinach 22/03/2016 (2)	756,95	366,01	178,89	95,58	36,24	8,55791
Spinach 21/03/2016 (2)	756,57	393,59	180,87	101,58	29,73	8,58023
Spinach 05/04/2016 (2)	775,03	417,41	184,03	100,76	29,43	8,85098
Spinach 25/05/2016	792,93	415,33	187,42	109,23	29,84	9,00084

Tableau des grandeurs retrouvées lors de chaque étalonnage (µmol/L)					
Grandeur théorique	88	45	20	11	3
Spinach 29/03/2016 (1)	88,022	46,302	20,819	11,773	3,516
Spinach 29/03/2016 (2)	88,059	45,237	20,766	11,498	3,401
Spinach 22/03/2016 (2)	88,451	45,105	20,903	11,169	4,234
Spinach 21/03/2016 (2)	88,176	45,872	21,080	11,839	3,464
Spinach 05/04/2016 (2)	87,564	47,160	20,792	11,384	3,325
Spinach 25/05/2016	88,095	46,144	20,823	12,136	3,316

Tableau des biais absolus (µmol/L)					
Grandeur théorique	88	45	20	11	3
Spinach 29/03/2016 (1)	0,297	1,174	0,434	0,661	0,304
Spinach 29/03/2016 (2)	0,334	0,109	0,381	0,386	0,190
Spinach 22/03/2016 (2)	0,726	-0,023	0,518	0,057	1,023
Spinach 21/03/2016 (2)	0,451	0,744	0,695	0,728	0,253
Spinach 05/04/2016 (2)	-0,161	2,032	0,407	0,272	0,114
25/05/2016	0,370	1,016	0,438	1,024	0,104
Moyenne des biais	0,336	0,842	0,479	0,521	0,193
Ecart-type des biais	0,288	0,755	0,115	0,350	0,087

Tableau des Biais relatifs					
Grandeur théorique	88	45	20	11	3
Spinach 29/03/2016 (1)	0,3%	2,6%	2,1%	6,0%	9,5%
Spinach 29/03/2016 (2)	0,4%	0,2%	1,9%	3,5%	5,9%
Spinach 22/03/2016 (2)	0,8%	-0,1%	2,5%	0,5%	31,8%
Spinach 21/03/2016 (2)	0,5%	1,6%	3,4%	6,5%	7,9%
Spinach 05/04/2016 (2)	-0,2%	4,5%	2,0%	2,4%	3,5%
Spinach 25/05/2016	0,4%	2,3%	2,1%	9,2%	3,2%
EMA étalonnage fixé	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
Biais ≤ EMA fixé	acceptable	acceptable	acceptable	/	/

Nombre de niveaux	5
Nombre de gammes	6

Test d'adéquation à la fonction d'étalonnage					
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance estimée	F	Valeur critique
Erreur due au modèle	8,159461131	5	1,631892226	10,25054498	3,854957165
Erreur expérimentale	3,98001333	25	0,159200533		
Totale	13,14079407	30			

Si la valeur F est inférieure à la valeur critique, la fonction d'étalonnage peut être validée

Ce document est propriété de Ifremer et ne peut être reproduit ou communiqué sans autorisation

Annexe 7: Résultats des tests de Cochran et Grubbs pour la fonction d'étalonnage des concentrations prédites

e-arC11en20v00.xls
Approuvé par : LG , le 06/10/2015
Date de mise en application : 06/10/2015

P. 1 / 4

Test Cochran et Test Grubbs

Laboratoire : ARCACHON



Etude de l'étalonnage (5 points)

Contrôle de l'homogénéité des variances par le test de Cochran

Nutriment **Co Spinach**

Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	87,73	45,13	20,39	11,11	3,21
Variance de chaque niveau	3,49E+00	2,07E+00	1,67E-01	2,60E-01	9,26E-02
Somme des variances	6,08E+00				
Variance maximum	3,49E+00				
C = stat. de Cochran	5,74E-01				
Valeur critique seuil 1%	0,715				
Résultat	acceptable				

Recherche de résultat(s) singulier(s) par le test de Grubbs

Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	87,73	45,13	20,39	11,11	3,21
Ecart-type	1,867	1,439	0,409	0,510	0,304
Moyenne	89,717	46,839	21,255	11,854	3,605
Valeur maximum	92,388	48,635	21,838	12,728	4,222
Valeur minimum	88,021	44,976	20,818	11,137	3,429
Valeur critique seuil 5%	1,715				

Moyenne max

G = stat de Grubbs	1,431	1,248	1,425	1,712	2,028
Résultat	acceptable	acceptable	acceptable	acceptable	pas acceptable

Moyenne min

G = stat de Grubbs	0,908	1,294	1,069	1,407	0,577
Résultat	acceptable	acceptable	acceptable	acceptable	acceptable

Données e-arC11en15 - Tableau des grandeurs retrouvées ($\mu\text{mol/L}$)

Grandeur théorique	Tableau des grandeurs retrouvées ($\mu\text{mol/L}$)				
	87,73	45,13	20,39	11,11	3,21
29/03/2016 (1)	88,021	46,302	20,818	11,774	3,514
29/03/2016 (2)	91,238	46,870	21,515	11,913	3,524
21/03/2016 (1)	88,197	44,976	20,843	11,137	4,222
22/03/2016	88,152	45,860	21,074	11,836	3,463
05/04/2016 (2)	90,303	48,635	21,443	11,740	3,429
25/05/2016	92,388	48,393	21,838	12,728	3,477
Moyenne	89,717	46,839	21,255	11,854	3,605
Ecart-type	1,867	1,439	0,409	0,510	0,304
Variance	3,48572995	2,072	0,167	0,260	0,093

Ce document est propriété de Ifremer et ne peut être reproduit ou communiqué sans autorisation

Annexe 8 : Etude de la LQ présumée

e-arC11en17v00.xls
 Approuvé par : LG , le 12/02/2014
 Date de mise en application : 12/02/2014

P. 1 / 6

Feuille de calcul des LQs présumées

Laboratoire : ARCACHON



Plan B - Etude d'une LQ présumée

Nutriment	chlorophylle a	Domaine d'étalonnage	
Limite de quantification (LQ) présumée	0,401176	µmol/L	EMA

2 fois 5 analyses sont réalisées à des conditions de fidélité intermédiaire

Echantillons	Série	Grandeurs mesurées (µmol/L)			Grandeur moyenne (µmol/L)
1	29/03/2016 (1)	0,416	0,416	0,416	0,416
2	29/03/2016 (2)	0,437	0,437	0,437	0,437
3	22/03/2016 (2)	0,311	0,311	0,311	0,311
4	21/03/2016 (2)	0,517	0,517	0,517	0,517
5	05/04/2016	0,364	0,364	0,364	0,364
6	25/05/2016	0,362	0,362	0,362	0,362

Paramètres d'exactitude de la LQ présumée

Nombre de séries n	6
Nombre de répétition r	3
Variance de répétabilité $s_{\text{répét}}^2$	1,54E-33
Variance des moyennes $s(z_i)^2$	5,196E-03
Variance inter-séries s_B^2	5,196E-03
Variance de fidélité intermédiaire s_{LQ}^2	5,196E-03
Moyenne générale Z_{LQ}	0,401
Ecart-type de fidélité intermédiaire s_{LQ}	0,07
CV de fidélité intermédiaire CV_{LQ}	18,0%
Ref	0,40
EMA = 60 % x Ref	0,24
LQ + 60 % * LQ	0,64
$Z_{LQ} + 2 * s_{LQ}$	0,55
$Z_{LQ} - 2 * s_{LQ}$	0,26
LQ - 60 % * LQ	0,16

Inégalité 1	$Z_{LQ} - 2 * s_{LQ} > LQ - 60\% * LQ$	inégalité vérifiée
Inégalité 2	$Z_{LQ} + 2 * s_{LQ} < LQ + 60\% * LQ$	inégalité vérifiée


L'exactitude de la LQ présumée est	vérifiée
------------------------------------	----------

Ce document est propriété de l'Ifremer et ne peut être reproduit ou communiqué sans autorisation

Annexe 9 : Résultats des tests de Cochran et Grubbs pour l'étude de la LQ

e-arC11en20v00.xls
 Approuvé par : LG, le 08/10/2015
 Date de mise en application : 08/10/2015

P. 1 / 1

Test Cochran et Test Grubbs	
Laboratoire : ARCACHON	
Etude de la limite de quantification	
Contrôle de l'homogénéité des variances par le test de Cochran	

Paramètre	Chla					
Serie	29/03/2016 (1)	29/03/2016 (2)	22/03/2016 (2)	21/03/2016 (2)	05/04/2016	25/05/2016
Variance de chaque niveau	5,10E-07	0,00E+00	7,36E-06	9,92E-09	0,00E+00	2,63E-07
Somme des variances	8,14E-06					
Variance maximum	7,36E-06					
C = stat, de Cochran	0,903855711					
Valeur critique seuil 1%	0,664					
Résultat	pas acceptable					

Recherche de résultat(s) singulier(s) par le test de Grubbs


Concentration (µmol/L)	0,40	Moyenne max	
Ecart-type	0,077	G = stat de Grubbs	1,270
Moyenne	0,357	Résultat	acceptable
Valeur maximum	0,455	Moyenne min	
Valeur minimum	0,222	G = stat de Grubbs	1,759
Valeur critique seuil 1%	1,973	Résultat	acceptable

Données e-arC11en17 - Tableau des grandeurs mesurées (µmol/L)

Echantillons	Série	Grandeurs mesurées (µmol/L)			Grandeur moyenne (µmol/L)	Variances
1	29/03/2016 (1)	0,455	0,454	0,454	0,454	5,10E-07
2	29/03/2016 (2)	0,222	0,222	0,222	0,222	0,00E+00
3	22/03/2016 (2)	0,396	0,391	0,391	0,393	7,36E-06
4	21/03/2016 (2)	0,309	0,309	0,309	0,309	9,92E-09
5	05/04/2016	0,356	0,357	0,357	0,357	2,63E-07
6	25/05/2016	0,409	0,409	0,409	0,409	0,00E+00

Annexe 10 : Etude de Rendements

Etude de rendement
Laboratoire : ARCACHON



Série	Répétitions			Moyenne	Valeur cible	Rendement %	Variance des séries repetabilité
1	20,3378935	20,3397863	20,3397863	20,3391553	18,9188152	1,075075536	1,1942E-06
2	19,8779486	19,8779486	19,8817341	19,8792104	18,9188152	1,050764028	4,77681E-06
3	19,8703775	19,8703775	19,8514497	19,8640682	18,9188152	1,049963649	0,00011942
4	19,6186381	19,5997103	19,5997103	19,6060196	18,9188152	1,03632386	0,00011942
5	19,5183209	19,5183209	19,4993931	19,5120116	18,9188152	1,031354841	0,00011942
Moyenne	19,840093						
Variance des Moyenne	0,103399						
variance de répétabilité	7,2846E-05						
Variance inter serie	0,10337471						
Ecart type de fidélité intermédiaire	0,32163265						
%CV	1,62%						
Moyenne rendement	104,87%						

Série	Répétitions			Moyenne	Valeur cible	Rendement %	Variance des séries repetabilité
1	76,2410749	76,2789305	76,2789305	76,2663119	73,1747755	1,042248664	4,78E-04
2	76,3924971	76,3924971	76,4303526	76,4051156	73,1747755	1,044145542	4,78E-04
3	76,0707249	76,0707249	76,0707249	76,0707249	73,1747755	1,039575789	0,000000
4	75,4650362	75,4271806	75,4271806	75,4397991	73,1747755	1,030953613	0,0004777
5	75,3703973	75,3703973	75,3893251	75,3767065	73,1747755	1,030091395	0,00011942
Moyenne	75,9117316						
Variance des Moyenne	0,22585149						
variance de répétabilité	0,00031049						
Variance inter serie	0,22574799						
Ecart type de fidélité intermédiaire	0,47545608						
%CV	0,63%						
Moyenne rendement	103,74%						

Annexe 11: Profil d'exactitude de la méthode de dosage de la chlorophylle a dans l'acétone 90%

Profil d'exactitude					
Laboratoire : ARCACHON					
Limite d'acceptabilité (λ)	15%	15%	15%	15%	15%
Niveaux	Niveau A	Niveau B	Niveau C	Niveau D	Niveau E
Concentration moyenne théorique ($\mu\text{g/L}$)	83,43057854	43,9639935	18,7276382	10,2949068	3,34722239
Concentration moyenne retrouvée ($\mu\text{g/L}$)	81,991	42,528	18,745	10,401	2,932
Fidélité					
Ecart-type de répétabilité (s_r)	0,0322021	0,0169447	0,0056583	0,0032127	0,0040121
Ecart-type inter-séries (s_B)	2,4119585	1,7508630	0,5850507	1,1303202	0,3251053
Ecart-type de fidélité (s_{F1})	2,4121734	1,7509449	0,5850780	1,1303247	0,3251300
Coefficient de variation de fidélité	2,94%	4,12%	3,12%	10,87%	11,09%
Justesse					
Biais (%)	-1,73%	-3,27%	0,09%	1,03%	-12,39%
Intervalle de tolérance					
Nombre de degré de liberté	5,0011883	5,0006244	5,0006236	5,0000539	5,0010153
Facteur de couverture (k_{tol})	1,4758411	1,4758615	1,4758615	1,4758821	1,4758474
Ecart-type de tolérance (s_{IT})	2,6054230	1,8912283	0,6319537	0,3511780	0,3511780
Limite intervalle tolérance basse	78,1461760	39,7365603	17,8125361	8,5989985	2,4142112
Limite intervalle tolérance haute	85,8365567	45,3189423	19,6778884	12,2027772	3,4507815
Limite d'acceptabilité basse	70,91599176	37,3693945	15,9184924	8,75067076	2,84513903
Limite d'acceptabilité haute	95,94516532	50,5585926	21,5367839	11,8391428	3,84930575
Profil d'exactitude					
Récupération (%)	98,27%	96,73%	100,09%	101,03%	87,61%
Limite intervalle tolérance basse	93,7%	90,4%	95,1%	83,5%	72,1%
Limite intervalle tolérance haute	102,9%	103,1%	105,1%	118,5%	103,1%
Limite d'acceptabilité basse	85,0%	85,0%	85,0%	85,0%	85,0%
Limite d'acceptabilité haute	115,0%	115,0%	115,0%	115,0%	115,0%

Annexe 12: Profil de fidélité intermédiaire de l'étape de préparation de l'échantillon {filtration + extraction}

e-arC11en18v00.xls
 Approuvé par : LG , le 12/02/2014
 Date de mise en application : 12/02/2014

P. 1 / 6

Profil d'exactitude

Laboratoire : ARCACHON



Probabilité tolérance (p)	80%		
Limite d'acceptabilité (λ)	15%	15%	15%
Niveaux	Niveau A	Niveau B	Niveau C
Quantité moyenne théorique (μ /filtre)	0,191	0,367	0,739
Quantité moyenne théorique (μ /filtre)	0,191	0,367	0,739
Fidélité			
Ecart-type de répétabilité (s_r)	0,01078533	0,0204104	0,0228196
Ecart-type inter-séries (s_B)	0,00947615	0,0143195	0,0436756
Ecart-type de fidélité (s_{F1})	0,01435691	0,0249326	0,0492777
Coefficient de variation de fidélité	7,52%	6,79%	6,67%
Justesse			
Biais (%)	0,00%	0,00%	0,00%
Intervalle de tolérance			
Nombre de degré de liberté	11,159034	12,845669	6,7292165
Facteur de couverture (k_{tol})	1,36228321	1,3511044	1,421648
Ecart-type de tolérance (s_{IT})	0,01508474	0,0260567	0,0526797
Limite intervalle tolérance basse	0,17030969	0,332157	0,6637344
Limite intervalle tolérance haute	0,21140907	0,4025678	0,8135182
Limite d'acceptabilité basse	0,16223047	0,312258	0,6278324
Limite d'acceptabilité haute	0,21948828	0,4224668	0,8494202
Profil d'exactitude			
Récupération (%)	100,00%	100,00%	100,00%
Limite intervalle tolérance basse	89,2%	90,4%	89,9%
Limite intervalle tolérance haute	110,8%	109,6%	110,1%
Limite d'acceptabilité basse	85,0%	85,0%	85,0%
Limite d'acceptabilité haute	115,0%	115,0%	115,0%