

Essai d'aptitude par comparaison Inter-analystes pour l'évaluation des performances en identification et dénombrement du phytoplancton marin

RAPPORT D'ÉVALUATION DES COMPÉTENCES DES ANALYSTES DU PHYTOPLANCTON DANS LE
CADRE DU RESEAU D'OBSERVATION ET DE SURVEILLANCE DU PHYTOPLANCTON ET DE
L'HYDROLOGIE (REPHY) MIS EN ŒUVRE PAR L'IFREMER
EXERCICE 2019

N. Masson-Neaud, M. Brun

Aout 2020

Document version 1

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2019, au titre de l'action « B3 » « Mettre en œuvre les méthodes de bioindication dans la surveillance et l'évaluation ».

Auteurs :

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

Mélanie Brun
Ifremer centre de Nantes
Melanie.Brun@ifremer.fr

Vérification du document :

Béatrice Lalère
LNE
Beatrice.Lalere@lne.fr

Les correspondants

OFB : *Maïa Akopian*, *maia.akopian@ofb.gouv.fr*

IFREMER : *Rémi Buchet*, *Remi.Buchet@ifremer.fr*

Référence du document : Nadine Masson-Neaud, Mélanie Brun - Essai d'aptitude par comparaison Inter-analystes pour l'évaluation des performances en identification et dénombrement du phytoplancton marin - Rapport d'évaluation des compétences des analystes du phytoplancton dans le cadre du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie (REPHY) mis en œuvre par l'Ifremer-Exercice 2019- Rapport AQUAREF 2020 - 70 p.

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

1. INTRODUCTION	9
2. MATERIELS ET METHODES	10
2.1 Organisation.....	10
2.2 Interprétation statistique des résultats quantitatifs.....	11
2.3 Vérification de l'homogénéité et de la stabilité des échantillons	12
2.4 Biais	13
3. RESULTATS	13
3.1 Stratégie de comptage des opérateurs.....	13
3.2 Résultats qualitatifs.....	16
3.3 Résultats des tests d'homogénéité et de stabilité	32
3.4 Résultats quantitatifs des participants et discussion	34
4. DISCUSSION GENERALE SUR LES RESULTATS	45
5. BILAN	47

Liste des annexes :

ANNEXE I Marine Institute - IPI - International Phytoplankton Intercomparison 2018 - Instructions.....	48
ANNEXE II Marine Institute - IPI 2019- Phytoplankton counting guide	60
ANNEXE III Bibliographie	64
ANNEXE IV Résultats détaillés des analystes	66
ANNEXE V Résumé des z scores de tous les analystes.....	69
ANNEXE VI Diffusion interne Ifremer du rapport	70

Liste des photos :

Photo 1 : <i>Akashiwo sanguinea</i> échantillon IPI 201 - photo N. Neud Masson (microscope optique à contraste de phase) Taille des cellules Longueur 47 µm, largeur 33 µm.....	18
Photo 2 : <i>Azadinium spinosum</i> échantillon IPI 2019 photos : A. Le Jolivet (microscope optique à contraste de phase épifluorescence) Taille cellule : < 10 µm	19
Photos 3 : <i>Chaetoceros curvisetus</i> échantillon IPI 2019 photo : N. Neud Masson (microscope optique à contraste de phase)	20
Photos 4 : <i>Chaetoceros socialis</i> © Karl Bruun (skogenman@earthlink.net)	21
Photos 4 : <i>Chaetoceros decipiens</i> Photo N. Neud-Masson (bassin d'Arcachon mars 2001)	21
Photo 5 : <i>Chaetoceros danicus</i> échantillon IPI 2019 - photos A. Le Jolivet (microscope optique à contraste de phase). Photo A : vues cingulaire - Photo B : vue valvaire Taille des cellules : Longueur : 10 µm, largeur : 5 µm.	22

Photo 6 : <i>Corethron hystrix</i> échantillon IPI 2019 - photos N. Neud Masson (microscope optique à contraste de phase) Taille des cellules Longueur 55 µm, largeur 17 µm.....	23
Photo 7 : <i>Gonyaulax spinifera</i> échantillon IPI 2019 - photos A, B, C : N. Neud Masson (microscope optique à contraste de phase) photos D, E : A. Le Jolivet (microscopie en épifluorescence) Taille cellule Longueur : 25 µm, largeur 21 µm	24
Photo 8 : <i>Lingulodinium polyedra</i> - Photo N. Neud-Masson (bassin d'Arcachon septembre 2004)	25
Photo 9 : <i>Heterosigma Akashiwo</i> échantillon IPI 2019 photo : N. Neud Masson, (microscope optique à contraste de phase)	26
Photo 10 : <i>Prorocentrum micans</i> échantillon IPI 2019 - photos : A. Le Jolivet (A : contraste de phase B : épifluorescence). Taille des cellules Longueur : 32 µm, largeur : 20 µm.....	27
Photo 11 : <i>Prorocentrum lima</i> échantillon REPHY 2013 - photo N. Neud Masson (microscope optique à contraste de phase).	27
Photos 12 : <i>Pseudo-nitzschia seriata</i> complex échantillon IPI 2019 - A. Le Jolivet (microscope optique à contraste de phase) Photo A : Chaîne de 2 cellules en vue cingulaire, Photo B : Chaîne de 2 cellules en vue valvaire Taille des cellules : Longueur : 60 µm, largeur : 6 µm.	28
Photos 13 : Image from plankton.mio.osupytheas website (http://plankton.mio.osupytheas.fr)	28
Photos 14 : <i>Thalassiosira</i> sp. échantillon IPI 2019 - photos N. Neud Masson (microscope optique à contraste de phase) Diamètre cellule: 12 µm	29
Photo 15 : <i>Cellules de Chaetoceros curvisetus</i> en cours de sporulation ? échantillon IPI 2019 - photos N. Neud Masson (microscope optique à contraste de phase) Taille des cellules Longueur 47 µm, largeur 33 µm.....	31

Liste des figures :

Figure 1 : Planches <i>Azadinium spinosum</i> et <i>Heterocapsa</i>	19
Figure 2 : Planches <i>Chaetoceros curvisetus</i> et <i>C. debilis</i> in Tomas C. (Editor) 1997. Identifying Marine Phytoplankton. ISBN-13 978-0-12-693018-4. ISBN-10 0-12-693018-X	20
Figure 2 : Planches <i>Corethron hystrix</i> et <i>C. criophilum</i> In <i>APC12 (Advanced Phytoplankton Courses 12th edition)</i> - Diana Sarno	23
Figure 3 : Images extraites du guide de dénombrement du phytoplancton dans le cadre de l'IPI 2019 (cf. ANNEXE III)	26
Figure 3 : Images comparatives de <i>F. japonica</i> et <i>H. akashiwo</i> Schéma in Tomas C. (Editor) 1997 - Cellules vivantes ©J. Larsen - Cellules lugolées in guide E. Nézan et al	26
Figure 4 : Images extraites de l'ouvrage P. Lassus, fév. 1992 - Stage interne Ifremer phytoplancton	27
Figure 5 : Image extraite du guide de dénombrement du phytoplancton dans le cadre de l'IPI 2019 (cf. ANNEXE III). Annotations sur les caractéristiques morphologiques visibles	29
Figure 6 : <i>T. eccentrica</i>	30
Figure 7 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des log ₁₀ des résultats pour <i>Akashiwo sanguinea</i>	35

Figure 8 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour <i>Akashiwo sanguinea</i>	35
Figure 9 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des log ₁₀ des résultats pour <i>Azadinium spinosum</i>	36
Figure 10 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour <i>Azadinium spinosum</i>	36
Figure 11 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des log ₁₀ des résultats pour <i>Chaetoceros curvisetus</i>	37
Figure 12 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour <i>Chaetoceros curvisetus</i>	37
Figure 13 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des log ₁₀ des résultats pour <i>Chaetoceros danicus</i>	38
Figure 14 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour <i>Chaetoceros danicus</i>	38
Figure 15 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des log ₁₀ des résultats pour <i>Corethron hystrix</i>	39
Figure 16 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour <i>Corethron hystrix</i>	39
Figure 17 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des log ₁₀ des résultats pour <i>Gonyaulax spinifera</i>	40
Figure 18 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour <i>Gonyaulax spinifera</i>	40
Figure 19 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des log ₁₀ des résultats pour <i>Heterosigma akashiwo</i>	41
Figure 20 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour <i>Heterosigma akashiwo</i>	41
Figure 21 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des log ₁₀ des résultats pour <i>Prorocentrum micans</i>	42
Figure 22 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour <i>Prorocentrum micans</i>	42
Figure 23 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des log ₁₀ des résultats pour <i>Pseudo-nitzschia seriata</i> complex.	43
Figure 24 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour <i>Pseudo-nitzschia seriata</i> complex.	43
Figure 25 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des log ₁₀ des résultats pour <i>Thalassiosira</i> sp.	44
Figure 26 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour <i>Thalassiosira</i> sp.	44

ESSAI D'APTITUDE PAR COMPARAISON INTER-ANALYSTES POUR L'EVALUATION DES PERFORMANCES EN IDENTIFICATION ET DENOMBREMENT DU PHYTOPLANCTON MARIN - RAPPORT D'EVALUATION DES ANALYSTES DU PHYTOPLANCTON DANS LE CADRE DU RESEAU D'OBSERVATION ET DE SURVEILLANCE DU PHYTOPLANCTON ET DE L'HYDROLOGIE (REPHY) MIS EN ŒUVRE PAR L'IFREMER. EXERCICE 2019
N. Masson-Neaud, M. Brun.

RÉSUMÉ

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 2019, sur 24 analystes répartis sur 12 sites.

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. En 2019, neuf analystes du REPHY ont été inscrits à titre individuel 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, en organisant un essai complémentaire IFREMER. Au total, 20 analystes sur les 24 du REPHY ont rendu leurs résultats.

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 de permettre 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 92.5 % de résultats corrects, l'essai confirme les compétences des analystes. La microscopie en épifluorescence est une technique qui permet l'observation des thèques des dinoflagellés sans destruction du matériel et le passage du contraste de phase à l'épifluorescence peut se faire au fil de l'analyse, ce qui est un avantage par rapport à la dissection manuelle (destructrice) des cellules. En 2019 tous les laboratoires du réseau d'observateurs du REPHY à l'exception de la station de Bastia, ont un microscope équipé d'un module d'épifluorescence.

L'analyse statistique des résultats quantitatifs s'appuie sur le calcul du score z comme mesure de performance, tel que défini dans la norme NF ISO 13528 (2015). Concernant ces résultats, 91% des scores z sont compris entre les limites de tolérance ce qui est globalement très satisfaisant.

Mots clés (thématique et géographique) :

Phytoplancton, Comparaison Inter-Laboratoire (CIL), Comparaison Inter-Analyste (CIA), Essai d'aptitude.

INTER-ANALYST COMPARISON PROFICIENCY TEST TO EVALUATE MARINE PHYTOPLANKTON IDENTIFICATION AND ENUMERATION PERFORMANCE - REPORT OF ASSESSMENT OF PHYTOPLANKTON ANALYSTS IN THE FRAMEWORK OF THE OBSERVATION AND MONITORING NETWORK FOR PHYTOPLANKTON AND HYDROLOGY IN COASTAL WATERS (REPHY) IMPLEMENTED BY IFREMER. YEAR 2019.
N. Masson-Neaud, M. Brun.

ABSTRACTS

The determination of phytoplankton species and the estimation of their abundance in the context of the Phytoplankton and Hydrology Monitoring and Surveillance Network, implemented by Ifremer (REPHY), are based in 2019 on 24 analysts spread over 12 sites.

Proficiency testing by inter-laboratory or inter-analyst comparison is used to evaluate the performance of laboratories or analysts on specific skills. An International Phytoplankton Inter-comparison (IPI) is organized annually by the Marine Institute Phytoplankton unit of Galway (Ireland), to evaluate marine phytoplankton identification and enumeration performance. The IPI is implementing its inter-comparison exercises through the Marine Institute Ireland in cooperation with the Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO (IOC) through its Science and Communication Centre on Harmful Algae at the University of Copenhagen, Denmark. The UK NE Atlantic Marine Biological Analytical Quality Control Scheme (NMBAQC) is one of their partners. In 2019, nine REPHY analysts were enrolled individually to participate in the IPI. The samples sent to the relevant analysts were used to also assess the skills of non-IPI analysts. A total of 20 on 24 REPHY analysts reported their results.

This report describes the progress of the IPI and the Ifremer complementary test (Inter-Analyst Comparison) and presents only the results obtained for the Ifremer test. The objective is to provide elements to all REPHY staff in order to maintain a continuous improvement of practices and to determine actions required for this improvement.

Regarding the identification of taxa, with 92.5% of correct results, the test confirms the skills of the analysts. Epifluorescence microscopy is a technique that allows the observation of dinoflagellate theca without destruction of the material, and the transition from phase contrast to epifluorescence can be done during the analysis, which is an advantage over the manual dissection (destructive) of the cells. In 2019, all laboratories of the REPHY monitoring network except the Bastia station have a microscope equipped with an epifluorescence module.

The statistical analysis of the quantitative results is based on the calculation of the z score as a performance measure, as defined in the ISO 13528 (2015) standard. Regarding these results, 91% of z scores are within the tolerance limits, which is overall very satisfactory.

Key words (thematic and geographical area):

Phytoplankton, Inter-Laboratory Comparison, ILC, Inter-Analyst Comparison, IAC, Aptitude Test, International Phytoplankton Inter-comparison, IPI.

1. INTRODUCTION

L'Ifremer est chargé d'apporter à l'État et aux autres personnes morales de droit public son concours pour l'exercice de leurs responsabilités notamment pour le contrôle de la qualité des produits de la mer et du milieu marin (Décret du 5 juin 1984 modifié) relatif à la création, à l'organisation et au fonctionnement de l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer).

La mise en œuvre par Ifremer d'une surveillance du phytoplancton et des phycotoxines depuis 1984 par le Réseau d'observation et de surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie dans les eaux littorales (REPHY) répond à cette mission, et le concours apporté à l'Administration Centrale se concrétise particulièrement en un soutien :

- au Ministère de la Transition écologique et solidaire (MTES), à l'Office Français de la Biodiversité (OFB) et aux Agences de l'Eau des façades littorales (AEAP, AESN, AELB, AEAG, AERMC2), pour la réponse aux Directives européennes Cadre sur l'Eau (DCE) et Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) sur les parties relatives à la surveillance de l'élément phytoplancton et des paramètres hydrologiques dans le milieu littoral référencés dans le cahier de procédure REPHY¹ ;
- à la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) du Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (MAA), 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.

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 et physico-chimiques et chimiques permet de caractériser et de comprendre les processus gouvernant les écosystèmes côtiers.

En 2019, la détermination des espèces phytoplanctoniques et l'estimation de leur abondance dans le cadre du REPHY ont été réalisées par 24 analystes de l'Ifremer, répartis sur 12 sites, dont un analyste en soutien à la coordination nationale du REPHY. Les protocoles usuellement appliqués par les analystes sont décrits dans le document de méthode de Neaud-Masson². Ces protocoles s'inspirent des lignes directrices de la norme NF EN 15204 (2006) fondée sur la technique de sédimentation classique telle que définie par Utermöhl en 1958. Cette norme s'adresse spécifiquement aux analyses de routine par microscopie optique inversée, telles que pratiquées pour le REPHY, mais elle ne cite pas explicitement le recours à des exercices de comparaison inter-laboratoires (CIL) ou inter-analystes (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). Les CIL ou CIA sont utilisées pour évaluer les performances des laboratoires ou analystes sur des compétences/analyses spécifiques.

Deux CIL ont été organisées en interne à l'Ifremer en 2006 et 2007 (Grossel, 2007 ; 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 de la Commission Océanographique Intergouvernementale (COI) pour la Science et la communication sur les algues nuisibles (Danemark). Le but de cet exercice international est de comparer les performances en termes d'identification et de dénombrement du phytoplancton marin, des analystes des laboratoires engagés dans les programmes nationaux officiels de surveillance du phytoplancton, dans la DCE et dans la DCSMM,

¹ Belin Catherine, Neaud-Masson Nadine (2017). Cahier de Procédures REPHY. Document de prescription. Version 1. ODE/VIGIES/17-01. <https://doi.org/10.13155/50389>

² Neaud-Masson Nadine (2020). Observation et dénombrement du phytoplancton marin par microscopie optique. Spécifications techniques et méthodologiques appliquées au REPHY. Version 2 - février 2020. ODE/VIGIES/20/03. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00609/72133/>

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 satisfaire aux exigences relatives à la qualification du personnel et ainsi alimenter le dossier de compétence personnel de chaque analyste, requises dans la norme NF EN 15972. En 2019, neuf analystes Ifremer ont été inscrits pour participer à l'IPI.

Les échantillons envoyés aux laboratoires des analystes concernés ont été utilisés pour évaluer également les compétences des analystes réalisant des analyses de phytoplancton dans le cadre du REPHY dans ces mêmes laboratoires mais non-inscrits à l'IPI. Ce CIA complémentaire a pour objectif de permettre aux analystes des laboratoires du dispositif du REPHY d'évaluer leurs compétences vis-à-vis des résultats obtenus par l'ensemble des analystes de ce réseau. Cet exercice s'impose également pour l'évaluation des performances des observateurs et leur habilitation dans le cadre du Réseau d'observation du phytoplancton labellisé (PHYTOBS) qui regroupe les deux réseaux SOMLIT-Phyto (CNRS-Universités) et REPHY (Ifremer).

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. 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 2019, 9 des 24 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 I et ANNEXE II). Au total, 98 analystes de 52 laboratoires se sont inscrits à cet exercice (67% d'Europe, 19% d'Amérique du Sud, 10% d'Afrique, 4% d'Océanie). Les inscrits français provenant tous de l'Ifremer ont représenté 9% des participants.

Les échantillons de cet essai ont été utilisés pour étendre l'exercice aux analystes du REPHY non inscrits à l'IPI. Onze analystes, en plus des neuf inscrits à l'IPI, ont participé et ont rendu leurs résultats pour la CIA. Au total 20 analystes sur les 24 qui constituent le réseau d'observation du REPHY ont donc pu participer à cet exercice en 2019. En effet, quatre analystes n'ont pas participé car trois d'entre eux n'ont pas pu intégrer l'exercice dans leur plan de charge et un analyste est parti en retraite.

Tous les échantillons ont été préparés par Le Marine Institute de Galway. Depuis 2018, le Marine Institut utilise un homogénéiseur automatique de type Inversina 2L tumler mixer par Bioengineering, dans le but d'améliorer l'homogénéité des échantillons. Ce matériel est utilisé pour la préparation de la solution mère constituée d'un mélange d'espèces issues de cultures en laboratoire. Afin d'améliorer la stabilité des échantillons et de permettre ainsi d'allonger le délai de rendu des résultats, le Marine Institut a aussi modifié le conditionnement des échantillons en utilisant des ampoules en verre brun d'un volume de 5 mL. Dans chaque ampoule contenant 100 µl de lugol neutre, 3 mL exactement de la solution mère sont introduits. Puis les ampoules sont scellées et conservées à une température de 2 à 5 °C à l'abri de la lumière jusqu'à l'expédition aux participants.

Les tests d'homogénéité et de stabilité ont été menés par le Marine Institut. Les résultats de ces tests ont été fournis dans le rapport de R. Salas, D. Clarke et J. Larsen (International Phytoplankton Intercomparaison (IPI) proficiency testing in the abundance and composition of marine microalgae 2019 report) qui nous a été transmis le 3 juin 2020, sont utilisés pour interpréter les résultats du CIA.

En 2019, le calendrier de l'exercice IPI a été décalé en fin d'année. Les participants inscrits ont reçu le matériel à analyser début octobre 2019.

Ils 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, les analystes avaient jusqu'au 30 novembre 2019 pour rendre leurs résultats.

Au sein de chaque laboratoire du réseau de l'Ifremer, un analyste au minimum est inscrit à l'IPI. Pour la CIA, les autres analystes des laboratoires utilisent donc les échantillons reçus dans le cadre de l'IPI. Le volume de chaque aliquote (50 ml) permet la mise à décanter en cuve de deux sous échantillons. Les volumes des cuves utilisées, la date de mise à décanter ainsi que la date d'analyse sont renseignés dans la fiche de rendu des résultats. Le délai de rendu des résultats a été prolongé au 31 décembre 2019. Le traitement des résultats a été fait de manière anonyme. Pour cela, un code comprenant une lettre et un chiffre a été attribué à chaque analyste. Chaque analyste connaît son propre code et seul l'organisateur de cet essai connaît l'ensemble des correspondances analyste/code. La lettre correspond au laboratoire et le chiffre à l'analyste, mais ni l'un ni l'autre ne correspond à un ordre quelconque. L'intérêt de ce rapprochement est de visualiser les résultats au sein d'un même laboratoire et de permettre aux analystes de mener une réflexion avec les autres analystes de son laboratoire. A l'issue du traitement des résultats, chaque analyse tient compte de son évaluation pour mettre en œuvre les actions requises pour le maintien de ses compétences le cas échéant.

Concernant le matériel utiliser, En 2019 tous les laboratoires du réseau d'observateurs du REPHY à l'exception de la station de Bastia, ont un microscope équipé d'un module d'épifluorescence. En effet, la microscopie en épifluorescence est une technique qui permet l'observation des thèques des dinoflagellés sans destruction du matériel et le passage du contraste de phase à l'épifluorescence peut se faire au fil de l'analyse, ce qui est un avantage par rapport à la dissection manuelle (destructrice) des cellules.

2.2 INTERPRETATION STATISTIQUE DES RESULTATS QUANTITATIFS

L'analyse statistique des résultats s'appuie sur la norme NF ISO 13528 :2015, relative aux « Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons inter-laboratoires ».

A noter qu'un analyste n'a rendu de résultats de dénombrement que pour un seul réplica au lieu de trois attendus, ces résultats ne sont pas intégrés dans l'évaluation quantitative.

La statistique de performance utilisée pour comparer les résultats des 19 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 (c.-à-d. « 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. Pour chaque valeur assignée, l'incertitude a également été calculée selon la formule présente dans la norme NF ISO 13528 : 2015 :

$u(X_s) = 125 \times \left(\hat{\sigma}_s / \sqrt{p} \right)$, avec p 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, ce qui revient à dire qu'il faut au minimum 18 participants.

L'interprétation des scores z 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), mais dans les limites de contrôle.

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 répliquas, afin de satisfaire à l'hypothèse de normalité. Les valeurs de référence X_s et $\hat{\sigma}_s$, ainsi que les scores z ont été calculés à partir de la moyenne, sur les trois répliquas, des données transformées.

2.3 VERIFICATION DE L'HOMOGENEITE ET DE LA STABILITE DES ECHANTILLONS

En se basant sur la norme NF ISO 13528 : 2015, trois critères d'homogénéité ont été calculés à partir des données transformées (log10).

- L'écart-type inter-échantillons s_s , calculé tel que décrit dans la norme NF ISO 13528 : 2015 Annexe B, est comparé à l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude $\hat{\sigma}_s$. Si $s_s \leq 0.3 \times \hat{\sigma}_s$, alors la variance inter-échantillons ne contribue pas à plus de 10 % de la variance pour l'évaluation de l'aptitude et les échantillons peuvent être considérés comme homogènes.
- Le critère étendu, qui prend en compte également la variabilité intra-échantillons, est utilisé pour tenir compte de l'erreur d'échantillonnage et de la répétabilité réelle lors de l'essai d'homogénéité.
- Une analyse de variance (F-test), basée uniquement sur les résultats issus du test d'homogénéité, est également réalisée afin d'identifier s'il y a une différence ou non de résultat entre les échantillons.

Selon la norme NF ISO 13528 : 2015, il est indiqué que si les critères d'homogénéité suffisante ne sont pas satisfaits, il faut inclure l'écart-type inter-échantillons dans l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude, tel que $\hat{\sigma}'_s = \sqrt{(\hat{\sigma}_s)^2 + (s_s)^2}$.

De même, deux critères de stabilité ont été calculés :

- La différence absolue entre les moyennes des résultats des tests d'homogénéité ($\bar{X}_{hom.}$) et de stabilité ($\bar{X}_{stab.}$) est comparée à l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude $\hat{\sigma}_s$. Si $|\bar{X}_{hom.} - \bar{X}_{stab.}| \leq 0.3 \times \hat{\sigma}_s$, alors les échantillons sont considérés comme stables.
- Le critère peut également être élargi en prenant en compte les incertitudes des grandeurs $\bar{X}_{hom.}$ et $\bar{X}_{stab.}$.

2.4 BIAIS

Dans la norme NF ISO 13528 : 2015, il est indiqué que lorsque la valeur assignée est estimée à partir des résultats des participants et qu'une estimation indépendante fiable est disponible, soit dans notre cas la moyenne obtenue dans le cadre des tests d'homogénéité, les deux valeurs doivent être comparées. Pour cela, il est nécessaire de calculer l'incertitude type de la différence d'après la formule :

$$u(X_{ref} - X_s) = \sqrt{u^2(X_{ref}) + u^2(X_s)} ,$$

avec :

- $u(X_{ref})$ l'incertitude de la valeur de référence ;
- $u(X_s)$ l'incertitude de la valeur assignée.

Si la différence entre la valeur de référence et la valeur assignée est supérieure à deux fois $u(X_{ref} - X_s)$, il est nécessaire d'en chercher la cause. Selon la norme et dans le cas présent, les causes possibles sont :

- biais dans la méthode de mesure de référence ;
- biais commun dans les résultats des participants.

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.

Pour les analystes inscrits à l'IPI international, les codes sous surlignés.

Le délai "récep/décant." est l'écart en nombre de jours entre la date de réception et la mise à décanter de l'échantillon et le délai "décant/anal." correspond au nombre de jours entre la préparation des cuves et l'analyse.

Tableau 1 : Déroulement des analyses par codes laboratoires et analystes – Délais en nombre de jours
(Les codes des analystes ayant participé à l'IPi sont en italique-soulignés)

CODE Labo- Analyst	1er réplica					2ème réplica					3ème réplica				
	volume cuve (ml)	Date décantation	date analyse	Délai récep/décant (Nb jours)	délai décant/anal (Nb jour)	volume cuve (ml)	Date décantation	date analyse	Délai récep/décant (Nb jours)	délai décant/anal (Nb jour)	volume cuve (ml)	Date décantation	date analyse	Délai récep/décant (Nb jours)	délai décant/anal (Nb jour)
A-01	25	21/10/19	23/10/19	14	2	25	28/10/19	30/10/19	21	2	25	04/11/19	06/11/19	27	2
A-26	25	21/10/19	22/10/19	14	1	25	28/10/19	29/10/19	21	1	25	04/11/19	05/11/19	27	1
B-94	25	30/10/19	31/10/19	28	1	25	13/11/19	14/11/19	41	1	25	27/11/19	28/11/19	55	1
C-74	25	18/11/19	29/11/19	44	11	25	18/11/19	29/11/19	44	11	25	18/11/19	29/11/19	44	11
D-08	24	21/11/19	22/11/19	30	1	25	25/11/19	26/11/19	34	1					
E-06	25	03/10/19	01/12/19	0	58	25	03/10/19	01/12/19	0	58					
E-46	25	03/10/19	08/10/19	0	5	25	03/10/19	04/10/19	0	1	25	03/10/19	10/10/19	0	7
F-10	25	14/10/19	15/10/19	12	1	25	14/10/19	15/10/19	12	1	25	14/10/19	16/10/19	12	2
F-79	25	14/10/19	15/10/19	12	1	25	14/10/19	15/10/19	12	1	25	14/10/19	15/10/19	12	1
G-09	25	03/10/19	08/10/19	0	5	25	03/10/19	09/10/19	0	6	25	10/10/19	15/10/19	7	5
G-04	25	28/01/20	30/01/20	115	2	25	28/01/20	30/01/20	115	2					
H-11	10	08/10/19	10/10/19	5	2	10	05/11/19	07/11/19	32	2	10	28/01/20	29/01/20	115	1
H-12	10	03/10/19	04/10/19	0	1	10	10/10/19	11/10/19	7	1	10	24/10/19	25/10/19	21	1
H-66	10	03/10/19	09/10/19	0	6	10	10/10/19	16/10/19	7	6	10	24/10/19	28/10/19	21	4
I-03	10	27/01/20	30/01/20	114	3	10	27/01/20	30/01/20	114	3	10	27/01/20	31/01/20	114	4
I-97	10	08/10/19	09/10/19	5	1	10	17/10/19	18/10/19	14	1	10	21/10/19	23/10/19	18	2
J-05	20	14/10/19	15/10/19	11	1	20	15/10/19	17/10/19	12	2	20	17/10/19	18/10/19	14	1
J-07	20	14/10/19	15/10/19	11	1	20	17/10/19	18/10/19	14	1	20	15/10/19	16/10/19	12	1
J-52	20	14/10/19	15/10/19	11	1	20	15/10/19	17/10/19	12	2	20	17/10/19	18/10/19	14	1

Dans les instructions de l'IPI (cf. ANNEXE I), 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. Globalement, les participants ont utilisé des cuves de 20 ou 25 ml, sauf les analystes H-11, H-12, H-66, I-03 et I-97 qui 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. Pour assurer une bonne conservation des échantillons, les recommandations de la norme NF EN 15204 (2006) 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** ».

Cette année, le conditionnement des échantillons fournis par le Marine Institut a évolué de manière à assurer une meilleure stabilité dans le temps. Précédemment les échantillons étaient prêts à l'emploi, c'est-à-dire prêt à être directement transférés dans les cuves à décanter. Cette année ils étaient conditionnés en ampoules en verre brun stériles. Ainsi, la stabilité des échantillons a été testée par le Marine institut qui assure une conservation pendant une longue période (au moins un an) sans dégradation. **De ce fait, le délai entre la réception des échantillons et l'analyse ne devrait pas impacter les résultats. En revanche, les délais entre la préparation des cuves et l'analyse peut avoir un impact car une fois les échantillons préparés et mis à décanter, la stabilité n'est plus assurée.**

A noter que l'analyste **G-02** n'a rendu de résultats de dénombrement que pour un seul réplica au lieu de trois attendus, ces résultats ne sont pas intégrés dans l'évaluation quantitative. Toutefois, l'analyste est évalué sur ses résultats qualitatifs.

A noter également que les analystes D-08, E-06 et G-04 n'ont rendu de résultats que pour deux réplicas seulement. Les valeurs manquantes du troisième réplica ne sont pas intégrées dans l'évaluation.

Les raisons pour lesquelles les analystes n'ont pas pu rendre les trois comptages attendus sont dues principalement à des cas de transferts d'échantillons entre deux sites. Dans un cas un des colis a été perdu par le transporteur, dans les autres cas, les échantillons étaient trop dégradés.

3.2 RESULTATS QUALITATIFS

Composition spécifique de référence

Comme stipulé dans le rapport final de l'IPI, les échantillons comprenaient les dix espèces suivantes :

Akashiwo sanguinea (K. Hirasaka) Gert Hansen & Moestrup, 2000

Azadinium spinosum Elbrächter & Tillmann, 2009

Chaetoceros curvisetus Cleve, 1889

Chaetoceros danicus Cleve, 1889

Corethron hystrix Hensen, 1887

Gonyaulax spinifera (Claparède & Lachmann) Diesing, 1866

Heterosigma Akashiwo (Y. Hada) Y. Hada ex Y. Hara & M. Chihara, 1987

Prorocentrum micans Ehrenberg, 1834

Pseudo-nitzschia seriata complex (Cleve) H. Peragallo, 1899

Thalassiosira sp. P.T. Cleve, 1873 Emend. Hasle, 1973 - Plus précisément l'espèce était *T. tenera* Proschkina-Lavrenko, 1961

Résultats qualitatifs des participants

Une liste fermée d'espèces est proposée pour le rendu des résultats. Ceci 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 (e.g. 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 ce format empêche les réponses comme par exemple « dinoflagellé non identifié », « diatomée centrique » ou « dinoflagellé nu ».

Le tableau suivant présente les identifications taxinomiques de chaque analyste. Pour les analystes inscrits à l'IPI international, les codes sont surlignés. Les identifications attendues sont indiquées en têtes de colonnes. La case est colorée en vert lorsque l'identification au niveau attendu est correcte (espèce ou complexe d'espèces), 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 Labo-analyste	<i>Akashiwo sanguinea</i>	<i>Azadinium spinosum</i>	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	<i>Chaetoceros danicus</i>	<i>Corethron hystrix</i>	<i>Gonyaulax spinifera</i>	<i>Heterosigma akashiwo</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> complex	<i>Thalassiosira</i> sp.
A-01		<i>Heterocapsa</i> sp.	<i>Chaetoceros socialis</i>			<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Fibrocapsa japonica</i>		<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	
A-26		<i>Azadinium / Heterocapsa</i> sp.	<i>Chaetoceros socialis</i>			<i>Lingulodinium polyedrum</i>	<i>Fibrocapsa japonica</i>		<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	
B-94		<i>Azadinium / Heterocapsa</i> sp.	<i>Chaetoceros</i> sp. (<i>Hyalochates</i>)			<i>Lingulodinium polyedrum</i>				
C-74		<i>Azadinium / Heterocapsa</i> sp.	<i>Chaetoceros</i> sp. (<i>Hyalochates</i>)						<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> complex	
D-08		<i>Azadinium</i> sp.	<i>Chaetoceros</i> sp. (<i>Hyalochates</i>)		<i>Corethron criophilum</i>					
E-06						<i>Lingulodinium polyedrum</i>				
E-46			<i>Chaetoceros</i> sp. (<i>Phaeoceros</i>)			<i>Lingulodinium polyedrum</i>				
F-10		<i>Azadinium</i> sp.	<i>Chaetoceros</i> sp. (<i>Phaeoceros</i>)			<i>Lingulodinium polyedrum</i>			<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> complex	
F-79			<i>Chaetoceros debilis</i>						<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	
G-02		<i>Azadinium / Heterocapsa</i> sp.	NO			<i>Gonyaulax</i> spp.	NO			<i>Actinocyclus</i> sp.
G-09		<i>Azadinium / Heterocapsa</i> sp.	<i>Chaetoceros</i> sp. (<i>Hyalochates</i>)			<i>Lingulodinium polyedrum</i>			<i>Pseudo-nitzschia australis</i> complex	
G-04		<i>Azadinium</i> sp.							<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	
H-11		<i>Azadinium</i> sp.			<i>Corethron criophilum</i>	<i>Gonyaulax</i> spp.		<i>Prorocentrum lima</i>	<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	
H-12		<i>Azadinium</i> sp.			<i>Corethron criophilum</i>				<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	<i>Thalassiosira eccentrica</i>
H-66		<i>Azadinium / Heterocapsa</i> sp.			<i>Corethron criophilum</i>				<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	
I-03		<i>Azadinium</i> sp.	<i>Chaetoceros decipiens</i>		<i>Corethron criophilum</i>	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	NO		<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> complex	<i>Thalassiosira oceanica</i>
I-97			<i>Attheya</i> sp.						<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	
J-05									<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	
J-07									<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	
J-52									<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	

Légende

	Espèce ou complexe d'espèces correct	149 cases vertes / 200	74,5%
	Genre correct	36 cases bleues / 200	18%
	Genre incorrect ou non observé (NO)	15 cases rouges / 200	7,5%
	Analyste inscrit à l'IPI (Galway)		

74,5% des identifications sont correctes au niveau de l'espèce ou groupe d'espèces. *Pseudo-nitzschia fraudulenta* et *P. australis* faisant partie du complexe *P. seriata* ces réponses sont considérées comme correctes au niveau de l'espèce ou groupe d'espèces. Les identifications correctes au niveau des genres ou espèces cumulées représentent 92,5 % des résultats. Les analystes A-01 et A-26 ont observé des *Chaetoceros diadema* et des *Licmophora* qui étaient absents dans les échantillons (non présenté dans le tableau).

Akashiwo sanguinea (K. Hirasaka) Gert Hansen & Moestrup, 2000

Tous les analystes ont correctement identifié l'espèce *Akashiwo sanguinea*.

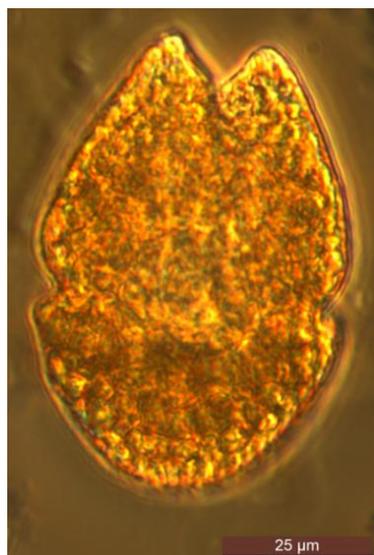


Photo 1 : *Akashiwo sanguinea* échantillon IPI 201 - photo N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)
Taille des cellules Longueur 47 μm, largeur 33 μm

Malgré une certaine variabilité morphologique, cette espèce de grande taille se distingue aisément et peut être facilement identifiée. Le choix ne pouvait s'orienter vers aucune des autres espèces proposées pour le rendu des résultats.

Azadinium spinosum Elbrächter & Tillmann, 2009

L'espèce *Azadinium spinosum* a été correctement identifiée par 7 analystes, 6 analystes ont identifié le genre *Azadinium*, 6 analystes ont choisi le regroupement *Azadinium* / *Heterocapsa* et un le genre *Heterocapsa*. Chacune de ces identifications a été acceptée comme correcte

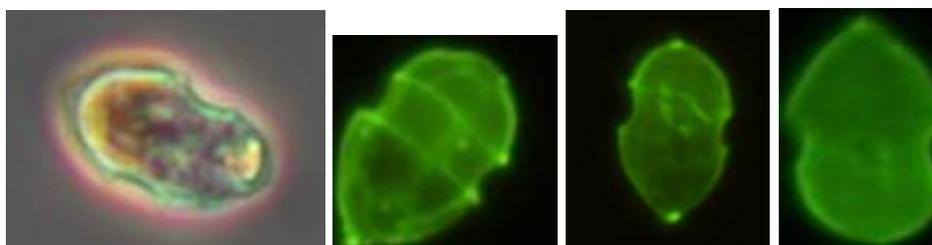


Photo 2 : *Azadinium spinosum* échantillon IPI 2019
photos : A. Le Jolivet (microscope optique à contraste de phase épifluorescence)
Taille cellule : < 10 µm

La difficulté majeure avec les cellules des échantillons de l'essai, est la visualisation de l'épine antapicale d'*A. spinosum*. Celle-ci est très légèrement visible sur les photos

Azadinium et *Heterocapsa* sont deux genres de Dinoflagellés cuirassés, qu'il est très difficile de distinguer en microscopie optique photonique. Il est aussi très difficile de distinguer les plaques même avec la technique de l'épifluorescence.

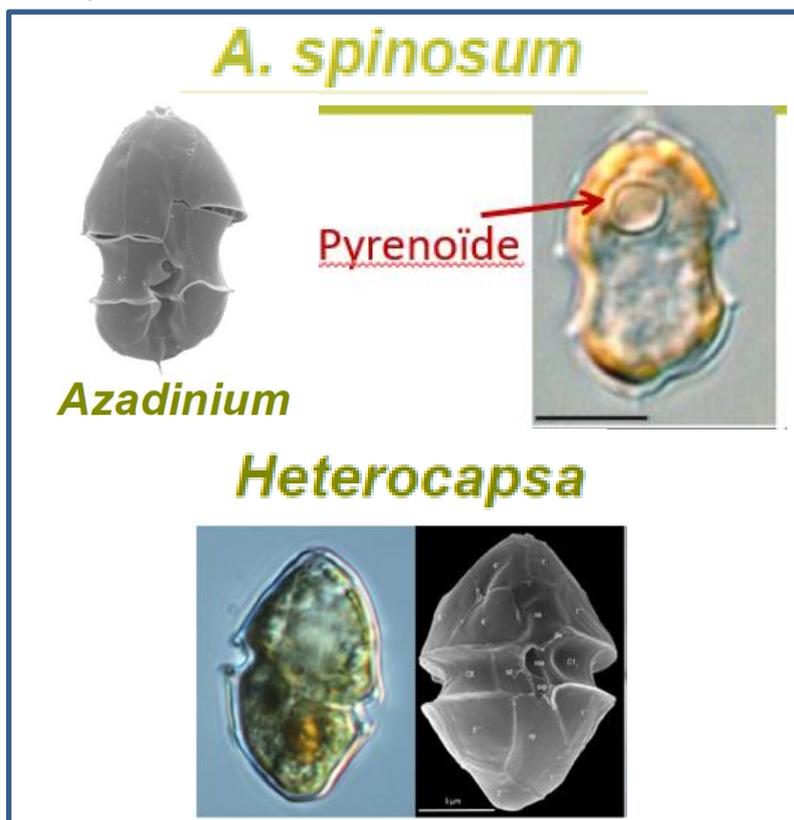


Figure 1 : Planches *Azadinium spinosum* et *Heterocapsa*



Mona Hoppenrath

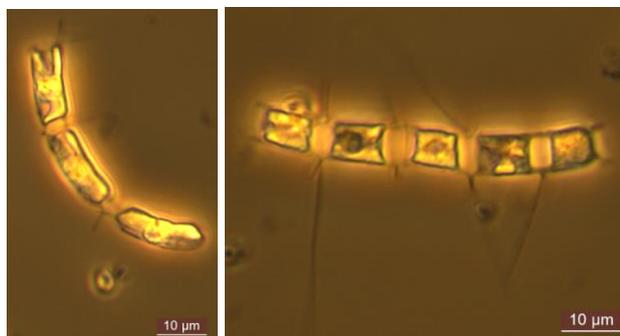
Senckenberg am Meer, DZMB, Wilhelmshaven, Germany

Sur les images extraites de la présentation du Dr Mona Hoppenrath lors de la formation APC 12³, on peut noter que chez *A. spinosum* le cingulum est large et peu creusé comparé à celui d'*Heterocapsa* qui est plus étroit et plus profond. On peut observer ce caractère sur les images des cellules des échantillons de l'essai.

³ APC 12 : 12th Advanced Phytoplankton Course - Station Biologique de Roscoff 2019.

Chaetoceros curvisetus Cleve, 1889

Tous les analystes sauf 2 ont reconnu le genre *Chaetoceros*. Huit ont correctement identifié l'espèce *C. curvisetus*. Un analyste a identifié le genre *Attheya*. Certaines espèces d'*Attheya* sont alternativement acceptées comme des *Chaetoceros* dans le WorMS⁴. Un analyste n'a pas observé cette espèce.



Photos 3 : *Chaetoceros curvisetus* échantillon IPI 2019
photo : N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)

Les différentes espèces identifiées, autres que *C. curvisetus* sont : *C. socialis*, *C. debilis* et *C. decipiens* ou bien les groupes Hyalochaetes ou Phaeoceros. *C. curvisetus* ayant des soies fines et fragiles dépourvues de chloroplastes, fait bien partie du groupe des Hyalochaete et non des Phaeoceros.

	Phaeoceros	Hyalochaete
Nb de soie par valve	1 paire	Généralement 1 paire, 1 seule soie chez certaines espèces
Soies	Solides, épaisses, avec chloroplastes et épines	Généralement fines et fragiles, absence de chloroplaste
Chloroplastes	Chloroplastes nombreux, petits, présents dans la cellule et les soies	1, 2 ou plus
Spores	Connus chez une seule espèce	Connus pour la plupart des espèces

La confusion avec *C. debilis*, qui est également un Hyalochaete, peut se concevoir. *C. curvisetus* et *C. debilis* forment tous les deux des chaînes incurvées. Ces deux espèces proches morphologiquement peuvent être discriminées principalement par la forme de l'aperture (espace entre les cellules). Chez *C. curvisetus* l'aperture est de forme ovale et plus large que chez *C. debilis* pour lequel les bords de cet espace sont parallèles avec une légère constriction au centre. Les chaînes de *C. debilis* sont nettement spiralées (twistées) et pas simplement courbées (voir Figure 2).

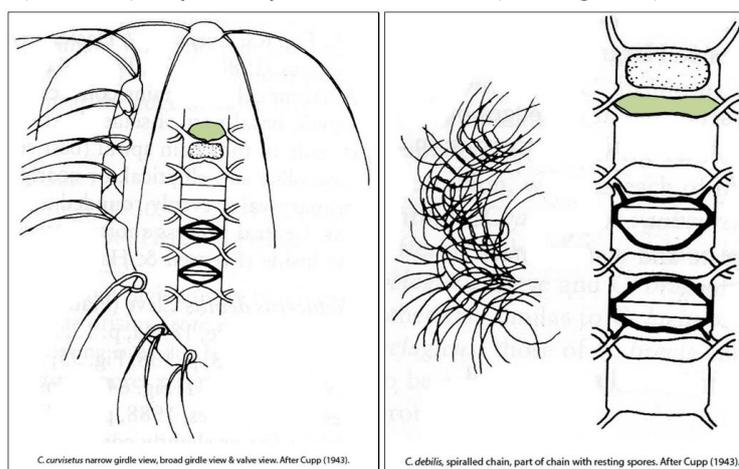
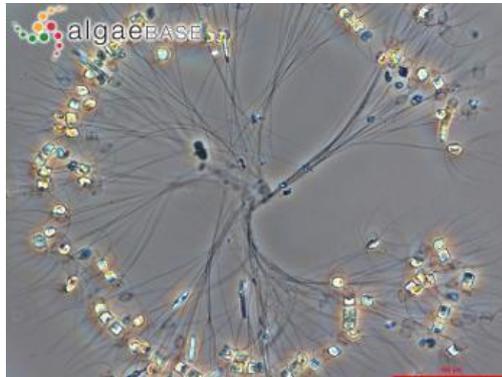


Figure 2 : Planches *Chaetoceros curvisetus* et *C. debilis*
in Tomas C. (Editor) 1997. Identifying Marine Phytoplankton. ISBN-13 978-0-12-693018-4. ISBN-10 0-12-693018-X

⁴ World Register of Marine Species

Autres confusions rencontrées :

Les *C. socialis* ont des cellules de très petite taille, caractérisées par trois soies courtes et une longue s'étendant de chaque cellule. Les longues soies de plusieurs cellules se rejoignant en un centre commun pour former de grandes colonies sphéroïdes et non pas en ruban incurvé comme *C. curvisetus*.



Photos 4 : *Chaetoceros socialis*
© Karl Bruun (skogenman@earthlink.net)

Les caractères de *C. decipiens* devaient permettre de rejeter cette hypothèse. Les *C. decipiens*, qui font partie toutefois des Hyalochaete en raison de l'absence de chloroplaste dans leurs soies, ont des cellules généralement de plus grande taille, comportant de nombreux petits chloroplastes, leurs soies sont épaisses et fusionnées à la base sur une longueur supérieure à leur épaisseur.



Photos 5 : *Chaetoceros decipiens*
Photo N. Neaud-Masson (bassin d'Arcachon mars 2001)

Chaetoceros danicus Cleve, 1889

L'espèce *Chaetoceros danicus* a été identifiée par tous les analystes.

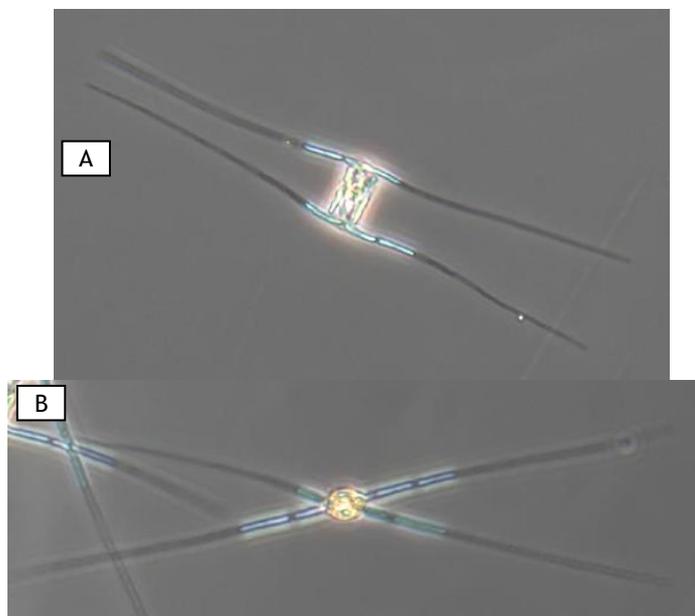


Photo 6 : *Chaetoceros danicus* échantillon IPI 2019 - photos A. Le Jolivet (microscope optique à contraste de phase).

Photo A : vues cingulaire – Photo B : vue valvaire

Taille des cellules : Longueur : 10 μm , largeur : 5 μm .

Les cellules sont généralement solitaires ou en courtes chaînes de deux ou trois cellules. Elles sont rectangulaires en vue cingulaire et portent des soies longues et raides, perpendiculaires à l'axe de la chaîne et se croisant à angle aigu en vue valvaire. Il y a de nombreux chloroplastes dans la cellule et en particulier dans les soies ce qui les fait appartenir au groupe des Phaeoceros.

Tableau 3 : Comparaison des principaux caractères morphologiques des groupes Phaeoceros et Hyalochaete

	Phaeoceros	Hyalochaete
Nb de soie par valve	1 paire	Généralement 1 paire, 1 seule soie chez certaines espèces
Soie	Solides, épaisses, avec chloroplastes et épines	Fines et fragiles, absence de chloroplaste
Chloroplastes	Chloroplastes nombreux, petits présents dans la cellule et les soies	Peu nombreux (1, 2 ou plus)

Corethron hystrix Hensen, 1887

Tous les analystes ont reconnu le genre *Corethron* et 15 l'espèce *C. hystrix*.

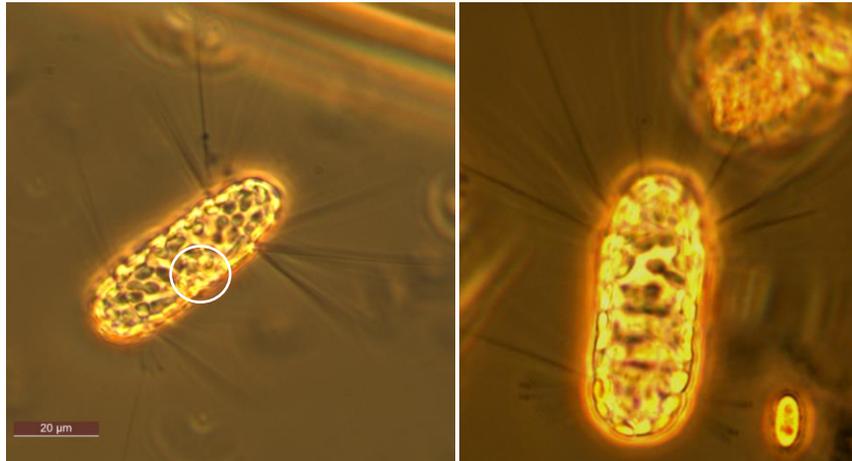


Photo 7 : *Corethron hystrix* échantillon IPI 2019 - photos N. Neaud Masson
(microscope optique à contraste de phase)
Taille des cellules Longueur 55 µm, largeur 17 µm

La difficulté était de distinguer *C. hystrix* de *C. criophilum*. Les cellules des échantillons sont plutôt trapues. On devine le positionnement du noyau en bordure et non au centre, visible en faisant varier la mise au point (cercles blancs sur les photos). Ce qui oriente l'identification vers *C. hystrix*.

<p><i>C. hystrix</i> Cellule trapue solitaire Noyau près du cingulum Crochets triangulaires</p>	<p><i>C. Pennatum</i> (Syn. <i>C. criophilum</i>) Cellule longue solitaire Noyau au centre Crochets épines robustes</p>

Figure 3 : Planches *Corethron hystrix* et *C. criophilum*
In APC12 (Advanced Phytoplankton Courses 12th edition) – Diana Sarno



Gonyaulax spinifera (Claparède & Lachmann) Diesing, 1866

Dix analystes ont correctement identifié l'espèce *Gonyaulax spinifera*. Deux, se sont arrêtés au genre *Gonyaulax*. Huit ont identifié l'espèce *Lingulodinium polyedra*.

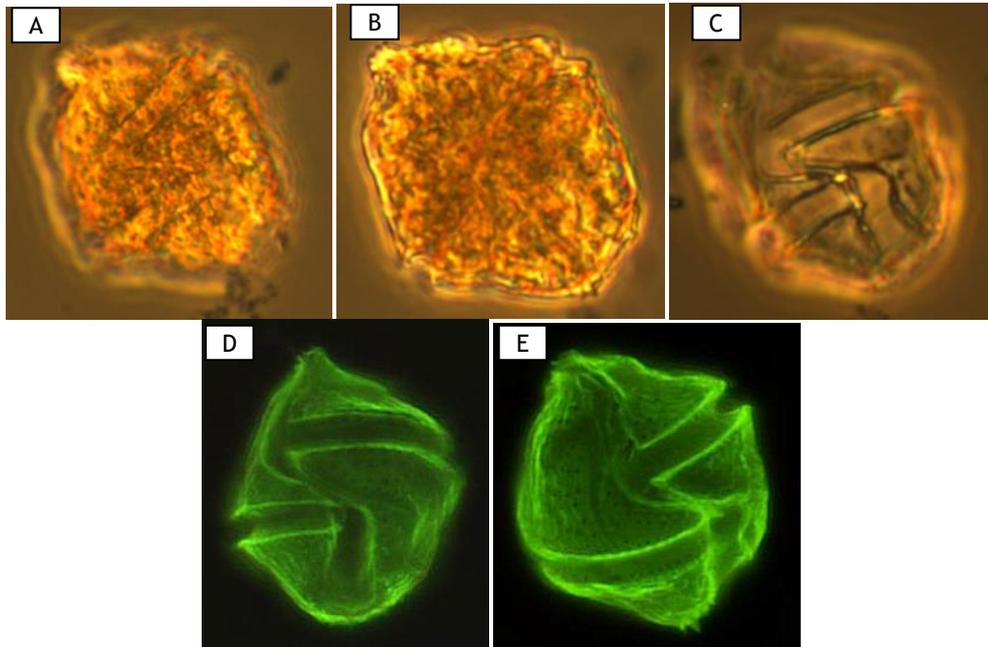


Photo 8 : *Gonyaulax spinifera* échantillon IPI 2019 -
 photos A, B, C : N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)
 photos D, E : A. Le Jolivet (microscopie en épifluorescence)
 Taille cellule Longueur : 25 µm, largeur 21 µm

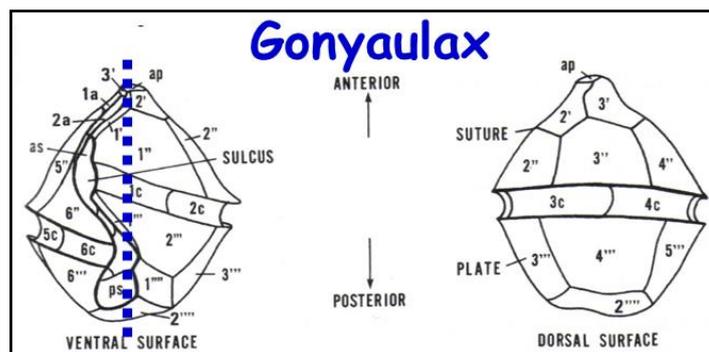


Figure 1 : In APC12 (Advanced Phytoplankton Courses 12th edition) – J. Larsen et M. Montresor

Les *Gonyaulax* ont une épithèque avec les cotés convexes et une corne apicale courte mais marquée. Le cellules sont asymétriques, avec un cingulum descendant de manière très prononcée en particulier chez *G. spinifera* (2 à 3 fois sa largeur) formant un angle de 30 à 40° par rapport à l'axe longitudinal de la cellule. *G. spinifera* porte souvent deux à quatre fines épines antapicales.

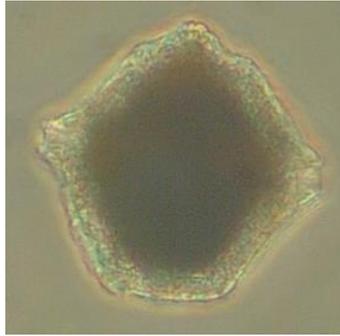


Photo 9 : *Lingulodinium polyedra* - Photo N. Neaud-Masson (bassin d'Arcachon septembre 2004)

Lingulodinium polyedra est également un Gonyaulacales. Les cellules sont de forme pentagonale, les côtés de l'épithèque sont concaves. Le cingulum est beaucoup moins descendant que chez *Gonyaulax*, et l'antapex est plat sans aucune épine.

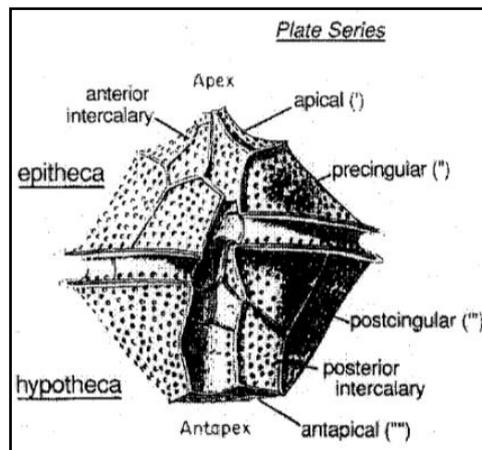


Figure 1 : In APC12 (*Advanced Phytoplankton Courses 12th edition*)—J. Larsen et M. Montresor



Heterosigma Akashiwo (Y. Hada) Y. Hada ex Y. Hara & M. Chihara, 1987

16 analystes ont correctement identifié l'espèce *Heterosigma Akashiwo*. 2 analystes ne l'ont pas observé et 2 ont identifié *Fibrocapsa japonica*.

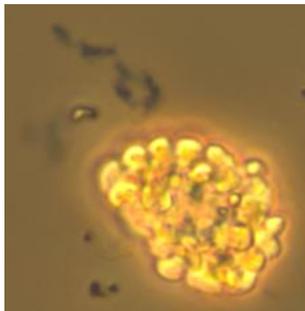


Photo 10 : *Heterosigma Akashiwo* échantillon IPI 2019
photo : N. Neaud Masson, (microscope optique à contraste de phase)

Heterosigma Akashiwo et *Fibrocapsa japonica* sont deux espèces appartenant à la classe des raphidophyceae dont les cellules (taille 10-20 µm) perdent leur forme originale sous l'action du lugol. Les cellules deviennent presque rondes aux contours irréguliers (aspect d'une framboise). Selon les auteurs on ne peut pas distinguer ces deux espèces lorsqu'elles sont fixées au lugol. Toutefois, dans le guide fourni par l'organisateur des images concernant ces cellules étaient présentées ; voir ci-dessous.

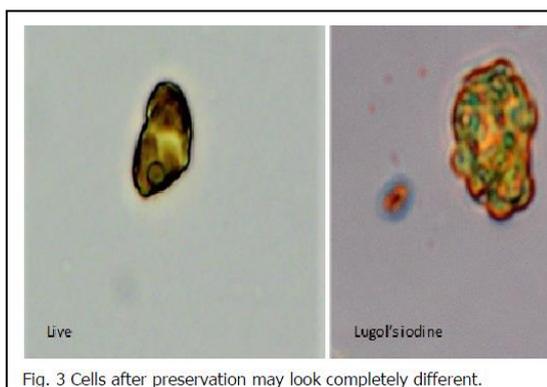


Fig. 3 Cells after preservation may look completely different.

Figure 4 : Images extraites du guide de dénombrement du phytoplancton dans le cadre de l'IPI 2019 (cf. ANNEXE II)

Ces images, et en particulier celle de la cellule vivante, permettaient d'orienter l'identification vers *Heterosigma*, compte tenu de la forme de la cellule : allongée, invaginée (ovale chez *Fibrocapsa*) et ne comportant pas les mucocysts typiques de *Fibrocapsa* (Organites en forme de bâtonnet servant à capturer des proies par excrétion de filaments muqueux. Voir flèche noire ci-dessous)

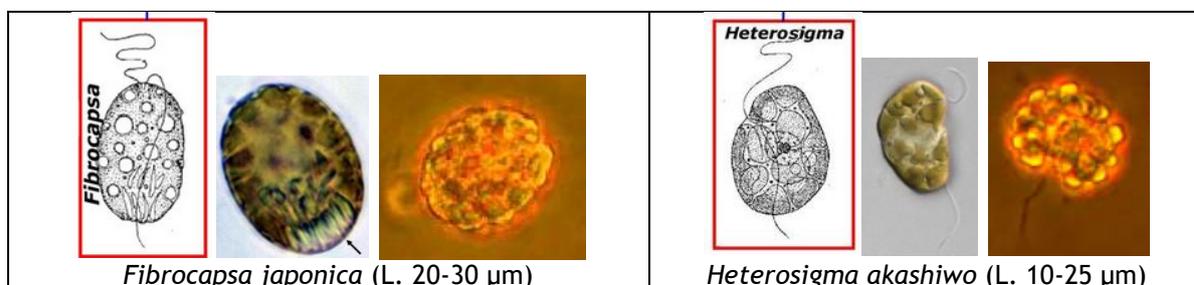


Figure 5 : Images comparatives de *F. japonica* et *H. akashiwo*
Schéma in Tomas C. (Editor) 1997 - Cellules vivantes ©J. Larsen - Cellules lugolées in guide E. Nézan et al

Prorocentrum micans Ehrenberg, 1834

19 analystes ont correctement identifié cette espèce. Un analyste a identifié *Prorocentrum lima*.

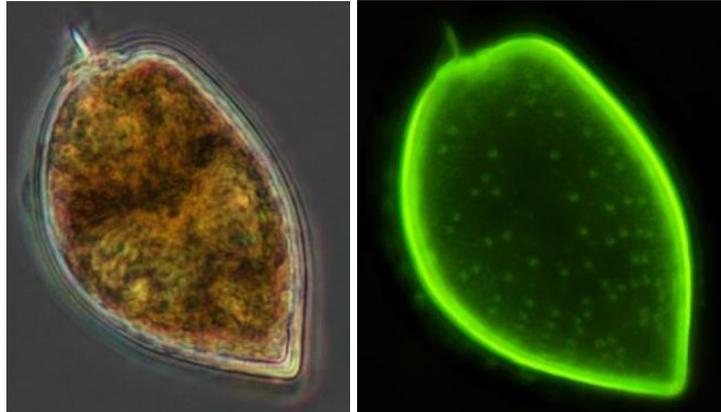


Photo 11 : *Prorocentrum micans* échantillon IPI 2019 -
photos : A. Le Jolivet (A : contraste de phase B : épifluorescence).
Taille des cellules Longueur : 32 μm , largeur : 20 μm

La disposition des pores visibles à l'épifluorescence permet l'identification de l'espèce *P. micans* telle que schématisé sur la Figure 6-A.

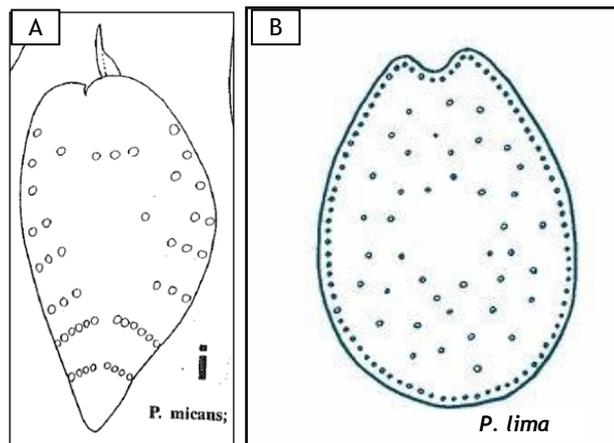


Figure 6 : Images extraites de l'ouvrage P. Lassus, fév. 1992 – Stage interne Ifremer phytoplancton

Chez *P. lima* la forme de la valve est ovale alors que celle de *P. micans* ressemble à une feuille d'arbre. Chez *P. lima*, les pores ne forment pas de ligne radiale et il y a un chapelet de pores en périphérie de la valve

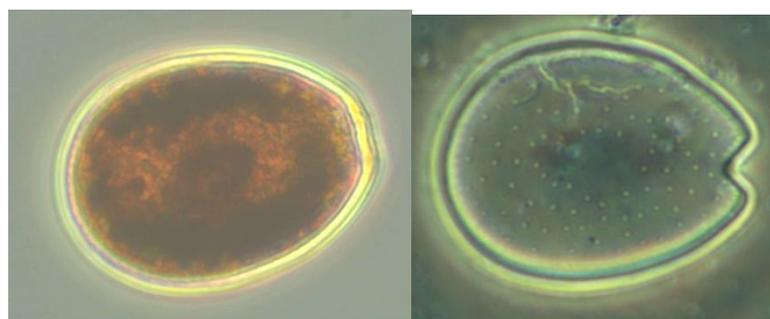
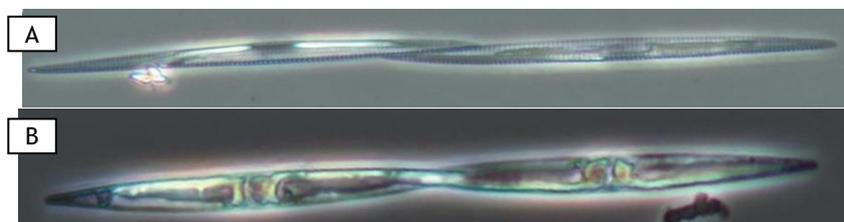


Photo 12 : *Prorocentrum lima* échantillon REPHY 2013 -
photo N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase).

Pseudo-nitzschia seriata complex (Cleve) H. Peragallo 1899

17 analystes ont correctement identifié le complexe *Pseudo-nitzschia seriata*. Ce complexe comprend les espèces : *P. seriata*, *P. pungens*, *P. australis*, *P. fraudulenta* et *P. multiseriis*. En conséquence toutes ces réponses sont considérées comme correctes au niveau de l'espèce ou du groupe d'espèces. En revanche la réponse *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex n'est considérée correcte qu'au niveau du genre car les largeurs valvaires des cellules de l'échantillon étaient toutes supérieures à 3 µm. Hors chez les espèces du complexe *P. delicatissima* cette largeur est toujours inférieure à 3 µm.



Photos 13 : *Pseudo-nitzschia seriata* complex échantillon IPI 2019 - A. Le Jolivet (microscope optique à contraste de phase)
Photo A : Chaîne de 2 cellules en vue circonférentielle, Photo B : Chaîne de 2 cellules en vue valvaire
Taille des cellules : Longueur : 60 µm, largeur : 6 µm.

Sur la photo A on peut distinguer les stries. Sur la photo B les valves sont asymétriques.

Les tableaux suivants résument les caractères morphologiques observables en microscopie optique et les valeurs pour quelques espèces.

Tableau 4 : caractéristiques morphologiques de quelques espèces du groupe *Pseudo-nitzschia* complexe *seriata*

<i>Pseudo-nitzschia</i> complexe <i>seriata</i>					
	<i>P. pungens</i>	<i>P. multiseriis</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

Tableau 5 : caractéristiques morphologiques de quelques espèces du groupe *Pseudo-nitzschia* complexe *delicatissima*

<i>Pseudo-nitzschia</i> complexe <i>delicatissima</i>		
	<i>P. pseudodelicatissima</i>	<i>P. delicatissima</i>
Longueur (µm)	54 - 87	19 - 76
Largeur valvaire (µm)	0,9 – 1,6	1,5 - 2
Forme valve	Valve étroite linéaire aux extrémités pointues	Valve étroite linéaire à lancéolée aux extrémités arrondies
Visibilité des stries	Structures de surface non visibles en microscopie optique	



Photos 14 : Image from plankton.mio.osupytheas website (<http://plankton.mio.osupytheas.fr>)

Thalassiosira sp. P.T. Cleve, 1873 emend. Hasle, 1973 - Plus précisément l'espèce était *T. tenera* Proschkina-Lavrenko, 1961

L'espèce *Thalassiosira tenera* n'était pas proposée par l'organisateur dans la liste des réponses possibles. Il nous confirme toutefois qu'il s'agissait de cette espèce. 17 analystes ont répondu *Thalassiosira* sp. ne trouvant pas l'espèce correspondante dans les réponses proposées. Il est donc difficile d'évaluer si les réponses sont correctes au niveau de l'espèce. Pour 2 analystes les espèces identifiées sont respectivement *T. eccentrica* et *T. oceanica*. Ces deux propositions sont jugées incorrectes au niveau de l'espèce car, l'organisateur de l'IPI, conscient de l'impossibilité d'identifier l'espèce sans image électronique, a joint dans le guide de l'exercice 2019 une documentation complémentaire pour cette espèce comprenant des images de microscopie électronique (voir figure ci-dessous). Un analyste a identifié le genre *Actinocyclus*.

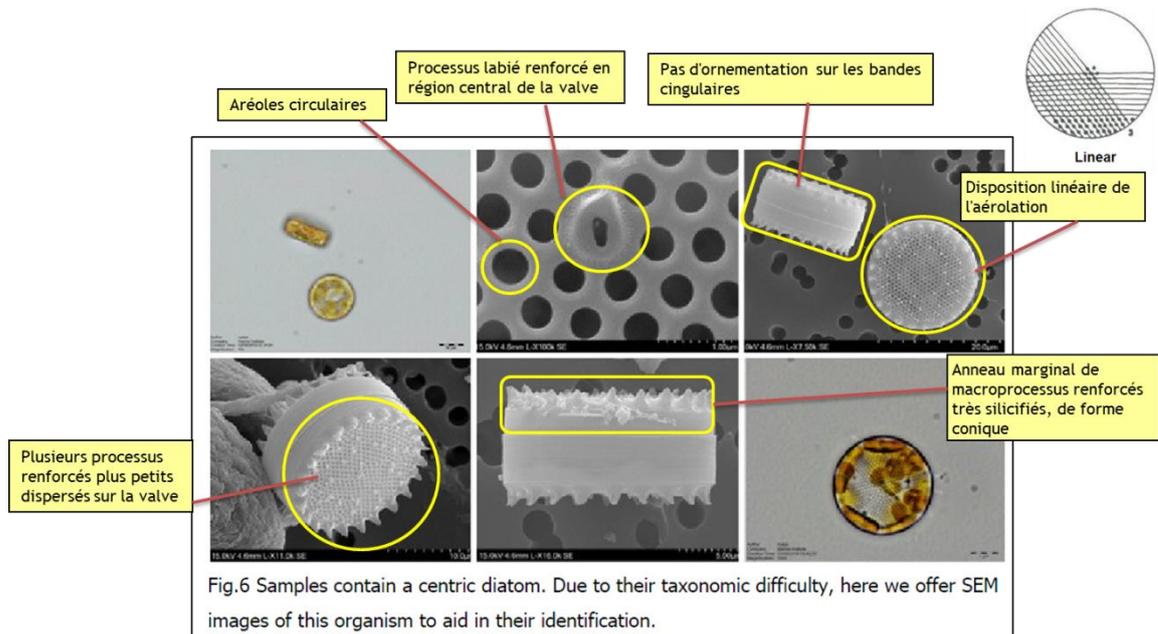
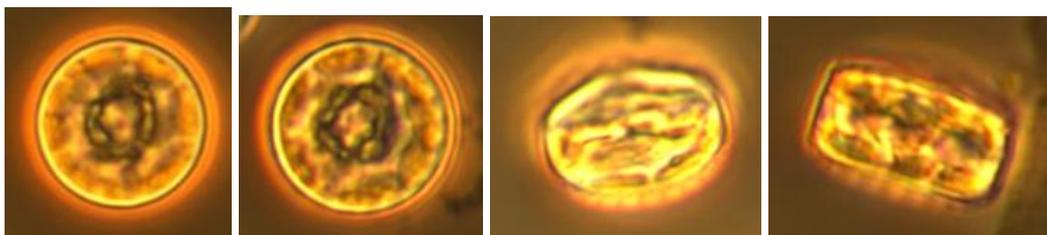


Figure 7 : Image extraite du guide de dénombrement du phytoplancton dans le cadre de l'IPI 2019 (cf. ANNEXE II). Annotations sur les caractéristiques morphologiques visibles

Il est à noter qu'il existe une variabilité des tailles des cellules de *T. tenera* (6 à 30 µm de diamètre selon⁵). *T. eccentrica* et *T. oceanica* peuvent également présenter des tailles variables avec des cellules d'un diamètre de 12 µm pour les plus petites. En conséquence la taille des cellules des échantillons ne pouvait pas être un critère pour l'identification de l'espèce.



Photos 15 : *Thalassiosira* sp. échantillon IPI 2019 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase) Diamètre cellule: 12 µm

⁵ Mona Hoppenrath, Bank Beszteri, Gerhard Drebes, Hannelore Halliger, Justus E. E. Van Beusekom, Silvia Janisch & Karen H. Wiltshire (2007) *Thalassiosira* species (Bacillariophyceae, Thalassiosirales) in the North Sea at Helgoland (German Bight) and Sylt (North Frisian Wadden Sea) - a first approach to assessing diversity, *European Journal of Phycology*, 42:3, 271-288. To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09670260701352288>

Ci-dessous des illustrations pour les réponses erronées.

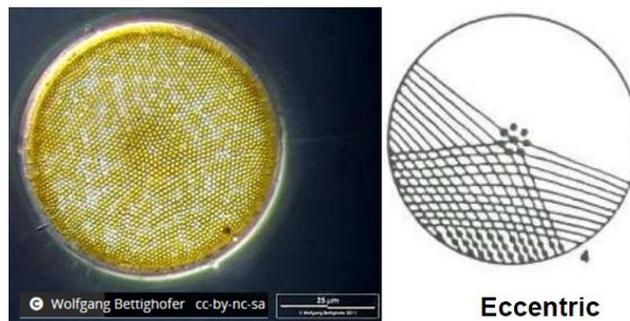


Figure 8 : *T. eccentrica*

T. eccentrica présente deux anneaux marginaux de processus renforcés bordés d'une couronne d'épines. Le diamètre de la cellule est de l'ordre de 50 μm . La disposition des aréoles est de type excentrique (formant des courbes).

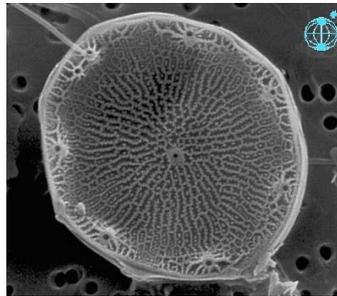


Figure 1 : *T. oceanica*, photo Mona Hoppenrath
<http://hdl.handle.net/10013/de.awi.planktonnet.image.13796>

T. oceanica est une espèce nanoplanctonique (Diamètre 3 à 12 μm). Des stries radiales et ramifiées sont visibles sur la face de la valve, qui peut également avoir des épines.

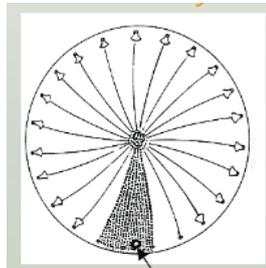


Figure 1 : Genre *Actinocyclus* in Carmelo R. Tomas

Le genre *Actinocyclus* présente, un anneau marginal de processus labiés, pas de processus renforcé central, une organisation radiale des aréoles et, surtout, un pseudonodule marginal dans une zone dégagée (flèche noire).

Chaetoceros diadema et *Licmophora* sp.

Deux analystes du même laboratoire ont observé *Chaetoceros diadema* et l'un d'entre eux des *Licmophora* sp.

Licmophora étant absente des échantillons fournis pour l'exercice, le laboratoire A doit envisager qu'il y ait eu une contamination locale au moment de la préparation des cuves (soit les cuves elles-mêmes, soit le matériel de transfert des échantillons).

Dans les échantillons on pouvait trouver quelques rares cellules de *Chaetoceros* n'appartenant pas à l'espèce *C. danicus* et de plus grande taille que les cellules de *C. curvisetus*. Il se pourrait qu'ils s'agissent de cellules de *C. curvisetus* en cours de sporulation.

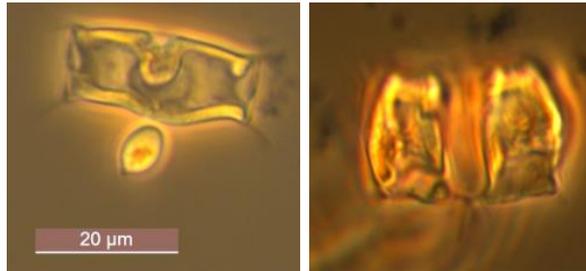


Photo 16 : Cellules de *Chaetoceros curvisetus* en cours de sporulation ? échantillon IPI 2019 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)
Taille des cellules Longueur 47 µm, largeur 33 µm

Selon Ishii et al.⁶, les valves des spores de *C. curvisetus* sont lisses (pas d'épine, de bouton ...), et sont voutées avec les bords surélevés. Ce qui semble correspondre aux cellules rencontrées.

⁶ Ishii, Ken-Ichiro & Iwataki, Mitsunori & Matsuoka, Kazumi & Imai, Ichiro. (2011). Proposal of identification criteria for resting spores of *Chaetoceros* species (Bacillariophyceae) from a temperate coastal sea. *Phycologia*. 50. 351-362. 10.2216/10-36.1.

3.3 RESULTATS DES TESTS D'HOMOGENEITE ET DE STABILITE

Les résultats des tests d'homogénéité et de stabilité sont résumés dans le Tableau 6. Leur implication sur les résultats de « l'essai Ifremer » est également exposée.

Tableau 6 : résultats des tests d'homogénéité et de stabilité selon la norme ISO 13528 :2015

Taxon	F-test	Critère d'homogénéité	Critère étendu d'homogénéité	Critère de stabilité	Critère étendu de stabilité
<i>Akashiwo sanguinea</i>	Not ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Azadinium spinosum</i>	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Chaetoceros danicus</i>	Ok	Not ok	Ok	Not ok	Ok
<i>Corethron hystrix</i>	Ok	Ok	Ok	Not ok	Not ok
<i>Gonyaulax spinifera</i>	Not ok	Not ok	Not ok	Ok	Ok
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Prorocentrum micans</i>	Ok	Not ok	Ok	Not ok	Ok
<i>Pseudo-nitzschia seriata complex</i>	Not ok	Not ok	Not ok	Ok	Ok
<i>Thalassiosira sp.</i>	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok

HOMOGENEITE DES ÉCHANTILLONS

L'analyse de variance (F-test) ne met en évidence aucune différence significative entre les échantillons pour les sept taxons *Azadinium spinosum*, *Chaetoceros curvisetus*, *Chaetoceros danicus*, *Corethron hystrix*, *Heterosigma akashiwo*, *Prorocentrum micans* et *Thalassiosira sp.*. Pour *Azadinium spinosum*, *Chaetoceros curvisetus*, *Corethron hystrix*, *Heterosigma akashiwo* et *Thalassiosira sp.*, la variance inter-échantillons ne contribue pas à plus de 10 % de la variance pour l'évaluation des performances (critère d'homogénéité rempli). Pour ces cinq taxons, les échantillons sont donc considérés comme **homogènes**. Par contre, pour *Chaetoceros danicus* et *Prorocentrum micans*, la variance inter-échantillons contribue à plus de 10 % de la variance pour l'évaluation des performances (critère d'homogénéité non rempli) mais le critère étendu est rempli. D'après la norme NF EN ISO/CEI 17043 citée par Salas et Larsen, il faut s'assurer que l'incertitude des valeurs assignées ou que l'évaluation des résultats prend en compte le fait que les critères d'homogénéité ne sont pas entièrement remplis. Dans le présent exercice, l'incertitude de la valeur assignée est négligeable pour l'ensemble des taxons (Tableau 7).

Pour les taxons *Chaetoceros danicus* et *Prorocentrum micans*, compte tenu du fait que deux critères au moins sont remplis et que l'incertitude de la valeur assignée est négligeable, il est considéré que la valeur assignée est suffisamment bien estimée à partir des résultats des participants.

Tableau 7 : Valeurs pour chaque taxon de la valeur assignée X_s , de l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude $\hat{\sigma}_s$, du nombre de participants (p) pris en compte pour le calcul des valeurs X_s et $\hat{\sigma}_s$, ainsi que de l'incertitude de la valeur assignée $u(X_s)$.

	<i>A. sanguinea</i>	<i>A. spinosum</i>	<i>C. curvisetus</i>	<i>C. danicus</i>	<i>C. hystrix</i>	<i>G. spinifera</i>	<i>H. akashiwo</i>	<i>P. micans</i>	<i>P.-n. seriata complex</i>	<i>T. sp.</i>
X_s (\log_{10})	1.723	4.008	3.867	4.229	3.334	3.770	4.100	3.451	4.739	4.104
$\hat{\sigma}_s$ (\log_{10})	0.693	0.210	0.256	0.078	0.063	0.093	0.180	0.086	0.111	0.086
p	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
$u(X_s)$	0.199	0.060	0.073	0.022	0.018	0.027	0.052	0.025	0.032	0.025
Impact de l'incertitude de la valeur assignée	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.	Néglig.

L'analyse de variance (F-test) met en évidence une différence significative entre les échantillons pour le taxon *Akashiwo sanguinea*. Cependant, la variance inter-échantillons ne contribue pas à plus de 10 % de la variance pour l'évaluation des performances (critère d'homogénéité rempli). Les échantillons sont donc considérés comme **suffisamment homogènes** pour ce taxon.

L'analyse de variance (F-test) met également en évidence une différence significative entre les échantillons pour les taxons *Gonyaulax spinifera* et *Pseudo-nitzschia seriata complex*. De plus, la variance inter-échantillons contribue à plus de 10 % de la variance pour l'évaluation des performances (critère d'homogénéité non rempli). Les échantillons ne sont donc pas considérés comme suffisamment homogènes pour ces deux taxons. **Il a donc été décidé de remplacer $\hat{\sigma}_s$ par $\hat{\sigma}'_s$** (cf. section 2.3) **dans le calcul des scores z pour ces deux taxons** (cf. équation de la section 2.2).

STABILITE DANS LE TEMPS

Les deux critères des tests de stabilité (voir Tableau 6) sont remplis pour les taxons *A. sanguinea*, *A. spinosum*, *C. curvisetus*, *G. spinifera*, *H. akashiwo*, *P.-n. seriata complex* et *Thalassiosira sp.*. Les échantillons sont donc considérés comme stables pour ces sept taxons.

Pour *C. danicus* et *P. micans*, seul le critère étendu est rempli. Pour ces deux taxons, les échantillons sont considérés comme suffisamment homogènes. Il faudra toutefois tenir compte de ces résultats lors de l'évaluation des participants.

Les échantillons considérés comme stables le sont uniquement jusqu'à ouverture des ampoules avant préparation des cuves à décanter. Pour envisager un problème dû à une dégradation des cellules, il faut tenir compte des délais entre la préparation des cuves à décanter et l'analyse (délai décant/anal du Tableau 1).

Enfin, pour *C. hystrix*, aucun des critères de stabilité n'est rempli. Les échantillons sont donc considérés comme non stables pour ce taxon.

BIAIS

Il existe un possible biais pour les taxons *A. sanguinea*, *A. spinosum*, *C. danicus*, *H. akashiwo*, *P. micans* et *P.-n. seriata complex*, car l'écart entre la moyenne obtenue lors des tests d'homogénéité et la valeur assignée obtenue à partir des résultats des participants est supérieur à deux fois l'incertitude type de cet écart (Tableau 8). Cependant, aucun élément connu ne permet de trancher entre un biais de la méthode de mesure de X_{ref} et un biais commun dans les résultats des participants.

Tableau 8 : Pour chaque espèce, valeur de la différence entre la moyenne obtenue lors des tests d'homogénéité et la valeur assignée $|X_{ref} - X_s|$, incertitude type de la différence $u(X_{ref} - X_s)$ et résultat de la comparaison entre la différence et deux fois son incertitude type.

	A. <i>sanguinea</i>	A. <i>spinosum</i>	C. <i>curvisetus</i>	C. <i>danicus</i>	C. <i>hystrix</i>	G. <i>spinifera</i>	H. <i>akashiwo</i>	P. <i>micans</i>	P.-n. <i>seriata complex</i>	T. sp.
$ X_{ref} - X_s $	0.934	0.163	0.004	0.103	0.009	0.053	0.438	0.235	0.524	0.026
$u(X_{ref} - X_s)$	0.203	0.063	0.076	0.027	0.023	0.034	0.055	0.029	0.038	0.026
$\frac{ X_{ref} - X_s }{2 \times u(X_{ref} - X_s)} >$	OUI	OUI	NON	OUI	NON	NON	OUI	OUI	OUI	NON

3.4 RESULTATS QUANTITATIFS DES PARTICIPANTS ET DISCUSSION

Tous les scores z, 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 V.

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 avec la moyenne de référence matérialisée par une ligne bleue pointillée. 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. Sur l'ensemble des figures, les codes des analystes ont été regroupés par laboratoire.

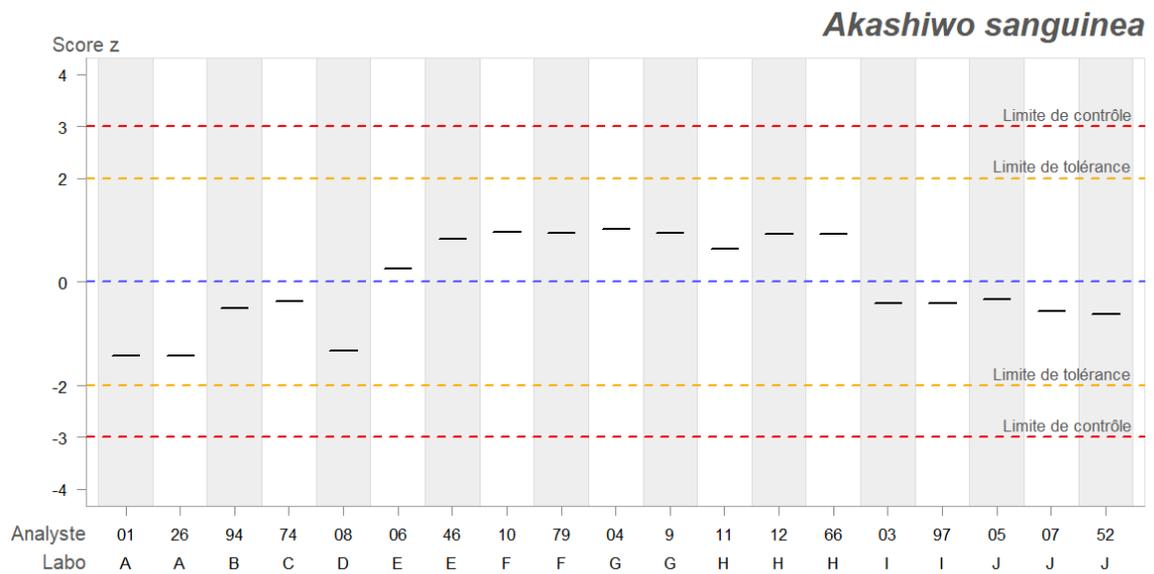


Figure 9 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Akashiwo sanguinea*.

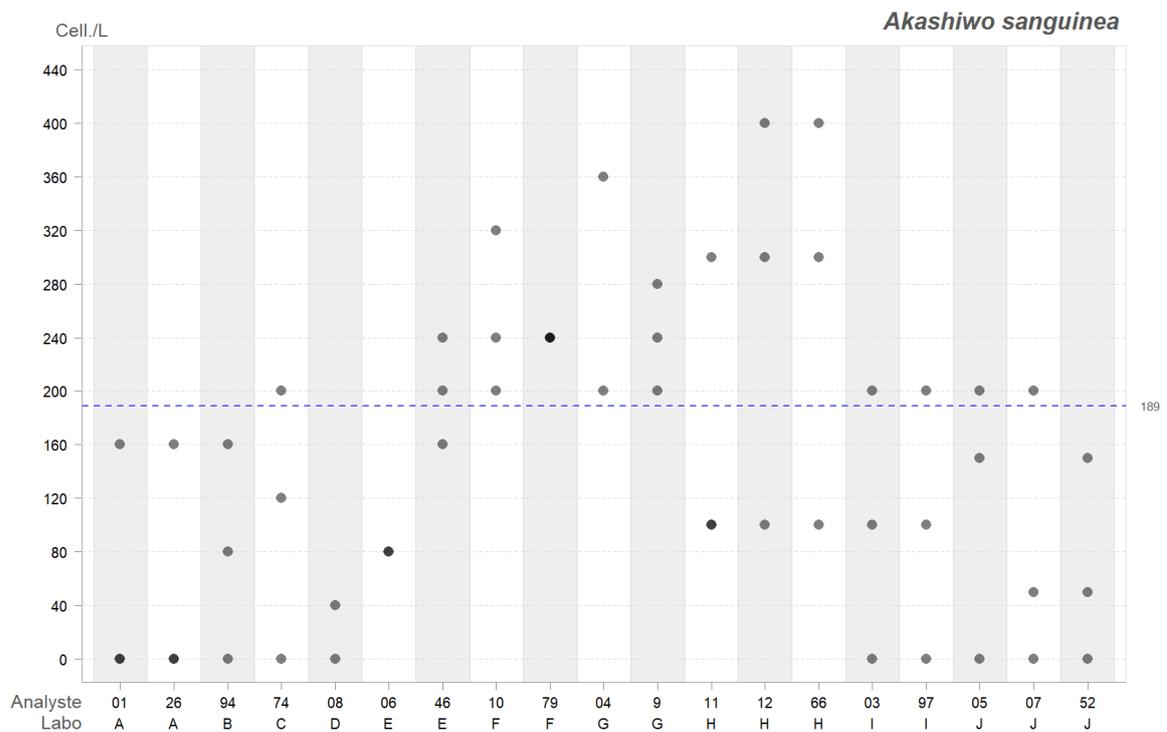


Figure 10 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Akashiwo sanguinea*.

Les tests réalisés ont permis de conclure à une homogénéité suffisante et à une bonne stabilité des échantillons pour ce taxon.

Pour tous les analystes, les scores z sont compris entre les limites de tolérance n'impliquant aucun signal d'avertissement.

On remarque que pour les laboratoires A, B et D, les résultats de chaque réplica sont inférieurs à la moyenne de référence. Contrairement aux résultats des laboratoires F et G qui sont tous supérieurs à la moyenne de référence. Ce taxon étant présent en faible quantité dans les échantillons (moyenne de référence de 189 cell. /L), de nombreux comptages sont inférieurs à la limite de quantification.

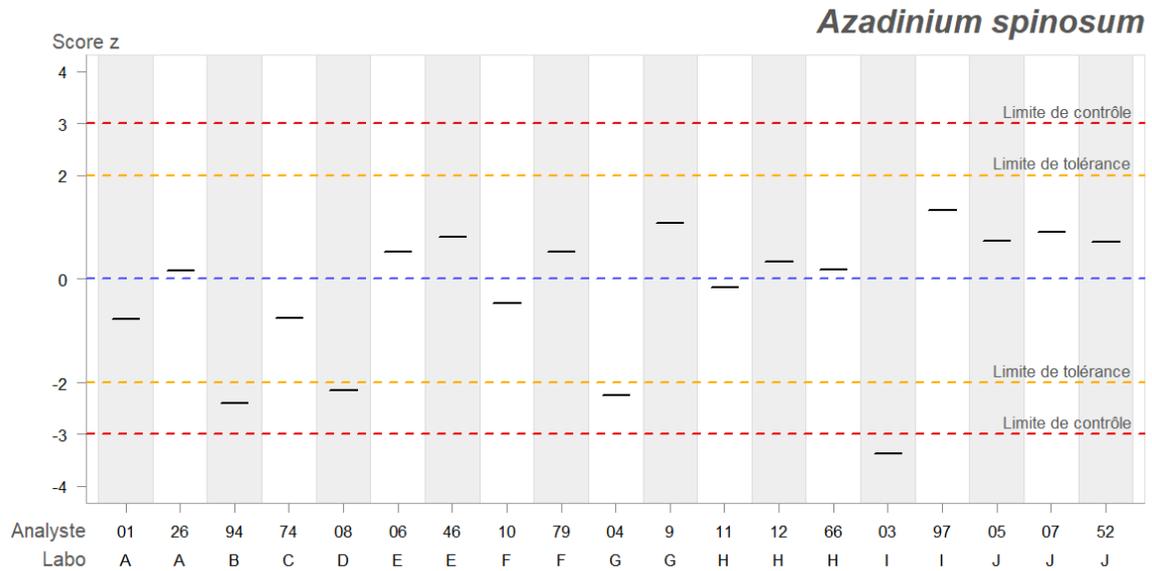


Figure 11 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Azadinium spinosum*.

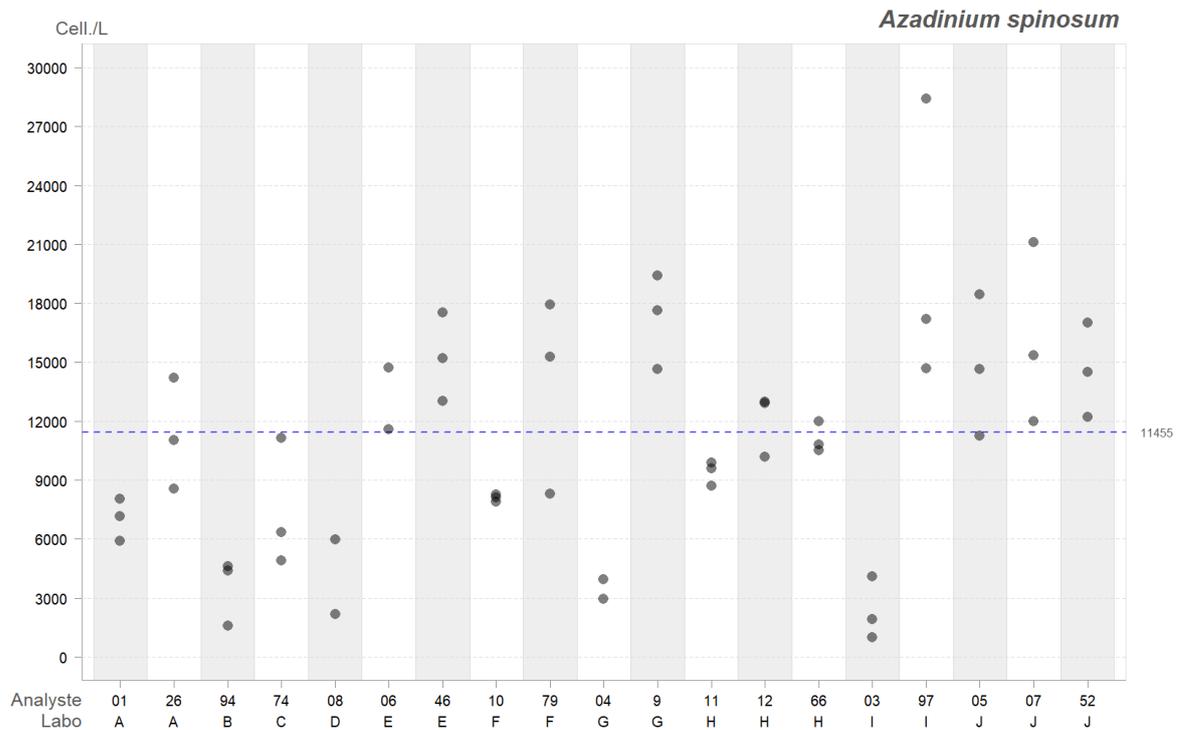


Figure 12 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Azadinium spinosum*.

Pour ce taxon, les tests réalisés ont montré une bonne homogénéité et une bonne stabilité des échantillons. Les comptages réalisés dans le cadre de l'EIA s'étendent entre un minimum de 1 000 et un maximum de 28 400 cell. /L., avec une moyenne de référence de 11 455 cell. /L.

Les scores z des analystes B-94, D-08 et G-04 sont inférieurs à la limite de tolérance, avec des valeurs respectives de -2.40, -2.15 et -2.25, ce qui implique un signal d'avertissement pour ces analystes. Un signal d'action apparaît pour l'analyste I-03 avec un score z de -3.40. L'ensemble de ces analystes présente des comptages faibles par rapport aux autres analystes. Il est conseillé aux analystes concernés de rechercher les causes possibles.

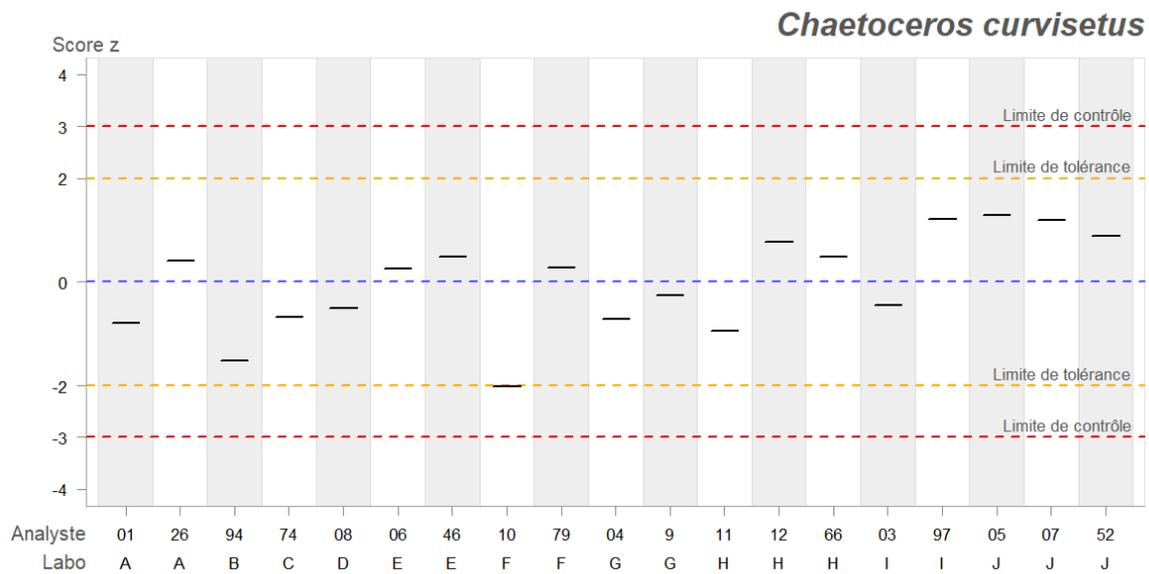


Figure 13 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Chaetoceros curvisetus*.

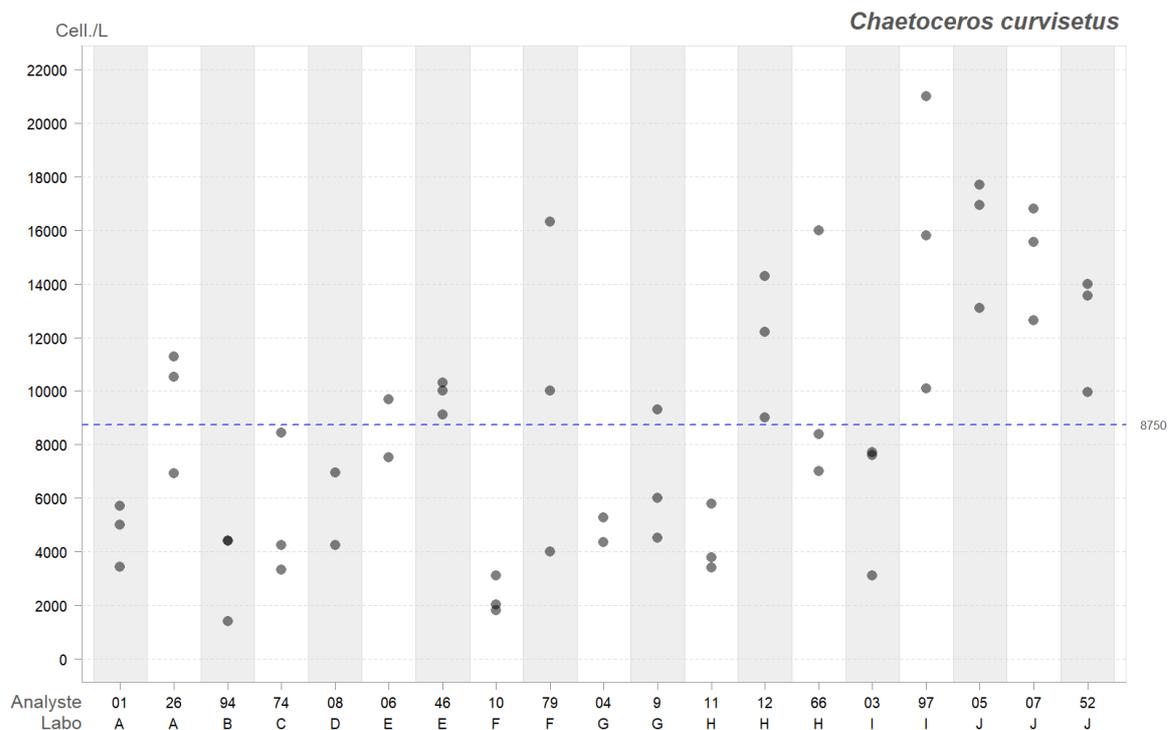


Figure 14 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Chaetoceros curvisetus*.

Pour ce taxon aussi, les tests réalisés ont montré une bonne homogénéité et une bonne stabilité des échantillons. Les comptages réalisés par les analystes Ifremer s'étendent de 1 400 à 21 000 cell. /L., avec une moyenne de référence de 8 750 cell. /L.

Seul le score z de l'analyste F-10 est très légèrement au-delà des limites de tolérance, avec une valeur de - 2.01. Les valeurs de comptage pour ce participant sont faibles par rapport à la moyenne de référence mais reste similaires aux valeurs obtenues par d'autres participants.

Les valeurs obtenues sont globalement faibles pour les laboratoires B, C et D, contrairement aux résultats du laboratoire J qui sont tous supérieurs à la moyenne de référence.

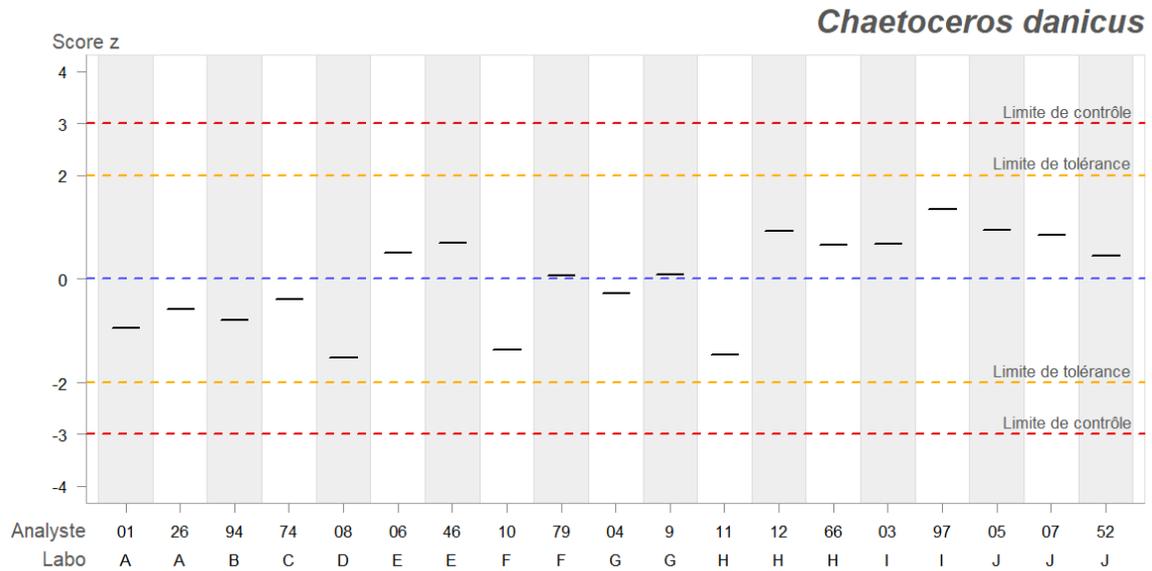


Figure 15 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Chaetoceros danicus*.

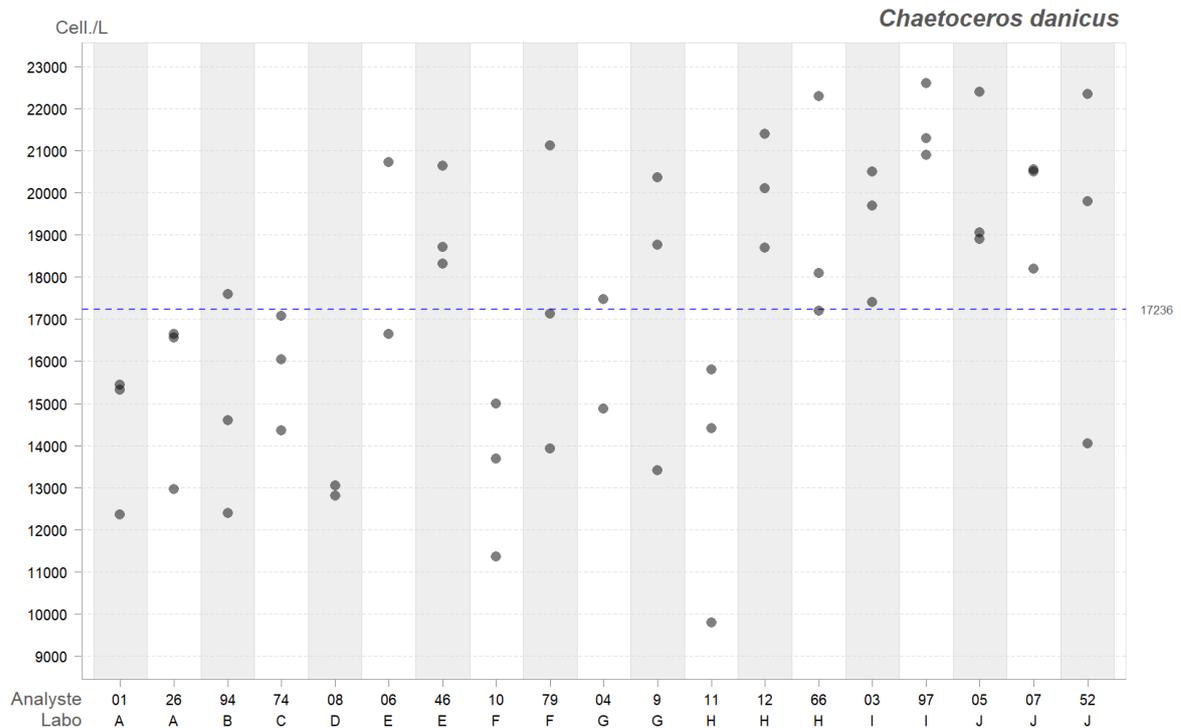


Figure 16 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Chaetoceros danicus*.

Pour ce taxon, les tests d'homogénéité ont montré que la variance inter-échantillons contribue à plus de 10 % de la variance pour l'évaluation des performances, mais que l'incertitude sur la valeur assignée était négligeable. De plus, seul le critère élargi est rempli pour l'étude de la stabilité.

Cependant, aucun score z n'est au-delà des limites de tolérance. Les comptages s'étendent de 9 800 à 22 600 cell. /L, avec une moyenne de référence de 17 236 cell. /L.

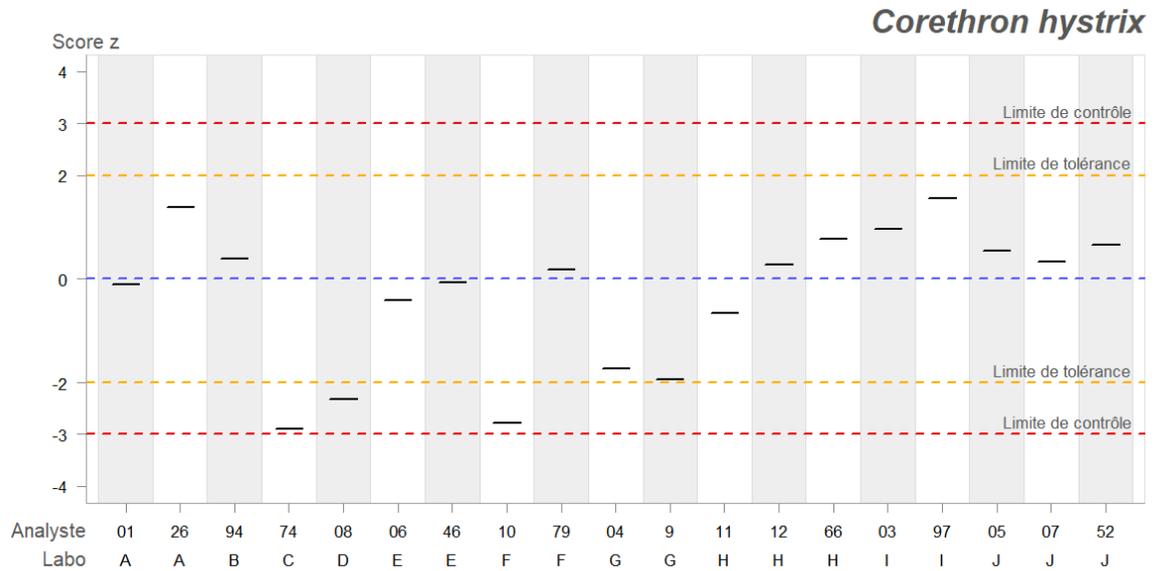


Figure 17 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Corethron hystrix*.

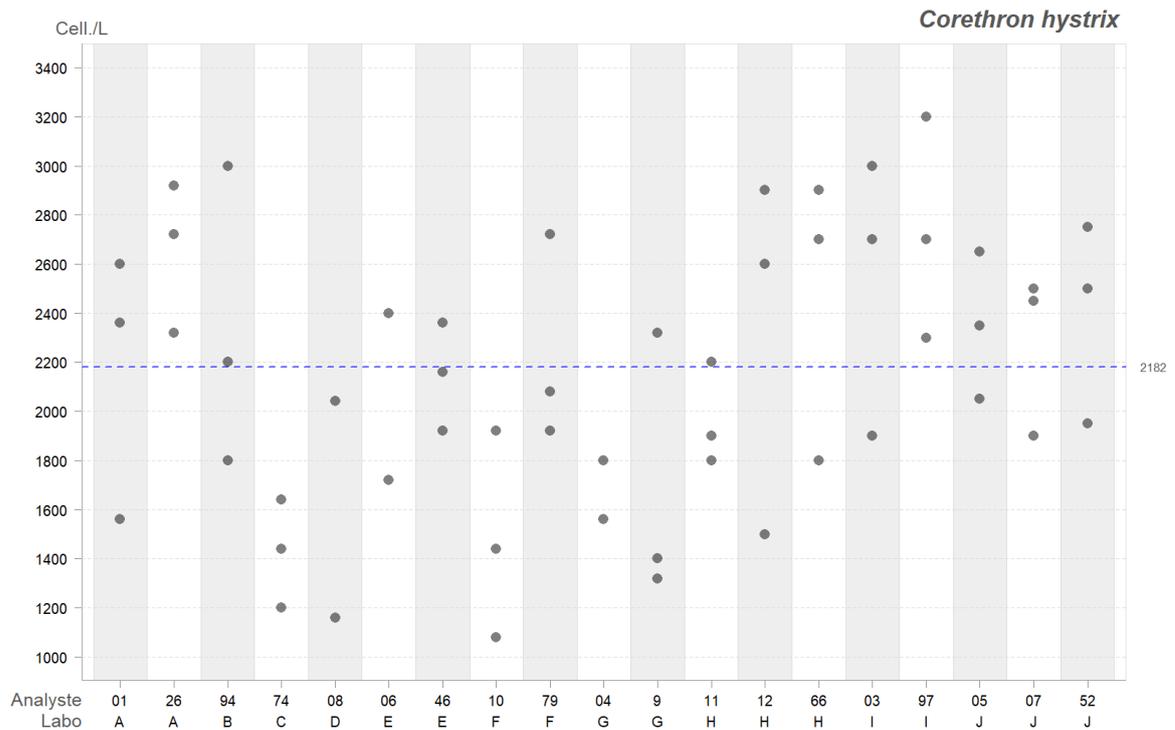


Figure 18 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Corethron hystrix*.

Pour ce taxon, les tests montrent une bonne homogénéité des échantillons mais un défaut de stabilité. Les comptages s'étendent de 1 080 à 32 000 cell. /L, avec une moyenne de référence de 2 182 cell. /L.

Les scores z des analystes C-74, D-08 et F-10 sont au-delà des limites de tolérance, avec des valeurs respectives de - 2.89, - 2.32 et - 2.77.

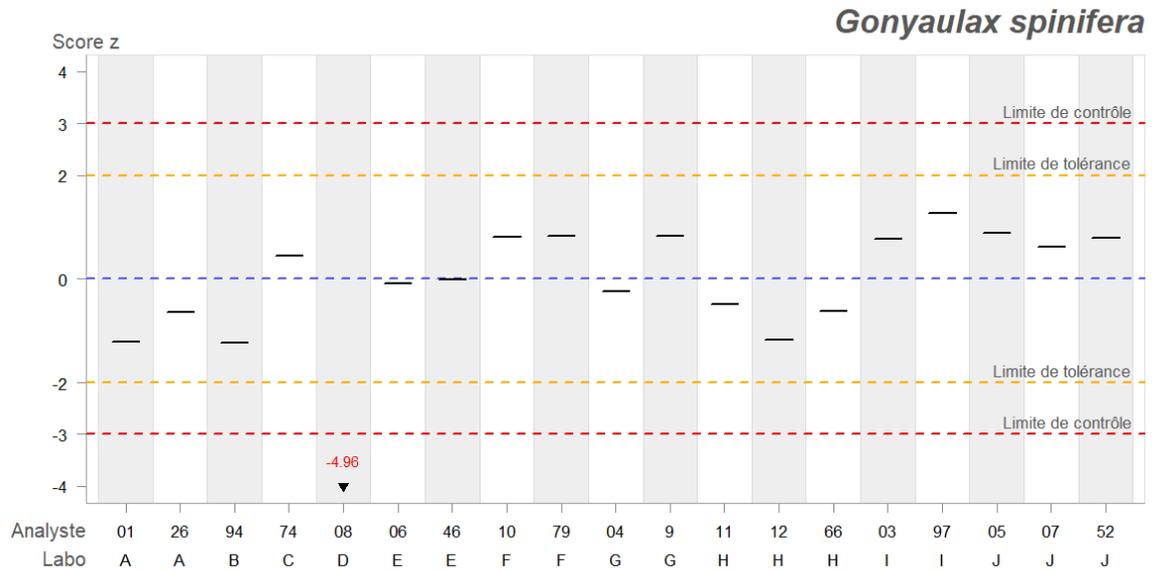


Figure 19 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Gonyaulax spinifera*.

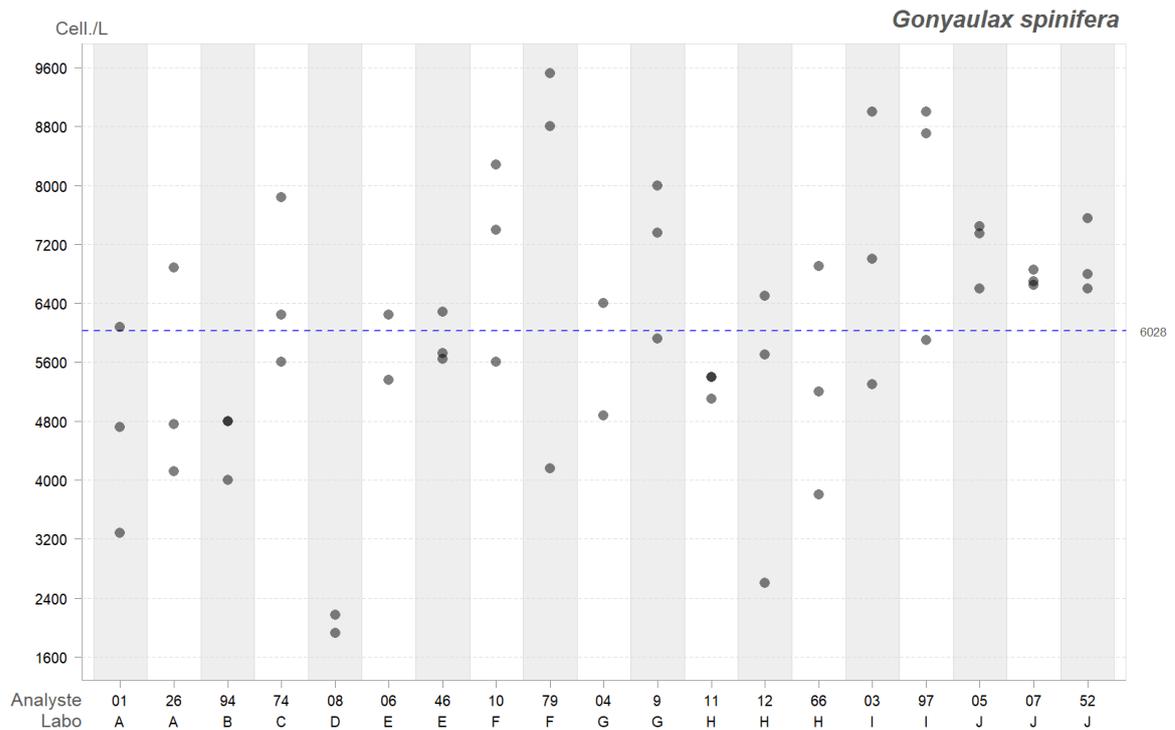


Figure 20 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour *Gonyaulax spinifera*.

Pour ce taxon, les tests montrent une bonne stabilité des échantillons mais un défaut d'homogénéité. L'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude a donc été remplacé par $\hat{\sigma}'_s$ (cf. section 2.3) pour le calcul des scores z.

Les comptages s'étendent de 1 920 à 9 520 cell. /L, avec une moyenne de référence de 6 028 cell. /L.

Un signal d'alerte fort est présent pour l'analyste D-08, avec une valeur de - 4.96. Ses comptages sont faibles par rapport à ceux des autres participants. Ce participant a toutefois signalé une forte dégradation des cellules et n'a pas dénombré les thèques vides.

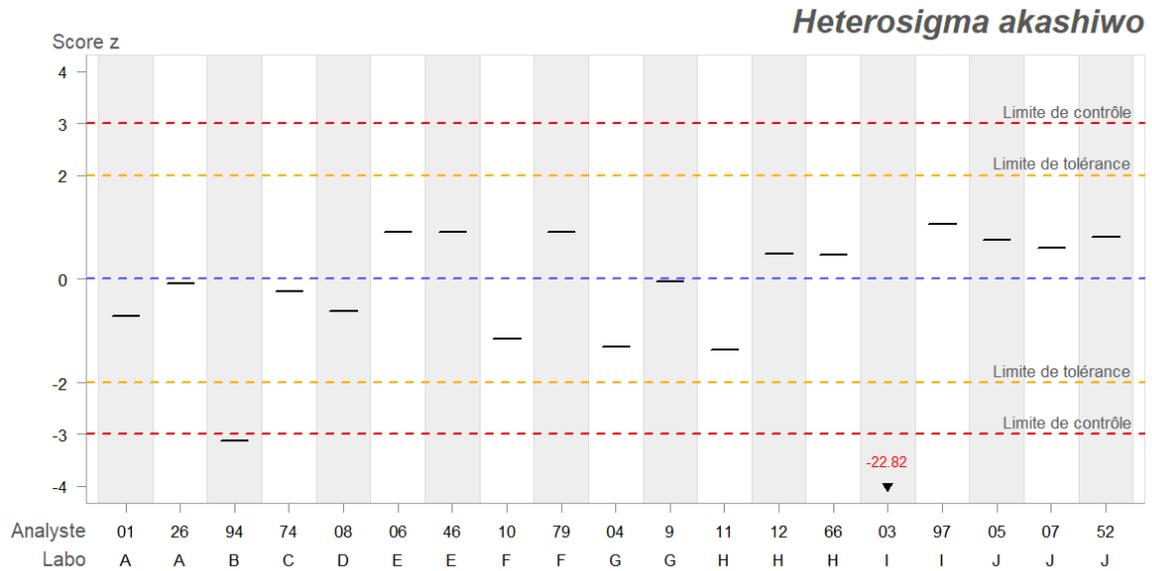


Figure 21 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Heterosigma akashiwo*.

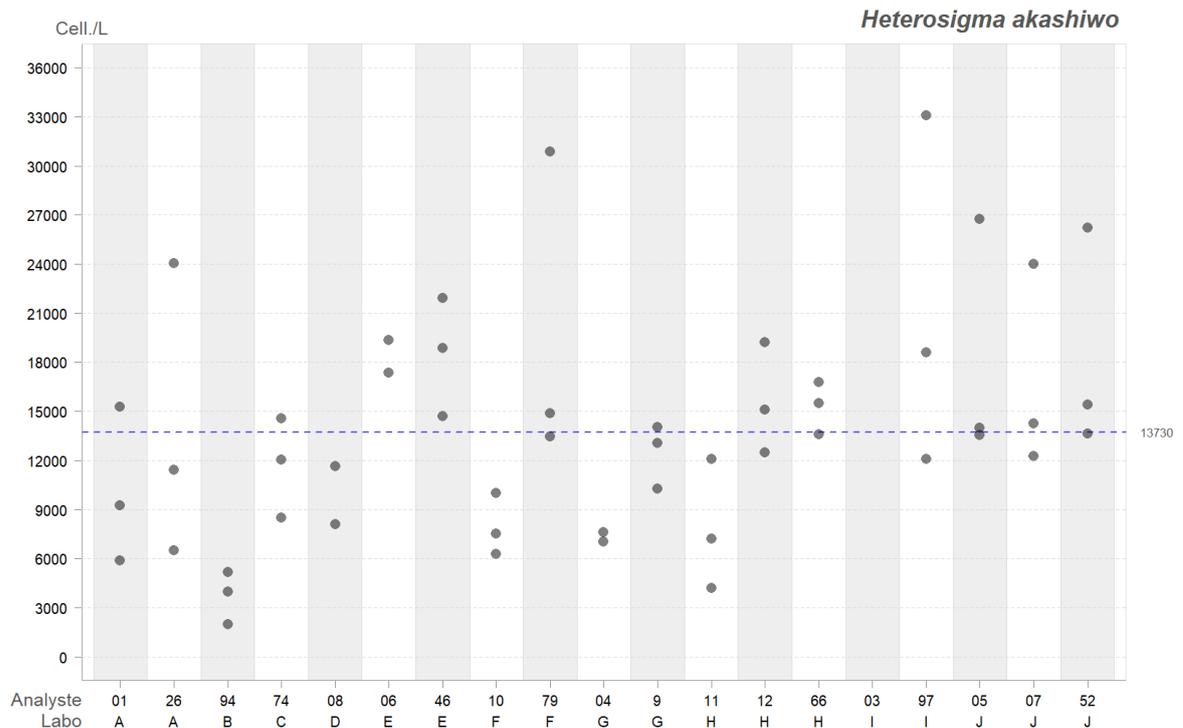


Figure 22 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Heterosigma akashiwo*.

Pour ce taxon, les tests montrent une bonne homogénéité et une bonne stabilité des échantillons. Les comptages s'étendent de 2 000 à 33 100 cell. /L, avec une moyenne de référence de 13 730 cell. /L.

Deux signaux d'alerte apparaissent pour les analystes B-94 et I-03, avec des valeurs de - 3.12 et - 22.82 respectivement. Le très fort signal pour l'analyste I-03 provient du fait que ce taxon n'a pas du tout été observé, alors qu'il est présent en quantité importante. Pour ce taxon encore, les comptages réalisés par l'analyste B-94 sont faibles.

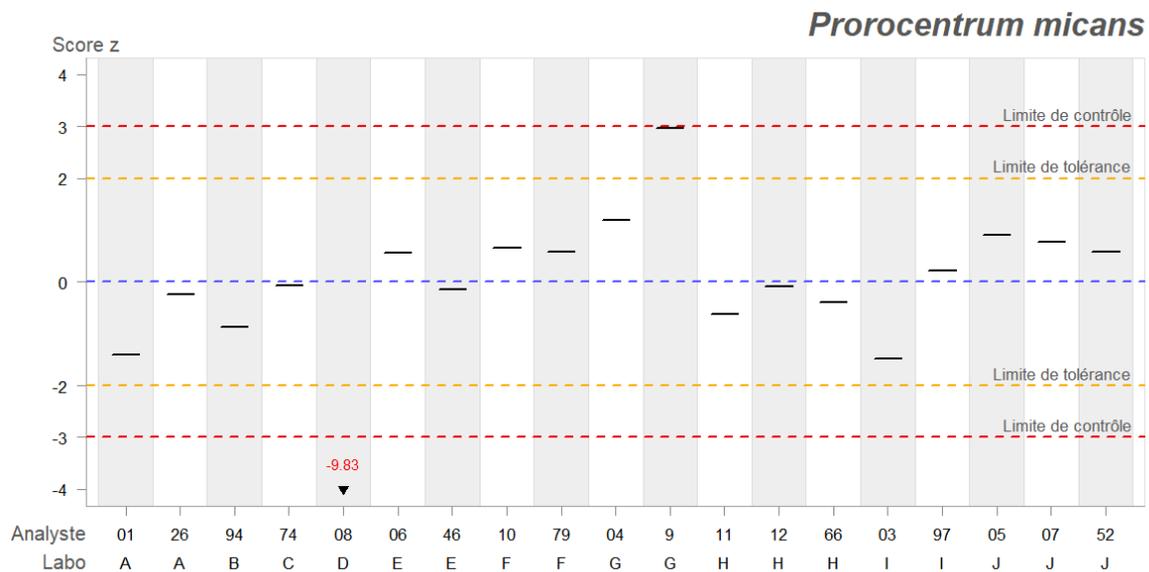


Figure 23 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Procoentrum micans*.

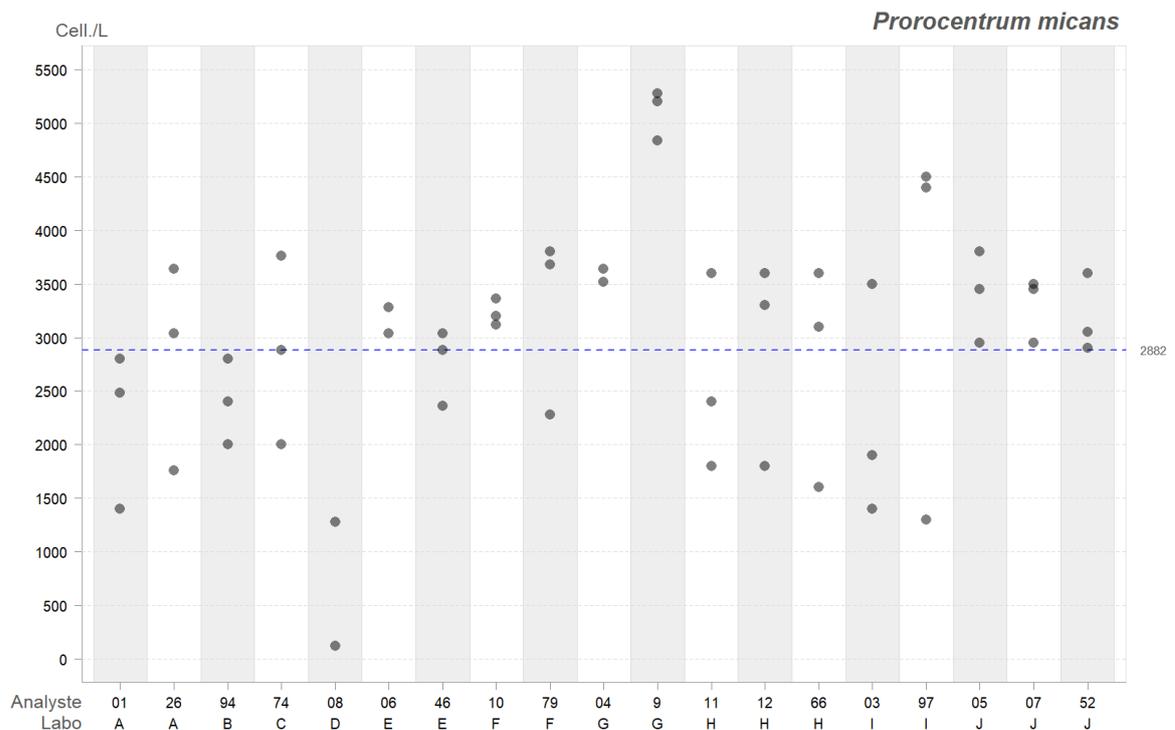


Figure 24 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Procoentrum micans*.

Pour ce taxon, les tests d'homogénéité ont montré que la variance inter-échantillons contribue à plus de 10 % de la variance pour l'évaluation des performances, mais que l'incertitude sur la valeur assignée était négligeable. De plus, seul le critère élargi est rempli pour l'étude de la stabilité.

Les comptages s'étendent de 125 à 5 280 cell. /L, avec une moyenne de référence de 2 882 cell. /L.

L'analyste G-09 présente un score z au-delà des limites de tolérance, avec une valeur de 2.97, du fait de valeurs fortes de comptage sur ses trois réplicas. A l'opposé, un nouveau signal d'alerte fort apparaît pour l'analyste D-08, dû à des valeurs très faibles, dont la valeur minimale comptée pour ce taxon (125 cell. /L). Comme pour les cellules de *G. spinifera*, l'analyste D-08 a signalé la présence de nombreuses thèques vides non dénombrées.

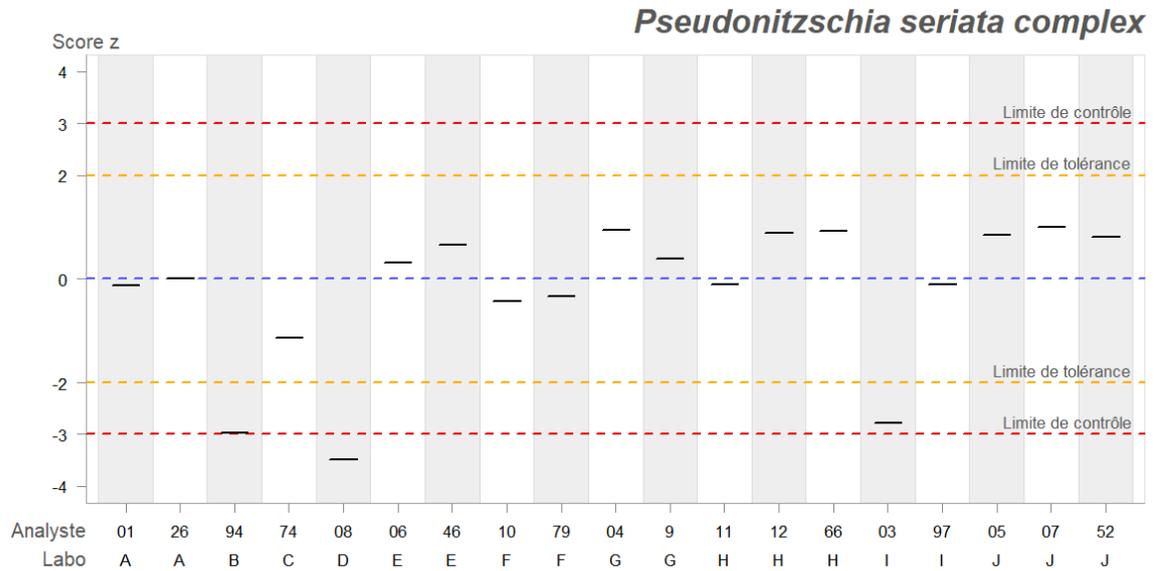


Figure 25 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Pseudo-nitzschia seriata complex*.

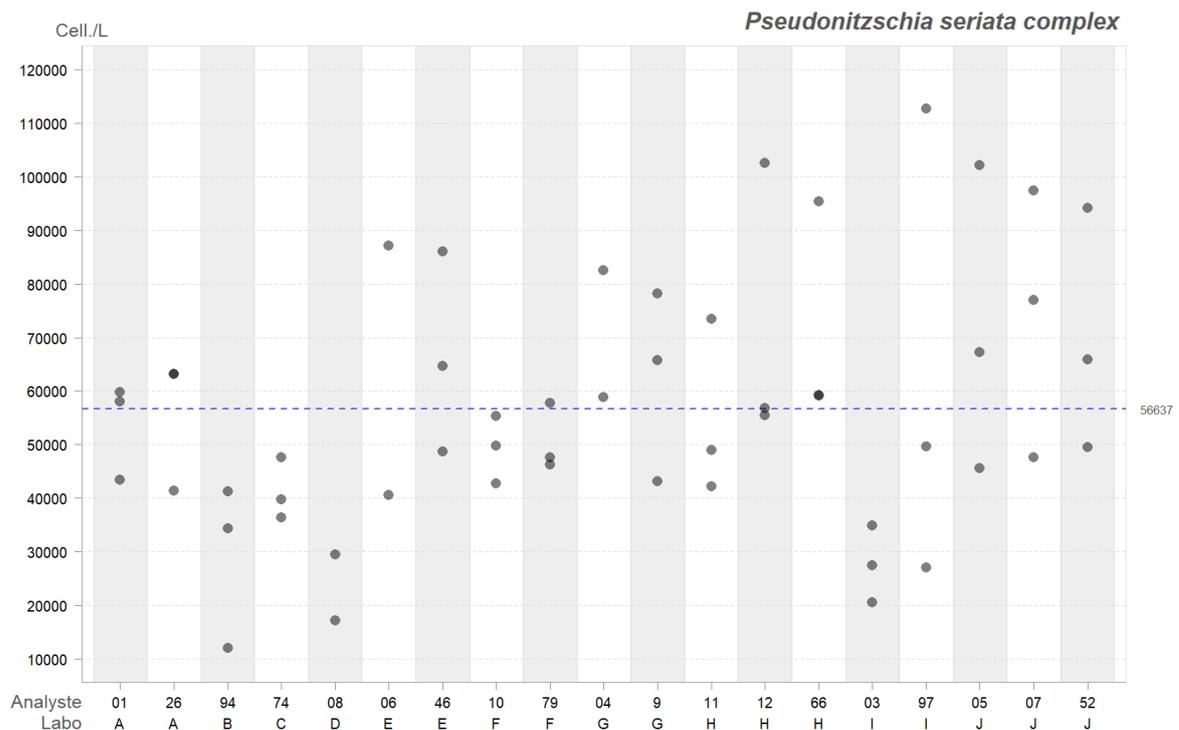


Figure 26 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Pseudo-nitzschia seriata complex*.

Pour ce taxon, les tests montrent une bonne stabilité des échantillons mais un défaut d'homogénéité. L'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude a donc été remplacé par $\hat{\sigma}'_s$ (cf. section 2.3) pour le calcul des scores z.

Les comptages s'étendent de 12 000 à 112 700 cell. /L, avec une moyenne de référence de 56 637 cell. /L.

Pour les analystes B-94 et I-03, le score z est situé en dessous de la limite basse de tolérance, impliquant un signal d'avertissement, avec des valeurs de - 2.97 et - 2.78 respectivement. Un signal d'action apparaît pour l'analyste D-08, avec un score z de - 3.49.

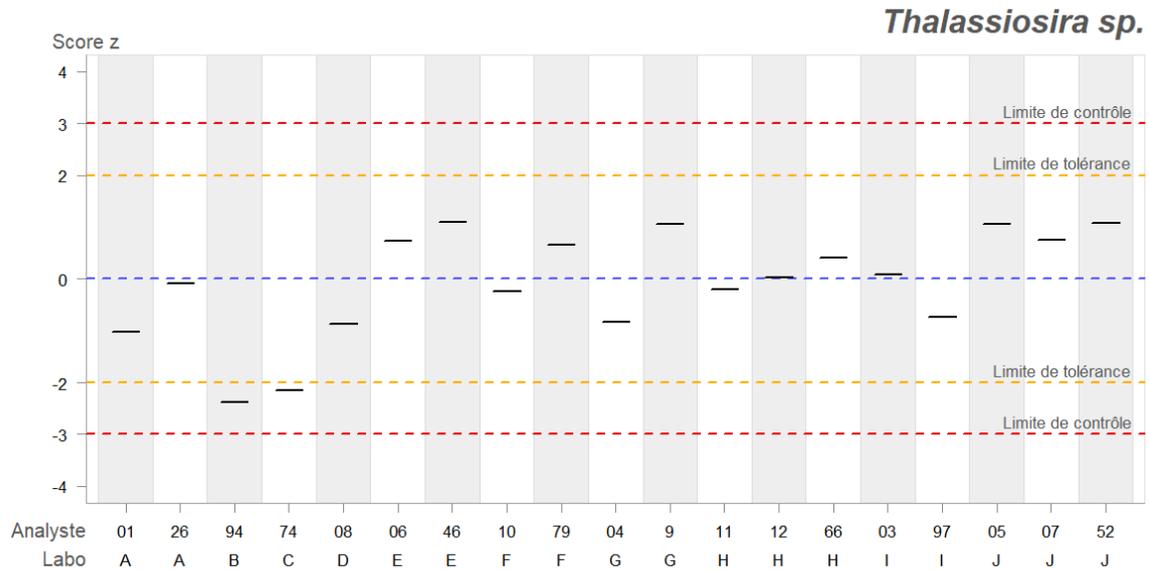


Figure 27 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des \log_{10} des résultats pour *Thalassiosira sp.*

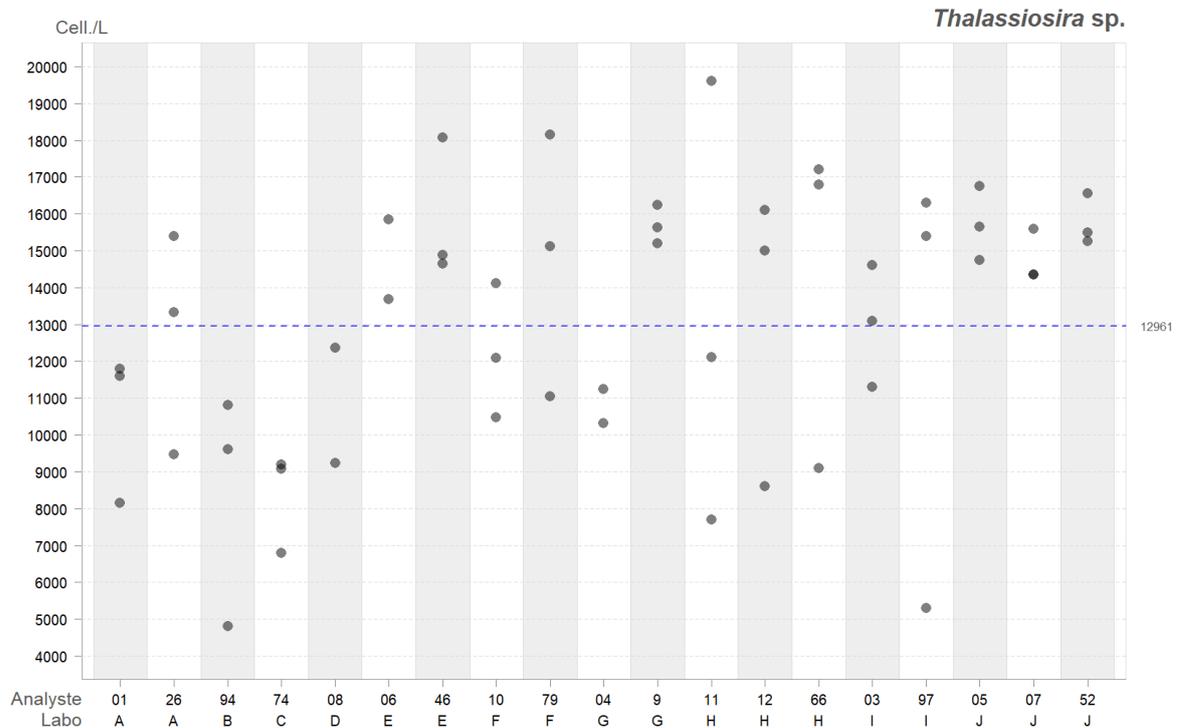


Figure 28 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Thalassiosira sp.*

Pour ce taxon, les échantillons sont homogènes et stables. La répartition des résultats d'abondances s'étend de 4 800 à 19 600 cell. /L, avec une moyenne de référence de 12 961 cell. /L.

Les scores z des analystes B-94 et C-74 sont situés au-delà des limites de tolérance, engendrant un signal d'avertissement, dû à de faibles valeurs de comptages.

On remarque que pour les laboratoires J et E, les résultats de chaque réplica sont supérieurs à la moyenne de référence.

4. DISCUSSION GENERALE SUR LES RESULTATS

La proposition d'une liste fermée d'espèces pour le rendu des résultats n'est pas sans incidence sur la façon d'analyser les réponses et sa pertinence est discutable. Pour l'organisateur, l'utilisation de ce format de rendu permet une meilleure lisibilité des résultats des participants. Elle évite les erreurs de transcription et s'affranchit d'interprétation puisqu'elle interdit des identifications à des rangs taxinomiques non prévus, comme « dinoflagellé non identifié », « diatomée centrique », « dinoflagellé nu », etc. Néanmoins, ce type d'approche n'est pas réaliste et s'éloigne des conditions habituelles d'identification par les participants, car cette liste 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...).

Concernant les résultats qualitatifs, les identifications correctes au niveau des genres ou espèces cumulées représentent 92,5% des résultats avec 74.5% d'identifications correctes au niveau de l'espèce ou groupe d'espèces. Ces scores sont très satisfaisants.

Gonyaulax spinifera est l'espèce qui a posé le plus problème. Huit analystes ont identifié l'espèce *Lingulodinium polyedrum*. Les épines typiques chez *Gonyaulax spinifera* étaient absentes ou très petites sur les cellules de culture des échantillons ce qui a dérouter ces analystes. Toutefois, d'autres critères morphologiques permettaient l'identification de cette espèce.

Akashiwo sanguinea et *Chaetoceros danicus* sont les deux espèces qui ont été correctement identifiées par tous les analystes.

Azadinium spinosum est une espèce de faible taille dont la confusion avec le genre *Heterocapsa* en microscopie optique est reconnue par les experts. Treize analystes ont toutefois correctement reconnu le genre *Azadinium* ce qui témoigne de l'amélioration des compétences du réseau d'analystes.

L'espèce *Chaetoceros curvisetus* a posé quelques problèmes d'identification. En effet les cellules de culture des échantillons ne présentaient pas parfaitement les caractères typiques de cette espèce habituellement observés dans des échantillons naturels.

L'espèce de *Corethron* présente dans les échantillons est une espèce enregistrée plutôt dans les eaux froides. Ce genre est par ailleurs peu présent dans les échantillons observés dans le cadre du REPHY et donc peu connue par les observateurs de ce réseau. Toutefois *Corethron hystrix* a été présenté et comparé à *C. criophilum* lors d'une formation en septembre 2019, ce qui a permis à 15 analystes de l'identifier correctement.

Les cellules d'*Heterosigma akashiwo* se dégradent fortement sous l'action du lugol. Il en résulte des sortes d'amas informes comme avec *Fibrocapsa japonica*, ce qui explique la confusion entre ces deux espèces. Ceci explique aussi que deux participants n'ont pas détecté leur présence dans les échantillons, en particulier si cette espèce est peu ou pas présente dans les échantillons habituellement analysés par ces observateurs.

Un seul analyste n'a pas correctement identifié l'espèce *Prorocentrum micans* et l'a confondue avec *P. lima*.

Concernant les *Pseudo-nitzschia*, globalement la majorité des participants ont correctement identifié le complexe des cellules de type large. Seuls trois analystes ont classé ces cellules dans le complexe des fines. Pour ces trois analystes une formation ciblées sur les *Pseudo-nitzschia* est à envisager.

Enfin, l'espèce de *Thalassiosira* présente dans l'échantillon était plus précisément *T. tenera*. Toutefois, l'organisateur a omis de proposer cette espèce dans la liste des réponses. En revanche il a fourni des informations complémentaires dans le guide (cf. ANNEXE II). Ces informations permettaient l'identification de cette espèce. Pour cet exercice, il est donc impératif de bien lire les documents fournis par l'organisateur.

Concernant les résultats quantitatifs, pour les cinq taxons *Akashiwo sanguinea*, *Azadinium spinosum*, *Chaetoceros curvisetus*, *Heterosigma akashiwo* et *Thalassiosira* sp., les critères des tests d'homogénéité et de stabilité sont tous remplis, sauf l'analyse de variance pour *A. sanguinea* qui malgré cela ne présente aucun signal d'avertissement ou d'alerte. Pour ces taxons, si les scores z dépassent les limites de tolérance, les participants doivent chercher une ou des raisons dans leurs pratiques. Il est important de souligner que le taxon qui a généré le plus de signaux est *A. spinosum*, avec trois dépassements des limites de tolérance et un dépassement des limites de contrôle. De plus,

trois des quatre signaux apparaissant pour l'analyste B-94 concernent ces taxons. Cet analyste présente souvent des valeurs inférieures à la moyenne de référence. Il faut bien noter que cette analyste est novice, et donc, que dans l'ensemble ses résultats ne sont pas si mauvais.

Pour *Corethron hystrix*, les critères de stabilité ne sont pas remplis, c'est une piste d'explication pour les signaux d'avertissement qui concernent trois analystes.

Pour les taxons *Chaetoceros danicus* et *Prorocentrum micans*, les critères d'homogénéité et de stabilité ne sont pas entièrement remplis. Cependant, aucun signal n'apparaît pour *C. danicus*. Concernant *P. micans*, l'analyste D-08, qui présente un signal d'alerte fort, est en dessous des moyennes de référence pour tous les taxons et tous les réplicas. La cause est liée à la dégradation des échantillons qui ont été transmis à cette analyste par un autre laboratoire participant. Le transfert d'échantillons inter-laboratoire a un impact certain sur la stabilité des échantillons. En revanche, l'analyste G-09 présente un signal d'avertissement dû à des valeurs plus fortes que la valeur de référence de *P. micans* probablement dû au défaut d'homogénéité pour ce taxon.

Enfin, pour *Gonyaulax spinifera* et *Pseudo-nitzschia seriata complex*, les critères ne sont pas remplis pour l'homogénéité mais sont considérés comme stables. Pour ces deux taxons, l'écart-type inter-échantillons est inclus dans l'écart-type pour les calculs des scores z, afin de prendre en compte le manque d'homogénéité des échantillons. En cas de dépassement du score z, il n'est pas possible de conclure avec certitude à un défaut de pratique de l'analyste. Il est toutefois conseillé à l'analyste de rechercher les causes possibles.

Pour 12 des 19 participants évalués sur leurs résultats quantitatifs (Tableau 9), tous les scores z sont compris entre les limites de tolérance. Sur les 190 scores z évalués (10 taxons x 19 analystes), 172 sont compris entre les limites de tolérance, ce qui représente près de 91 % de résultats satisfaisants.

Tableau 9 : bilan des scores z

Tous score z < 2	1 score z > 2	2 score z > 2	1 score z > 2 et 2 score z > 3	3 scores z > 2 et 1 scores z > 3	2 scores z > 2 et 3 scores z > 3
12 analystes	2 analystes G-04 et G-09	2 analystes C-74 et F-10	1 analyste I-03	1 analyste B-94	1 analyste D-08

5. BILAN

C'est la sixième année de participation du personnel du réseau d'analystes du REPHY à l'IPI organisé par le Marine Institute de Galway, et la cinquième année de l'extension de cet essai à une Comparaison Inter-Analystes interne à l'Ifremer, impliquant la plupart 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 en vue d'une amélioration continue et de déterminer des actions à mettre en œuvre pour corriger d'éventuelles dérives ou améliorer les techniques.

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 menés par un laboratoire accrédité, le Marine Institute de Galway, apporte cette assurance.

20 analystes sur les 24 qui constituent le réseau ont participé à l'exercice en 2019. Ce taux de participation est satisfaisant. Sur les quatre qui n'ont pas participé, un arrive en fin de carrière, trois n'étaient pas disponible durant l'exercice.

Cette année, avec 92,5 % d'identifications correctes des taxa, et 91% des scores z compris entre les limites de tolérance, les résultats reçus confirment les compétences des analystes dans l'identification et le dénombrement du phytoplancton marin.

En 2019, tous les laboratoires sont équipés d'un microscope à épifluorescence. Cette technique les a aidés à déterminer si les cellules étaient des dinoflagellés nus ou cuirassés et a permis d'observer les détails morphologiques des cellules et d'orienter leur identification.

Après six années de participation, chaque analyste dispose d'un nombre de résultats de dénombrement évalués qu'il serait intéressant de compiler, afin de déterminer si une amélioration est observée ou pas, et le cas échéant en rechercher les causes et les actions à mettre en œuvre.



IPI Phytoplankton Proficiency Test 2019 Instructions

1. Introduction
2. Deadlines, checklists and forms
3. Test method
4. Equipment
5. Sedimentation chambers and sample preparation
6. Counting procedure and strategy
7. Samples

1. Introduction

The Marine Institute, Galway, Ireland, conducts an annual International Phytoplankton Intercomparison (IPI) (formerly BEQUALM) on the abundance and composition of marine phytoplankton in water samples since 2005. First, under the auspices of the BEQUALM-NMBAQC umbrella and since 2011, in collaboration with the IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae of UNESCO, in Copenhagen, Denmark. The design and organization of this exercise continued under the Marine Institute- IOC - BEQUALM banner until 2015.

Since 2016, 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.

The web platform www.iphyi.org was created to be a single point source of information about the IPI scheme. Registration to the exercise must be completed through this website and all the information required is contained here. Documents required to participate in this exercise can be downloaded directly from this site including instructions and forms required to complete the test, but also other reference documents like past intercomparison reports and also educational workshop presentations as slide shows. There are also a few additional video clips to guide you on how to set up your samples for analysis.

Information about this scheme can also be found through our partners, the IOC (<http://hab.ioc-unesco.org> under the heading 'activities and training courses') and associates 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 of the other NMBAQC schemes.

The purpose of this exercise is to compare and evaluate the performance of testing laboratories and to monitor the laboratories continuing performance over time on the composition and abundance of marine microalgae in preserved marine samples. We

work mainly with laboratories engaged in national official/non-official phytoplankton monitoring programmes, water framework directive, marine strategy framework directive and others (environmental agencies, consultancies, private companies) working in the area of analysis of quality assurance in marine phytoplankton. Phytoplankton analysts should participate annually in an external and independent proficiency testing scheme to test their ongoing competency.

The Marine Institute is accredited to ISO 17025 for toxic marine phytoplankton abundance and composition since 2005 and recognises that regular quality control assessments are crucial to ensure a high quality output of phytoplankton data. We are programmed to apply for the accreditation of this Proficiency Testing scheme under ISO 17043 for 2020. All our work is carried out following the technical and managerial requirements for PT schemes (ISO17043:2010) and the data is statistically analysed using the statistical methods as laid out in ISO13528:2015 'Statistical methods for use in PT by interlaboratory comparisons'. We use the statistical database software ProLab Plus from QuoData to do the statistical evaluation of the participants' data.

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.

In 2018 for the first time, we have changed the way we prepare the samples for this intercomparison. These changes will have implications in the way participants must prepare their samples for analysis, so read carefully the following notes.

In previous years, we have prepared a '**master mix**' by mixing manually using the Paul-Schatz rotation (figure of eight movement) a Schott glass bottle containing the species of interest. Then, a 5ml aliquot from this manually homogenised '**master mix**' was pipette into each pre-prepared sterilin tube containing an accurate volume of sterile seawater + lugol's iodine (45ml).

From now on, we are using an Inversina 2L tumbler mixer by Bioengineering to homogenize the Master mix (see video https://youtu.be/LTQ_mz0lXIU) to improve sample homogenization and an automated multi-pipettor (Xstream, eppendorf) delivers

the aliquots with accuracy into 10ml brown glass ampoules where the samples are finally stored at 2-5 °C until they need to be transported. Using this technique, the degradation of the samples is practically zero over 24 months.



Figure 1: Sample set per participant including sealed vials, lugol's iodine, plastic droppers and 50ml sterilin tubes.

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

2. Deadlines, checklists and forms

Upon sample receipt, analysts should ensure that they received everything listed in form 1; checklist confirmation (See fig. 1). Make sure that all the samples are intact and sealed properly and check that you have received Form 2; Enumeration and identification results log sheet (Excel workbook).

Please complete Form 1: checklist confirmation form and send it back to me by fax to (+353 91 387201) or scan it as a pdf file and send it to me via e-mail to rafael.salas@marine.ie . If you send the form via e-mail, please name the file as Form 1 followed by the exercise code and your full name **i.e. Form 1: IPI19 Rafael Salas**. This validates the traceability of the samples from origin to the laboratories and ensures that the materials arrived to the performing laboratories in good working conditions.

Analysts must complete and send their test results before or on 31/10/2019 to rafael.salas@marine.ie or fax (+353 91 387201) or post to Rafael Salas, Marine Institute, Phytoplankton laboratory, Rinville, Oranmore, Co. Galway, Ireland. 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.

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 don't arrive.

Form 2 is an Excel workbook named 'Enumeration and identification logsheet' for analysts to input their results. At the top of the form, first fill in your name, analyst and laboratory code. Fill in all the information relevant to the analysis of your samples, for example the settlement date, chamber volume used in 'mls', the analysis date and the sample number in the corresponding cells.

Under the column 'organism' a drop down menu appears 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 inoculated in the samples and provide a cell count. If is not in the list, is not in the sample.

The number of rows under the column name 'organism' is arbitrary and independent of the number of species in the samples. There are 14 rows but this doesn't necessarily mean that you need to enter 14 names or that there are 14 species in the samples. The number and type of species inoculated in the samples is different from year to year.

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

Once you have completed your samples and have reviewed your calculations in form 2, please send your form 2 back to me 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 name the

file as Form 2 followed by the exercise code and your full name **i.e. Form 2: IPI19 Rafael Salas.**

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 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 but other volume chambers can be used.

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 2). Three sedimentation chambers are required.

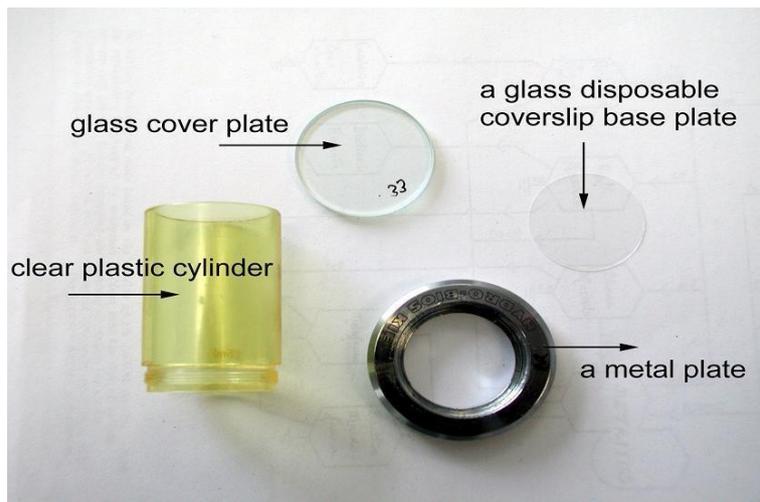


Fig 2: Sedimentation counting chamber

- 5.1 **Storage of ampoules:** If you are not analysing the samples straightaway or if you are analysing them in different dates, please ensure the samples are kept in a fridge at 2-5°C away from direct sunlight and in an upright position.
- 5.2 **Temperature adaptation:** Vials must be adapted to room temperature before aliquoting and sedimentation takes place. This reduces the risk of air bubbles inside the sedimentation chambers due to temperature differences between room and sample.
- 5.3 **Preparation of samples for analysis from ampoules:**
- 5.3.1 Please follow the link here to watch a video on how to prepare your sample for analysis from an ampoule. <https://youtu.be/2WqRNGDn4MU>
- 5.3.2 The sterilin tubes should be prepared in advance of opening the ampoule.
- 5.3.3 Measure accurately 47ml of sterile seawater containing a few drops of lugol's iodine. The ampoules are already preserved in lugols, but when the sample is aliquot into the tube, it is going to be diluted and pale in colour, so if you wish your sample to have a slightly darker coloration you can add a few drops of lugols iodine to the sterile seawater before you pipette the amount.

- 5.3.4 The volume can be measured in different ways, using an accurate pipette is one way to do it. However, you can use a gravimetric method also by weighing the amount using a balance. If you use a gravimetric method, remember that the density of Seawater at 33-35ppt is roughly 1.025g, so that 47ml = 48.175g in weight.
- 5.3.5 The seawater used should be of a salinity of 33-35ppt
- 5.3.6 Once the sterilin tubes containing 47ml seawater are ready you can start working with the ampoules.
- 5.3.7 First adapt the ampoule and test tube to room temperature, before aliquoting.
- 5.3.8 Make sure the ampoule contents are at the bottom of the ampoule. If some contents are trapped on the top, flick the ampoule using your fingers to dislodge any liquid.
- 5.3.9 Break the ampoule by the neck pre-marked break line using gloves and a wad of paper to avoid cuts and grazes. Avoid losing any sample content. If you think some content is lost, you have an extra sample to work with and if this fails, ask for another set.
- 5.3.10 Use one dropper per sample, do not mix or use the same dropper. Using the dropper, aspirate the contents from the ampoule into the tube.
- 5.3.11 Once all the sample has been aliquoted into the tube, using the same dropper, take a 3ml sample from the tube itself and rinse the ampoule with it once, collect the liquid again back into the tube.
- 5.3.12 Close the lid of the tube, invert the sample 50 times minimum and pour into a sedimentation chamber of your choice.
- 5.3.13 Once the sample has been taken out of the ampoule into the tube, the sample should be settled and analysed. **Do not keep the sample in the tube for several days as this will invalidate your analysis.**

5.4 **Chamber preparation:**

- 5.4.1 All sedimentation chambers should be cleaned before you start
- 5.4.2 Place a new disposable cover slip base plate inside a cleaned metal plate.
- 5.4.3 Screw the plastic cylinder into the metal plate until tight. Extra care should be taken when setting up chambers. Disposable cover slip base plates are fragile and break easily causing cuts and grazes.
- 5.4.4 Once the chamber is set up, it should be tested for the possibility of leaks by filling the completed chamber with sterile filtered seawater and allowing it to rest for a few minutes. If no leakage occurs, pour out the water, dry out completely and proceed with the next step.

5.5 **Sample homogenisation and filling:**

- 5.5.1 To set up a sample for analysis, firmly invert the sample at least 50 times before pouring the sample to ensure that the contents are homogenised properly. Avoid hard shaking of the samples
- 5.5.2 Place the chamber in a flat horizontal surface protected from vibration and strong sunlight and gently pour the sample into the counting chamber to the top. Cover the chamber with the glass plate to complete the vacuum, making sure that there are no air bubbles or pockets between the sample and the cover glass.
- 5.5.3 Label the sedimentation chamber with the sample number from the ampoule.

5.6 **Sedimentation time:**

- 5.6.1 Settling time is dependent on the height of the chamber. 10ml chambers should be allowed to settle for a minimum of 8 hours, 25ml chambers for a minimum of 12 hours and 50ml chamber for a minimum of 24 hours.

5.6.2 Set the chamber on the inverted microscope and start the analysis.

6. Counting Procedure and strategy

- 6.1 Scan the entire chamber at low magnification first to get an initial overview of the density, distribution and composition of phytoplankton in the samples.
- 6.2 Assess the random distribution pattern of the organisms in the sample before starting the analysis. Larger organisms tend to sediment towards the edges and smaller ones towards the centre if the temperature of the chamber is higher than the sample and vice-versa if the temperature of the chamber is lower than the sample. A visual inspection is enough to assess these patterns.
- 6.3 If the sample is not randomly distributed, then the sample will have to be returned to its original container and settled again after a period of acclimatization. This is particularly important if other counting strategies are to be used in some organisms other than the whole chamber count, in which case, the sample count wouldn't be affected.
- 6.4 Make a preliminary list of species and densities to help you choose the best counting strategy for the sample.
- 6.5 Choose the correct organism/s from the dropdown species list in the Excel worksheet Form 2.
- 6.6 Start at the lower magnification to count the larger species if present, depending on size even x 4 or x 10 objectives could be used. Then, go over the sample again at higher magnifications to count the rest of the species.
- 6.7 The smaller species should be counted at a higher objective magnification (x 20) or x 40 if necessary.
- 6.8 Each analyst should carry out a whole chamber cell count (WC) where possible.

- 6.9 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 half chamber (HC), field of view (FV) or transect (Tr) counting strategy.
- 6.10 If half of the chamber is to be counted, analyse every second transect.
- 6.11 If a transect counting strategy is used for one or several organism, count at least three transects and average your results. Be consistent as to which cells lying on which borders are to be counted or omitted.
- 6.12 Fields of view should be avoided if possible but if you need to use this counting strategy, count at least ten different randomly selected fields and average your results.

7. Samples

Analysts must analyse three samples in total to complete this part of the exercise. The samples are replicates. A fourth sample is additional and should be used as a replacement in case of one sample leaking or breaking. All the samples 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 counts (where possible ; see section 6.) on each organism and sample.

The Master mix, have been made up with different aliquots of cell cultures at different concentrations and estimates have been carried out in 1ml lugol's preserved samples and counted in Sedgewick-Rafter chambers for each species. This is done to check the condition and the densities of the cultures prior to inoculating into the Master mix.

Once the master mix have been made up in a 2L brown schott glass bottle with the target species at the required concentrations, this mixture has been homogenised using an automated tumbler mixer (Inversina 2L) that uses the Paul-Schatz movement for 4 minutes at 60 rpm approximately and divided in 8 x 250ml batches. These in turn have been homogenised again at the same speed and time. 3mls of the Master mix have been inoculated using an automated multi-pipette eppendorf into a batch of 10ml brown glass ampoules, containing 100µl of lugols iodine.

The ampoules have been purged using nitrogen gas and sealed using a torch. The ampoules have been checked for leaks by submerging on a water bath and then stored at 2-5°C in the dark. The ampoules have been assigned a random number.

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



IPI2019 PHYTOPLANKTON COUNTING GUIDE

Spend some time becoming familiar with the samples and how the cells appear on the base plate before commencing any counts. This guide should give you some hints as to how to count the organisms.

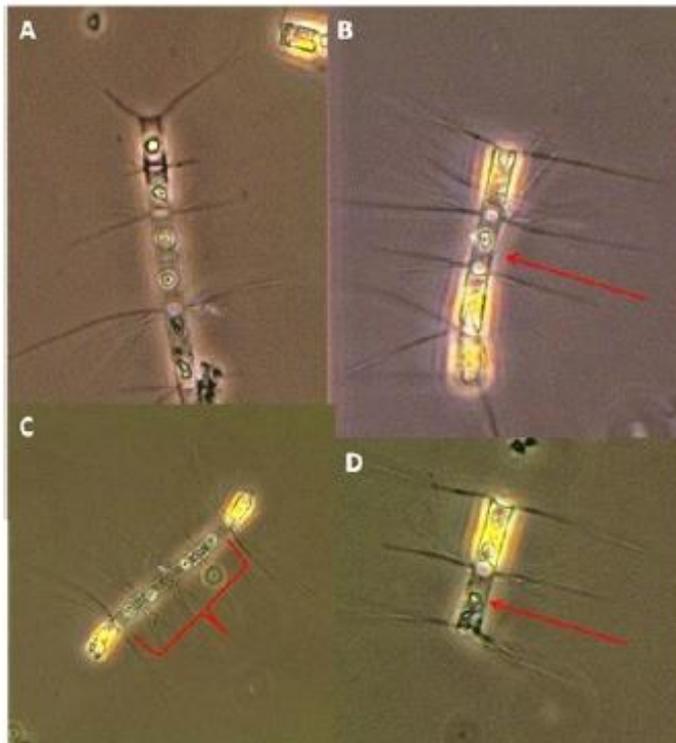


Fig.1 Diatoms. A-D cells are not in good condition, the chloroplasts are plasmolysed and hardly visible inside the frustule. Image A do not count any cells. Image B count 3 cells but don't count the second cell in the chain. In image C count the terminal cells only and in image D only count one cell.

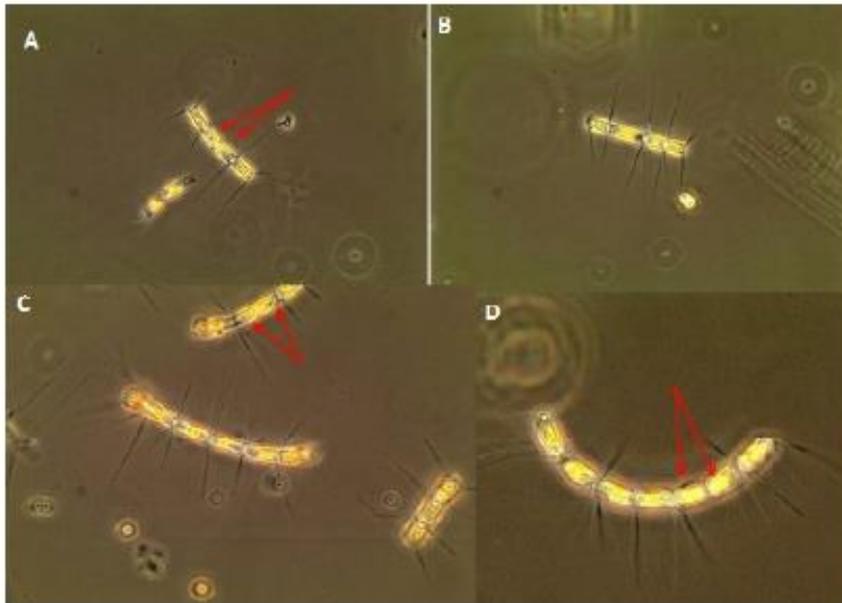


Fig.2 A-D. In image A (red arrows), the middle cells have no setae, but the foramen between the cells is well developed, so we consider 2 cells here. The only difficulty could be with image C and D (red arrows) where 2 cells have divided but not setae are visible yet between the cell pair. In this case, as cells are well differentiated, count these as 2 cells rather than just 1.

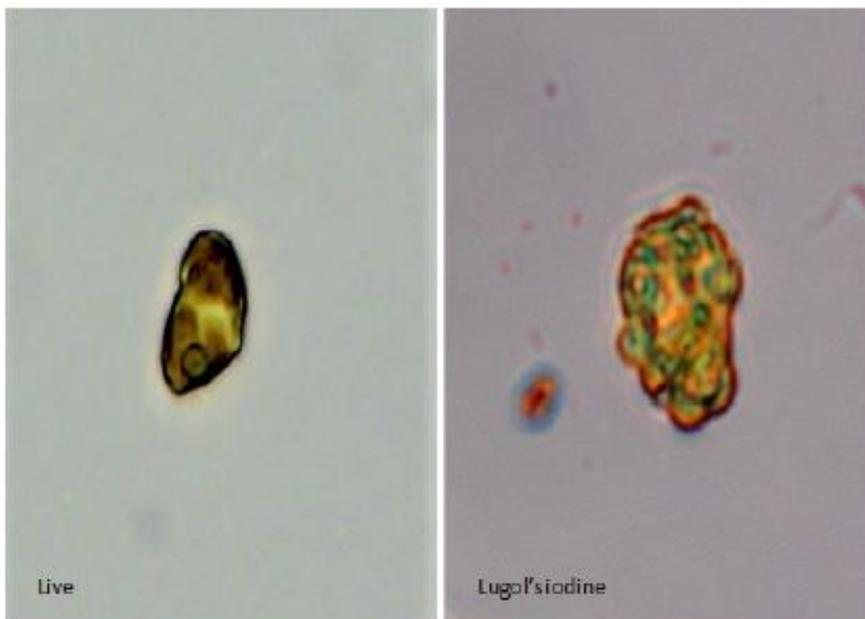


Fig. 3 Cells after preservation may look completely different.

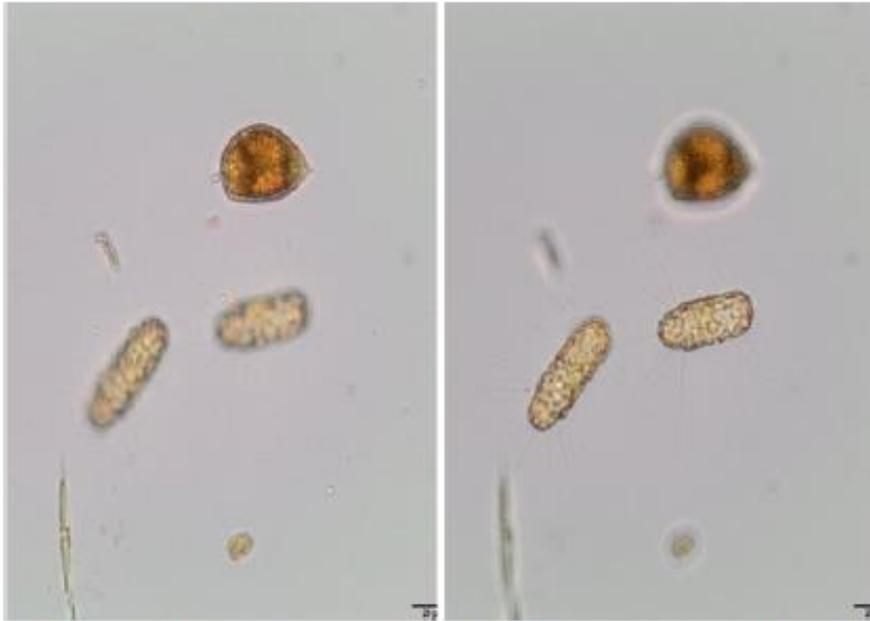


Fig.4 Be aware that some organisms may not settle on the same focal plane. Use Z-focus in your samples. Images taken @ x20 magnification

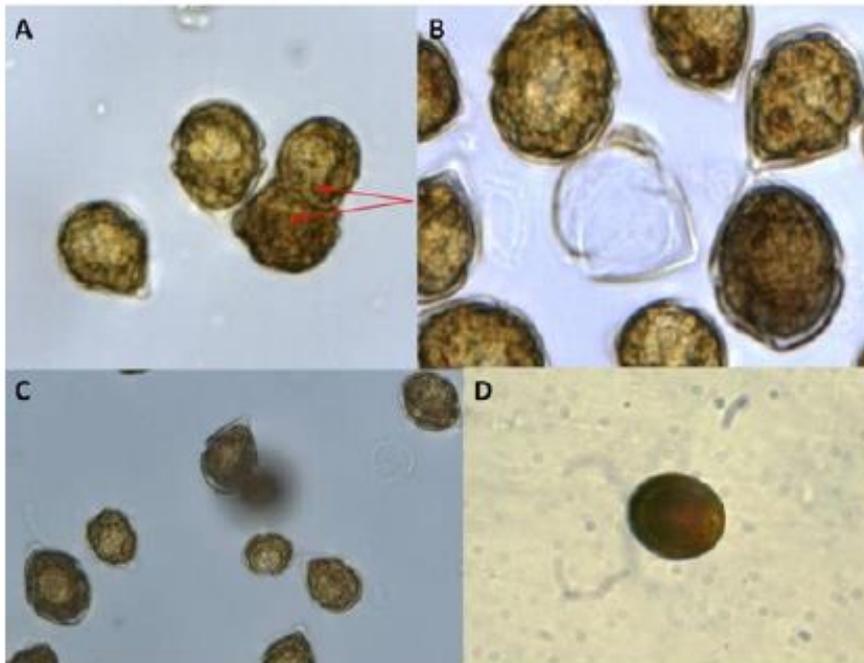


Fig.5 Image A shows two cells fusing or dividing, count only one cell. B: Dinoflagellates empty theca should not be counted. C: Cells may also vary in size, some cells will appear smaller than

others, this is normal in culture conditions. Count all cells big or small. D: Sometimes Plasmolysis may occur and the cells appear naked and rounded. Do not count plasmolysed cells as we don't know what they are.

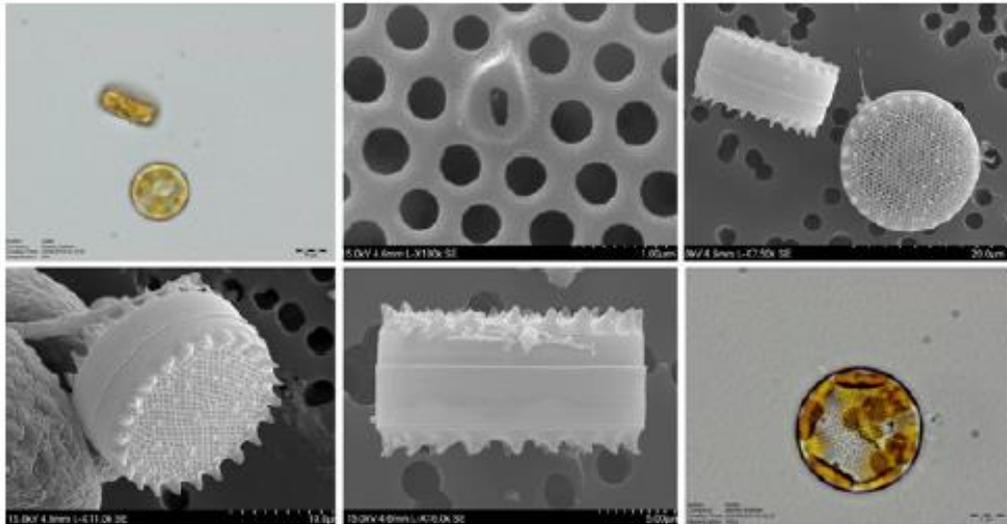


Fig.6 Samples contain a centric diatom. Due to their taxonomic difficulty, here we offer SEM images of this organism to aid in their identification.

These rules are applicable to this intercomparison exercise only.

- Grossel Hubert (2007). Essai interlaboratoires pour le dénombrement phytoplanctonique par la méthode d'Utermöhl. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00426/53736/>
- 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/>
- Rafael Salas & Jacob Larsen (2015). PHY-ICN-14-MI1 VR 1.0. **BEQUALM Phytoplankton proficiency test in the abundance and composition of marine microalgae 2014 report.** <https://www.iphyi.org/sites/default/files/SiteFiles/Documents/IPI%202014%20Final%20report.pdf>
- 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>
- 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>
- Neaud-Masson Nadine, Brun Mélanie (2016). **Essai inter-analystes Ifremer pour l'évaluation de la qualité des connaissances en taxinomie et dénombrement du phytoplancton marin – Rapport d'évaluation des analystes du phytoplancton marin dans le cadre du REPHY. Aquaref B3–9 –Rapport sur l'essai inter-analystes « détermination et dénombrement du phytoplancton ».** <https://archimer.ifremer.fr/doc/00340/45158/>
- Rafael Salas, Debbie Walsh & Jacob Larsen (2017). **International Phytoplankton Intercomparison (IPI) proficiency testing in the abundance and composition of marine microalgae 2018 report.** <https://www.iphyi.org/sites/default/files/SiteFiles/Documents/IPI%202017%20Final%20report.pdf>
- Neaud-Masson Nadine, Brun Mélanie, Chomérat Nicolas (2017). **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. ODE/VIGIES/17-12.** <https://archimer.ifremer.fr/doc/00388/49923/>
- Rafael Salas, Debbie Walsh & Jacob Larsen (2018). **International Phytoplankton Intercomparison (IPI) proficiency testing in the abundance and composition of marine microalgae 2019 report.** <https://www.iphyi.org/sites/default/files/SiteFiles/Documents/IPI%202018%20Final%20report%202.0.pdf>
- Neaud-Masson Nadine, Brun Mélanie, Chomerat Nicolas (2018). **Essai d'aptitude par comparaison Inter-analystes pour l'évaluation des performances en identification et dénombrement du phytoplancton marin. Rapport d'évaluation des compétences des analystes du phytoplancton dans le cadre du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie (REPHY) mis en œuvre par l'Ifremer. Rapport AQUAREF 2018.** <https://archimer.ifremer.fr/doc/00436/54797/>
- Neaud-Masson Nadine, Brun Mélanie (2019). **Essai d'aptitude par comparaison Inter-analystes pour l'évaluation des performances en identification et dénombrement du phytoplancton marin. Rapport d'évaluation des analystes du phytoplancton dans le cadre du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie (REPHY) mis en œuvre par l'Ifremer. Exercice 2018. Rapport AQUAREF 2019. 67p.** <https://archimer.ifremer.fr/doc/00592/70415/>
- Neaud-Masson Nadine (2020). **Observation et dénombrement du phytoplancton marin par microscopie optique. Spécifications techniques et méthodologiques appliquées au REPHY. Version 2 – février 2020. ODE/VIGIES/20/03 .** <https://archimer.ifremer.fr/doc/00609/72133/>
- Belin Catherine, Neaud-Masson Nadine (2017). **Cahier de Procédures REPHY. Document de prescription. Version 1. ODE/VIGIES/17-01.** <https://doi.org/10.13155/50389>

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.

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

CODE Labo- Analyst	<i>Akashiwo sanguinea</i>			<i>Azadinium spinosum</i>			<i>Chaetoceros curvisetus</i>			<i>Chaetoceros danicus</i>			<i>Corethron hystrix</i>		
A-01	0	160	0	5920	8040	7160	5000	3440	5720	15440	15320	12360	1560	2360	2600
A-26	0	160	0	8560	14200	11040	6920	10520	11280	16560	16640	12960	2320	2720	2920
B-94	0	160	80	4600	1600	4400	4400	1400	4400	17600	12400	14600	3000	1800	2200
C-74	0	120	200	6360	11160	4920	4240	3320	8440	16040	17080	14360	1200	1640	1440
D-08	0	40		2166	5960		4249	6960		13040	12800		2041	1160	
E-06	80	80		11600	14720		7520	9680		20720	16640		2400	1720	
E-46	240	200	160	13040	17520	15200	10000	10320	9120	18320	18720	20640	2360	1920	2160
F-10	200	320	240	7880	8280	8120	3120	2040	1800	15000	13680	11360	1440	1920	1080
F-79	240	240	240	17920	15280	8320	16320	10000	4000	21120	17120	13920	2720	2080	1920
G-04	200	360		2960	3960		4360	5280		14880	17480		1800	1560	
G-09	240	200	280	17640	19400	14640	6000	4520	9320	13400	20360	18760	1320	1400	2320
H-11	100	300	100	8700	9900	9600	3800	3400	5800	14400	15800	9800	1800	1900	2200
H-12	100	400	300	13000	12900	10200	9000	12200	14300	18700	21400	20100	2600	1500	2900
H-66	100	400	300	12000	10500	10800	7000	8400	16000	17200	18100	22300	2700	1800	2900
I-03	0	200	100	4100	1900	1000	7600	7700	3100	20500	19700	17400	2700	3000	1900
I-97	0	200	100	14700	17200	28400	10100	15800	21000	22600	21300	20900	3200	2700	2300
J-05	150	0	200	18450	14650	11250	16950	17700	13100	18900	22400	19050	2650	2350	2050
J-07	50	200	0	21100	12000	15350	15550	12650	16800	20550	20500	18200	1900	2500	2450
J-52	150	0	50	17000	14500	12200	14000	9950	13550	14050	22350	19800	1950	2500	2750

CODE Labo- Analyst	<i>Gonyaulax spinifera</i>			<i>Heterosigma akashiwo</i>			<i>Prorocentrum micans</i>			<i>Pseudo-nitzschia seriata complex</i>			<i>Thalassiosira sp.</i>		
A-01	3280	6080	4720	5880	15280	9240	1400	2800	2480	43400	59800	58000	11600	11800	8160
A-26	4120	6880	4760	6520	24040	11440	1760	3640	3040	41400	63120	63120	13320	15400	9480
B-94	4800	4000	4800	5200	2000	4000	2800	2000	2400	34400	12000	41200	9600	4800	10800
C-74	5600	7840	6240	8520	12040	14560	2000	2880	3760	36360	39760	47600	6800	9080	9200
D-08	2166	1920		8124	11640		125	1280		17164	29480		12373	9240	
E-06	6240	5360		19360	17360		3040	3280		87120	40640		15840	13680	
E-46	5640	6280	5720	14720	21920	18880	2360	2880	3040	48640	64720	86080	14640	18080	14880
F-10	8280	7400	5600	7520	10000	6280	3120	3360	3200	49760	55280	42760	10480	12080	14120
F-79	9520	8800	4160	30880	14880	13440	3800	3680	2280	57750	47600	46200	18160	15120	11040
G-04	4880	6400		7600	7040		3640	3520		58840	82560		10320	11240	
G-09	7360	8000	5920	14040	13080	10280	4840	5280	5200	43160	78240	65720	15200	15640	16240
H-11	5100	5400	5400	4200	7200	12100	3600	1800	2400	42200	49000	73400	19600	12100	7700
H-12	2600	5700	6500	15100	19200	12500	1800	3600	3300	56800	55400	102500	15000	16100	8600
H-66	3800	5200	6900	15500	16800	13600	1600	3600	3100	59200	59100	95400	16800	17200	9100
I-03	9000	7000	5300				3500	1900	1400	34900	20500	27400	14600	13100	11300
I-97	5900	8700	9000	12100	18600	33100	1300	4400	4500	27100	49700	112700	5300	15400	16300
J-05	7450	6600	7350	26750	14000	13550	3800	2950	3450	67300	102200	45600	15650	14750	16750
J-07	6850	6700	6650	24000	12250	14250	3450	3500	2950	76950	47600	97400	14350	15600	14350
J-52	7550	6800	6600	26200	13650	15400	3600	2900	3050	65900	94100	49500	15500	15250	16550

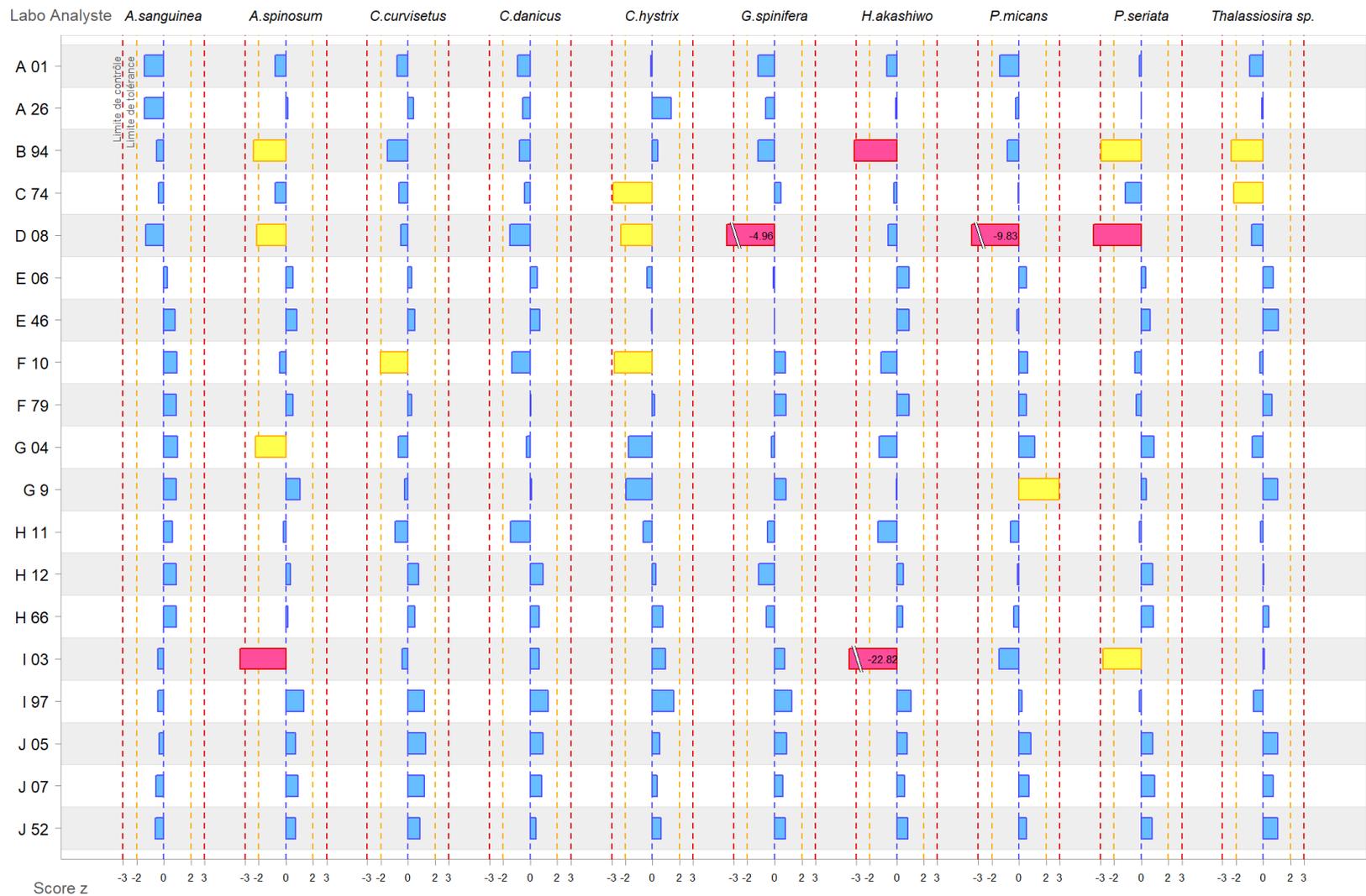
Résultats traités (moyennes des Log10 de chaque réplique et z score de cette moyenne)

CODE Labo-Analyste	<i>Akashiwo sanguinea</i>		<i>Azadinium spinosum</i>		<i>Chaetoceros curvisetus</i>		<i>Chaetoceros danicus</i>		<i>Corethron hystrix</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
A-01	0.735	-1.426	3.844	-0.778	3.664	-0.792	4.155	-0.952	3.327	-0.113
A-26	0.735	-1.426	4.043	0.164	3.971	0.409	4.184	-0.580	3.422	1.383
B-94	1.369	-0.511	3.503	-2.397	3.478	-1.523	4.168	-0.792	3.358	0.381
C-74	1.460	-0.380	3.848	-0.762	3.692	-0.686	4.198	-0.400	3.151	-2.893
D-08	0.801	-1.330	3.555	-2.150	3.735	-0.514	4.111	-1.518	3.187	-2.320
E-06	1.903	0.259	4.116	0.514	3.931	0.251	4.269	0.505	3.308	-0.415
E-46	2.295	0.825	4.180	0.818	3.991	0.487	4.283	0.692	3.330	-0.062
F-10	2.395	0.970	3.908	-0.475	3.353	-2.010	4.123	-1.373	3.158	-2.774
F-79	2.380	0.948	4.119	0.528	3.938	0.280	4.234	0.058	3.345	0.176
G-04	2.429	1.018	3.534	-2.250	3.681	-0.727	4.208	-0.281	3.224	-1.735
G-09	2.376	0.942	4.233	1.070	3.801	-0.258	4.236	0.089	3.211	-1.947
H-11	2.159	0.629	3.972	-0.169	3.625	-0.947	4.116	-1.456	3.292	-0.663
H-12	2.360	0.918	4.078	0.331	4.065	0.777	4.302	0.929	3.351	0.268
H-66	2.360	0.918	4.045	0.174	3.991	0.487	4.281	0.656	3.383	0.771
I-03	1.434	-0.418	3.297	-3.377	3.753	-0.446	4.282	0.678	3.396	0.972
I-97	1.434	-0.418	4.285	1.318	4.175	1.206	4.334	1.345	3.433	1.556
J-05	1.492	-0.333	4.161	0.727	4.198	1.296	4.302	0.934	3.369	0.545
J-07	1.333	-0.562	4.197	0.896	4.173	1.198	4.295	0.840	3.355	0.334
J-52	1.292	-0.623	4.159	0.719	4.092	0.881	4.265	0.451	3.376	0.657
Ecart-type de référence $\hat{\sigma}_s$	0.693		0.210		0.256		0.078		0.063	
$\hat{\sigma}'_s = \sqrt{(\hat{\sigma}_s)^2 + (s_s)^2}$	0.702		0.215		0.259		0.086		0.064	
Moyenne de référence X_s	1.723		4.008		3.867		4.229		3.334	

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

CODE Labo-Analyste	<i>Gonyaulax spinifera</i>		<i>Heterosigma akashiwo</i>		<i>Prorocentrum micans</i>		<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> complex		<i>Thalassiosira</i> sp.	
	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-01	3.658	-1.210	3.973	-0.709	3.329	-1.410	4.726	-0.118	4.016	-1.022
A-26	3.710	-0.648	4.085	-0.089	3.430	-0.246	4.739	0.001	4.096	-0.091
B-94	3.655	-1.242	3.540	-3.120	3.376	-0.868	4.410	-2.967	3.899	-2.381
C-74	3.813	0.455	4.058	-0.236	3.445	-0.069	4.613	-1.141	3.918	-2.158
D-08	3.309	-4.960	3.988	-0.627	2.602	-9.826	4.352	-3.492	4.029	-0.871
E-06	3.762	-0.087	4.263	0.906	3.499	0.558	4.775	0.321	4.168	0.741
E-46	3.769	-0.015	4.262	0.896	3.438	-0.147	4.811	0.650	4.198	1.095
F-10	3.845	0.806	3.891	-1.163	3.509	0.664	4.690	-0.440	4.084	-0.232
F-79	3.847	0.830	4.264	0.907	3.501	0.579	4.701	-0.340	4.161	0.655
G-04	3.747	-0.247	3.864	-1.315	3.554	1.188	4.843	0.941	4.032	-0.834
G-09	3.847	0.831	4.092	-0.047	3.708	2.971	4.782	0.389	4.196	1.062
H-11	3.724	-0.497	3.854	-1.369	3.397	-0.623	4.727	-0.107	4.087	-0.196
H-12	3.661	-1.174	4.186	0.478	3.443	-0.090	4.836	0.877	4.106	0.020
H-66	3.712	-0.632	4.183	0.460	3.417	-0.392	4.841	0.922	4.140	0.416
I-03	3.841	0.764	0.000	-22.817	3.323	-1.483	4.431	-2.781	4.112	0.087
I-97	3.888	1.270	4.291	1.059	3.470	0.221	4.727	-0.107	4.041	-0.728
J-05	3.853	0.887	4.235	0.749	3.529	0.903	4.832	0.841	4.196	1.064
J-07	3.828	0.624	4.207	0.595	3.517	0.765	4.851	1.009	4.169	0.753
J-52	3.843	0.787	4.247	0.815	3.501	0.577	4.829	0.813	4.197	1.084
Ecart-type de référence $\hat{\sigma}_s$	0.093		0.180		0.086		0.111		0.086	
$\hat{\sigma}'_s = \sqrt{(\hat{\sigma}_s)^2 + (s_s)^2}$	0.109		0.186		0.093		0.125		0.089	
Moyenne de référence X_s	3.770		4.100		3.451		3.739		4.104	

ANNEXE V Résumé des z scores de tous les analystes



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

- Boulogne sur mer (LER-BL)
- Port en Bessin (LER-N)
- Dinard (LER-BN)
- Concarneau/Brest (LER-BO - Br)
- Lorient (LER-MPL/LO)
- Nantes (LER-MPL/NT)
- La Tremblade (LER-PC)
- Arcachon (LER-AR)
- Sète (LER-LR)
- Toulon (LER-PAC/TL)

Responsables nationaux :

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