

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

**RAPPORT D'EVALUATION DES COMPETENCES 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**

## **Auteurs**

**N. NEAUD-MASSON, M. BRUN, N. CHOMERAT**

**Date**

**AVRIL 2018**

**Document final**

Avec le soutien de





## Contexte de programmation et de réalisation

---

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2017, au titre de l'action « B3 » « Mettre en œuvre les méthodes de bioindication dans la surveillance et l'évaluation ».

Auteur (s) :

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

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

*Nicolas Chomérat*  
*Ifremer Concarneau*  
*Nicolas.Chomerat@ifremer.fr*

---

Vérification du document :

*Béatrice Lalère*  
*LNE*  
*Beatrice.Lalere@lne.fr*

## Les correspondants

---

AFB : Y. Reyjol  
J-M. Baudoin  
A. Giry

Irstea: C. Chauvin (pilote de thème)

LNE : B. Lalère

IFREMER : B. Andral

Référence du document : Nadine Neaud-Masson, Mélanie Brun, Nicolas Chomérat – 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 – 63 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 .....                 | 27 |
| 3.4 Résultats quantitatifs des participants et discussion .....             | 29 |
| 4. DISCUSSION GENERALE .....                                                | 40 |
| 5. CONCLUSION.....                                                          | 42 |

---

**Liste des annexes :**

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ANNEXE I Bibliographie .....                                                                               | 43 |
| ANNEXE II Marine Institute – IPI - International Phytoplankton Intercomparison<br>2017 - Instructions..... | 44 |
| ANNEXE III Résultats détaillés des analystes .....                                                         | 60 |
| ANNEXE IV Résumé des z scores de tous les analystes.....                                                   | 62 |
| ANNEXE V Diffusion interne Ifremer du rapport .....                                                        | 63 |

---

**Liste des photos :**

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Photo 1 : <i>Akashiwo sanguinea</i> échantillon IPI 2017 - photo N. Neaud Masson<br>(microscope optique à contraste de phase). .....            | 18 |
| Photo 2 : <i>Azadinum spinosum</i> échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson<br>(microscope optique à contraste de phase) .....             | 18 |
| Photo 3 : <i>Azadinum spinosum</i> échantillon IPI 2017 - photo Aurore Lejolviet Ifremer<br>LERBN (microscope optique à épifluorescence). ..... | 19 |
| Photo 4 : <i>Cylindrotheca closterium</i> échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson<br>(microscope optique à contraste de phase) .....      | 19 |
| Photo 5 : <i>Chaetoceros curvisetus</i> échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson<br>(microscope optique à contraste de phase) .....        | 20 |
| Photo 6 : <i>Chaetoceros danicus</i> échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson<br>(microscope optique à contraste de phase) .....           | 21 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Photo 7 : <i>Prorocentrum</i> sp. échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson<br>(microscope optique à contraste de phase). ....                                                                                                                                                                                                                                          | 21 |
| Photo 8 : <i>Prorocentrum</i> sp. échantillon IPI 2017 - photos Audrey Duval (microscope<br>optique à épifluorescence). ....                                                                                                                                                                                                                                                | 22 |
| Photo 9 : <i>Prorocentrum</i> sp. échantillon IPI 2017 - photos Nicolas Chomérat<br>(microscopie électronique à balayage) .....                                                                                                                                                                                                                                             | 22 |
| Photo 10 : <i>Prorocentrum cordatum</i> – In Lassus P. ; Chomérat N. ; Hess P. ; Nézan E.<br>2016. Toxic and Harmful Micro-algae of the World Ocean / Micro-algues<br>toxiques et nuisibles de l'océan mondial. Denmark, International Society<br>for the Study of Harmful Algae / Intergovernmental Oceanographic<br>Commission of UNESCO. IOC Manuals and Guides, 68..... | 23 |
| Photo 11 : <i>Pseudo-nitzschia pungens</i> échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson<br>(microscope optique à contraste de phase) .....                                                                                                                                                                                                                                 | 24 |
| Photo 12 : <i>Scrippsiella trochoidea</i> échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson<br>(microscope optique à contraste de phase) .....                                                                                                                                                                                                                                  | 25 |
| Photo 13 : <i>Scrippsiella trochoidea</i> échantillon IPI 2017 - photos Audrey Duval<br>(microscope optique à épifluorescence) .....                                                                                                                                                                                                                                        | 25 |
| Photo 14 : <i>Trieres sinensis</i> échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson<br>(microscope optique à contraste de phase) .....                                                                                                                                                                                                                                         | 26 |
| Photo 15 : <i>Trieres mobiliensis</i> <i>T. sinensis</i> <i>T. regia</i> . in Paulmier G., 1997. Atlas des<br>diatomophycées des côtes françaises et des aires océaniques adjacentes.<br>Rapport interne IFREMER/DRV/RH/97-014, 148 pp. (planches 53 et 55) 26                                                                                                              |    |

## RESUME

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 2017, sur 21 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 (Ireland), pour évaluer les performances en identification et en dénombrement du phytoplancton marin. En 2017, 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. Au total, 16 analystes sur les 21 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 98.6 % de résultats corrects et tous les genres correctement identifiés par quinze participants, l'essai confirme les compétences des analystes. Les difficultés d'identifications spécifiques concernent essentiellement les dinoflagellés cuirassés. 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. A ce jour cinq laboratoires sur les douze implantations du réseau d'observateurs du REPHY ont un microscope équipé d'un module d'épifluorescence. Il est envisagé d'équiper progressivement tous les laboratoires de notre réseau.

L'analyse statistique des résultats quantitatifs s'appuie sur le calcul du score z comme mesure de performance, tel que défini dans la norme ISO 13528 :2015. Concernant ces résultats, 95.1% des scores z sont compris entre les limites de tolérance ce qui est globalement très satisfaisant. L'analyse statistique met en évidence l'importance du nombre de participants. En effet seize analystes du REPHY, qui en comptait 21 en juin 2017, ont participé alors qu'un minimum de 18 participants s'avère nécessaire pour que l'incertitude de la valeur assignée soit considérée comme négligeable. L'exercice se déroule de juin à août. Cette période n'est pas très propice à la mobilisation du personnel, qui voit son plan de charge augmenter en raison des absences pour congés. Toutefois, il n'est pas possible de changer cela, puisque nous sommes dépendants de l'organisation du Marine Institute de Galway.

**Mots clés** (thématique et géographique) : Phytoplancton, Comparaison Inter-Laboratoire, CIL, Comparaison Inter-Analyste, CIA, Essai d'aptitude.



## 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), is based in 2017 on 21 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 2017, 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 16 on 21 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 98.6% of correct results and all genera correctly identified by fifteen participants, the test confirms the skills of the analysts. The difficulties of specific identifications mainly concern armoured (thecate) dinoflagellates. 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. To date, five laboratories out of the twelve implantations of the REPHY monitoring network have a microscope equipped with an epifluorescence module. It is planned to gradually equip all the laboratories of our network.

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, 95.1% of z scores are within the tolerance limits, which is overall very satisfactory. Statistical analysis highlights the importance of the number of participants. Indeed, sixteen REPHY analysts, who had 21 analysts in June 2017, participated while a minimum of 18 participants was needed to make the uncertainty of the assigned value negligible. The exercise runs from June to August. This period is not very conducive to the mobilization of staff, who sees his load plan increase due to absences for leave. However, it is not possible to change that since we are dependent on the organization of the Marine Institute Galway.

**Key words** (thematic and geographical area) : Phytoplankton, Inter-Laboratory Comparison, CIL, Inter-Analyst Comparison, CIA, 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).

La mise en œuvre par Ifremer d'une surveillance du phytoplancton et des phycotoxines depuis 1984 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'Agence Française pour la Biodiversité (AFB) 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 ;
- 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 2017, la détermination des espèces phytoplanctoniques et l'estimation de leur abondance dans le cadre du REPHY ont été réalisées par 21 analystes de l'Ifremer, répartis sur 12 sites, plus 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-Masson (2015). Ces protocoles s'inspirent des lignes directrices de la norme NF EN 15204 (2006) fondée sur la technique de sédimentation classique telle que définie par Utermöhl en 1958. Cette norme s'adresse spécifiquement aux analyses de routine par microscopie optique inversée, telles que pratiquées pour le REPHY, mais elle ne cite pas explicitement le recours à des exercices de comparaison inter-laboratoires (CIL) ou inter-analystes (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 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 terme d'identification et de dénombrement du phytoplancton marin, des laboratoires engagés dans les programmes nationaux officiels de surveillance du phytoplancton, dans la DCE et dans la DCSMM, ainsi que d'autres laboratoires (organismes environnementaux, consultants, entreprises privées) travaillant dans l'analyse du phytoplancton marin. A l'issue de cet essai, chaque analyste reçoit un certificat de performance. Ce document est important pour alimenter le dossier de compétence personnel de chaque analyste et satisfaire aux exigences relatives à la qualification du personnel, requises dans la norme NF EN 15972. En 2017, neuf analystes Ifremer ont été inscrits pour participer à l'IPI réalisé par le Marine Institute de Galway.

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 de situer leurs estimations vis-à-vis des résultats obtenus par l'ensemble des analystes de ce réseau. Dans le cas d'une discordance significative des résultats, les analystes concernés devront mener une réflexion en vue de l'optimisation de leurs pratiques ou l'approfondissement de leurs connaissances taxinomiques. Cet exercice s'inscrit aussi dans la démarche de labellisation du REPHY qui impose également l'évaluation des performances des observateurs et leur habilitation.

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

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1 ORGANISATION**

En 2017, 9 des 21 analystes du dispositif du REPHY, répartis sur 12 sites, ont été inscrits à l'IPI et ont rendu leurs résultats selon les instructions prévues (Cf. ANNEXE II). Au total, 91 analystes de 45 laboratoires se sont inscrits à cet exercice (85% d'Europe, 8% d'Amérique du Sud, 4% d'Australie et 3% d'Afrique). Les inscrits français ont représenté 12% des participants avec 10% provenant de l'Ifremer et 2% d'autres organismes (LIENSs et UMR Marbec IRD).

Les échantillons de cet essai ont été utilisés pour étendre l'exercice aux analystes du REPHY non inscrits à l'IPI. Sept analystes, en plus des neuf inscrits à l'IPI, ont participé et ont rendu leurs résultats. Au total 16 analystes sur les 21 qui constituent le réseau d'observation du REPHY ont donc participé à cet exercice en 2017. Cinq analystes n'ont pas pu participer en raison de leur plan de charge pendant la période de l'exercice qui se déroule de juin à août.

L'exercice s'inspire de la méthodologie mise en œuvre dans le cadre de l'IPI. Tous les échantillons ont été préparés par Le Marine Institute de Galway. Une préparation d'un volume suffisant pour l'essai est constituée d'un mélange d'espèces issues de cultures en laboratoire. Cette préparation est fixée au lugol neutre, homogénéisée, puis répartie dans les tubes qui constituent les aliquotes transmis aux laboratoires.

Quinze échantillons (13 + 2 de secours) ont été transmis à un laboratoire expert pour tester leur homogénéité et leur stabilité. Ces échantillons ont été divisés en deux répliques de 25 ml. Dans un premier temps, les deux répliques de 10 échantillons ont été analysés pour tester l'homogénéité. Un mois plus tard, les deux répliques de trois échantillons ont été analysés afin de tester la stabilité des échantillons. Les résultats de dénombrement de ces échantillons, fournis dans le rapport de Salas et Larsen (PHY-ICN-17-MI1 VR 1.0), sont utilisés pour interpréter les résultats du CIA relativement aux résultats de stabilité et d'homogénéité obtenus.

Vers le 08 juin, les participants inscrits à l'IPI ont reçu :

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

Les participants ont réalisé une analyse microscopique sur trois aliquotes (répliques) et ont retourné les résultats concernant la composition des taxons présents, identifiés au niveau de

l'espèce ou, à défaut, du genre, ainsi que leurs abondances en nombre de cellules par litre, pour chaque taxon, dans chaque réplica. Dans le cadre de l'IPI, le délai entre la réception des échantillons et le rendu des résultats est fixé à cinq semaines maximum, soit 36 jour, avec une livraison des échantillons en fin de semaine 23 et un rendu des résultats en fin de semaine 28.

Au sein de chaque laboratoire du réseau de l'Ifremer, un analyste au minimum est inscrit à cet essai (à l'exception du site Ifremer de Sète dont le plan de charge cette année ne permettait pas cette participation). Les autres analystes du laboratoire utilisent donc les échantillons reçus dans ce cadre. Le volume de chaque aliquote (environ 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. Pour les participants à l'essai complémentaire, un délai plus large a été accordé, avec une date limite de rendu des résultats fixée à fin août, c'est-à-dire douze semaines (85 jours) après la réception des colis. Le traitement des résultats a été fait de manière anonyme. Pour cela, un code a été attribué à chaque analyste. Chaque analyste connaît son propre code et seul l'organisateur connaît l'ensemble des correspondances analyste/code. A l'issue du traitement des résultats, chaque analyse tient compte de son évaluation pour mettre en œuvre les actions requises le cas échéant.

## 2.2 INTERPRETATION STATISTIQUE DES RESULTATS QUANTITATIFS

L'analyse statistique des résultats s'appuie sur la norme ISO 13528:2015, relative aux « Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons inter-laboratoires ». La statistique de performance utilisée pour comparer les résultats des 16 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. L'interprétation des résultats se fait de la manière suivante :

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

Pour un analyste, la présence d'un « signal d'action » dans un cycle d'essais ou de deux « signaux d'avertissement » dans deux cycles successifs prouve l'existence d'une anomalie nécessitant des recherches pour comprendre et résoudre la source de l'anomalie. La justification de cette interprétation, c'est-à-dire des seuils  $\pm 2$  et  $\pm 3$ , 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 réplicas, afin de satisfaire à l'hypothèse de normalité. Les valeurs de

référence  $\bar{X}_s$  et  $\hat{\sigma}_s$ , ainsi que les scores  $z$  ont été calculés à partir de la moyenne, sur les trois réplicas, des données transformées.

Lorsqu'un résultat est manquant pour un réplica ou que la valeur 0 a été renseignée, la valeur 1 est utilisée pour la transformation logarithmique. Cette valeur pénalisante permet de pointer les cas de valeur manquante et d'en discuter afin d'améliorer la cause de ces omissions. Les valeurs nulles renseignées pour *A. sanguinea*, ont été prises en compte dans le calcul des valeurs assignées, car il s'agit d'une valeur possible étant donné la faible concentration de cette espèce. Dans les autres cas, les valeurs manquantes ne sont pas prises en compte pour le calcul des valeurs assignées.

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

En se basant sur la norme 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 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.

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 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, 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. A l'image de ce qui est fait dans le rapport de Salas et Larsen (2017), il a été considéré que la moyenne obtenue dans le cadre des tests d'homogénéité est une valeur de référence fiable et elle a donc été utilisée en tant que valeur de référence.

## 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 soulignés.

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-gras)

| CODE<br>Labo-<br>Analyste | 1er réplica            |                     |                 |                                        |                                       |                                        | 2ème réplica           |                     |                 |                                        |                                       |                                        | 3ème réplica           |                     |                 |                                        |                                       |                                        |
|---------------------------|------------------------|---------------------|-----------------|----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|---------------------|-----------------|----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|---------------------|-----------------|----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|
|                           | Volume<br>cuve<br>(ml) | Date<br>décantation | Date<br>analyse | Délai<br>récep.-<br>décant.<br>(jours) | Délai<br>décant.-<br>anal.<br>(jours) | Délai<br>récep.-<br>analyse<br>(jours) | Volume<br>cuve<br>(ml) | Date<br>décantation | Date<br>analyse | Délai<br>récep.-<br>décant.<br>(jours) | Délai<br>décant.-<br>anal.<br>(jours) | Délai<br>récep.-<br>analyse<br>(jours) | Volume<br>cuve<br>(ml) | Date<br>décantation | Date<br>analyse | Délai<br>récep.-<br>décant.<br>(jours) | Délai<br>décant.-<br>anal.<br>(jours) | Délai<br>récep.-<br>analyse<br>(jours) |
| <b><u>A-37</u></b>        | 25                     | 08/06/2017          | 29/06/2017      | 0                                      | 21                                    | 21                                     | 25                     | 08/06/2017          | 27/06/2017      | 0                                      | 19                                    | 19                                     | 25                     | 08/06/2017          | 20/06/2017      | 0                                      | 12                                    | 12                                     |
| <b><u>B-64</u></b>        | 25                     | 21/06/2017          | 22/06/2017      | 13                                     | 1                                     | 14                                     | 25                     | 22/06/2017          | 23/06/2017      | 14                                     | 1                                     | 15                                     | 25                     | 27/06/2017          | 28/06/2017      | 19                                     | 1                                     | 20                                     |
| B-91                      | 25                     | 21/06/2017          | 23/06/2017      | 13                                     | 2                                     | 15                                     | 25                     | 23/06/2017          | 26/06/2017      | 15                                     | 3                                     | 18                                     | 25                     | 27/06/2017          | 29/06/2017      | 19                                     | 2                                     | 21                                     |
| <b><u>C-16</u></b>        | 20                     | 15/06/2017          | 16/06/2017      | 7                                      | 1                                     | 8                                      | 20                     | 12/06/2017          | 14/06/2017      | 4                                      | 2                                     | 6                                      | 20                     | 14/06/2017          | 15/06/2017      | 6                                      | 1                                     | 7                                      |
| C-92                      | 20                     | 12/06/2017          | 13/06/2017      | 4                                      | 1                                     | 5                                      | 20                     | 12/06/2017          | 15/06/2017      | 4                                      | 3                                     | 7                                      | 20                     | 05/07/2017          | 06/07/2017      | 27                                     | 1                                     | 28                                     |
| C-93                      | 20                     | 12/06/2017          | 15/06/2017      | 4                                      | 3                                     | 7                                      | 20                     | 12/06/2017          | 13/06/2017      | 4                                      | 1                                     | 5                                      | 20                     | 14/06/2017          | 16/06/2017      | 6                                      | 2                                     | 8                                      |
| <b><u>D-41</u></b>        | 25                     | 26/06/2017          | 27/06/2017      | 18                                     | 1                                     | 19                                     | 25                     | 28/06/2017          | 29/06/2017      | 20                                     | 1                                     | 21                                     | 25                     | 30/06/2017          | 03/07/2017      | 22                                     | 3                                     | 25                                     |
| <b><u>E-48</u></b>        | 10                     | 06/07/2017          | 07/07/2017      | 28                                     | 1                                     | 29                                     | 10                     | 03/07/2017          | 07/07/2017      | 25                                     | 4                                     | 29                                     | 10                     | 06/07/2017          | 07/07/2017      | 28                                     | 1                                     | 29                                     |
| F-94                      | 25                     | 15/06/2017          | 16/06/2017      | 7                                      | 1                                     | 8                                      | 25                     | 15/06/2017          | 16/06/2017      | 7                                      | 1                                     | 8                                      | 25                     | 15/06/2017          | 16/06/2017      | 7                                      | 1                                     | 8                                      |
| <b><u>F-21</u></b>        | 25                     | 15/06/2017          | 16/06/2017      | 7                                      | 1                                     | 8                                      | 25                     | 15/06/2017          | 16/06/2017      | 7                                      | 1                                     | 8                                      | 25                     | 15/06/2017          | 16/06/2017      | 7                                      | 1                                     | 8                                      |
| <b><u>G-90</u></b>        | 25                     | 08/06/2017          | 09/06/2017      | 0                                      | 1                                     | 1                                      | 25                     | 20/06/2017          | 21/06/2017      | 12                                     | 1                                     | 13                                     | 25                     | 20/06/2017          | 21/06/2017      | 12                                     | 1                                     | 13                                     |
| G-95                      | 25                     | 08/06/2017          | 10/07/2017      | 0                                      | 32                                    | 32                                     | 25                     | 20/06/2017          | 12/07/2017      | 12                                     | 22                                    | 34                                     | 25                     | 20/06/2017          | 18/07/2017      | 12                                     | 28                                    | 40                                     |
| G-96                      | 25                     | 08/06/2017          | 15/09/2017      | 0                                      | 97                                    | 97                                     | 25                     | 20/06/2017          | 15/09/2017      | 12                                     | 85                                    | 97                                     | 25                     | 20/06/2017          | 15/09/2017      | 12                                     | 85                                    | 97                                     |
| H-97                      | 25                     | 27/06/2017          | 29/06/2017      | 19                                     | 2                                     | 21                                     | 25                     | 29/06/2017          | 30/06/2017      | 21                                     | 1                                     | 22                                     | 25                     | 30/06/2017          | 03/07/2017      | 22                                     | 3                                     | 25                                     |
| <b><u>H-71</u></b>        | 10                     | 19/06/2017          | 20/06/2017      | 11                                     | 1                                     | 12                                     | 10                     | 19/06/2017          | 20/06/2017      | 11                                     | 1                                     | 12                                     | 10                     | 20/06/2017          | 21/06/2017      | 12                                     | 1                                     | 13                                     |
| <b><u>I-9</u></b>         | 25                     | 19/06/2017          | 20/06/2017      | 11                                     | 1                                     | 12                                     | 25                     | 19/06/2017          | 20/06/2017      | 11                                     | 1                                     | 12                                     | 25                     | 19/06/2017          | 20/06/2017      | 11                                     | 1                                     | 12                                     |

Dans les instructions de l'IPI (cf. ANNEXE II), il est conseillé d'utiliser des cuves d'un volume de 25 ml si possible, afin de diminuer au mieux l'incertitude sur la mesure. La majorité des participants a utilisé des cuves de 20 ou 25 ml. Seuls les analystes E-48 et H-71 ont utilisé des cuves de 10 ml.

Concernant les délais d'analyse, deux durées sont à prendre en considération : (i) le délai entre la réception des échantillons et la préparation des cuves à décanter ; (ii) le délai entre la préparation des cuves et l'analyse au microscope. Ces délais apportent des informations sur les causes possibles d'une éventuelle dégradation des échantillons. Les recommandations de la norme NF EN 15204 (2006) pour assurer une bonne conservation sont les suivantes : « Il convient de stocker les échantillons conservés avec la solution de lugol à l'obscurité et de les refroidir de 1°C à 5°C, à moins qu'ils soient analysés sous trois semaines, auquel cas il est possible de les stocker à température ambiante ».

Quatre cuves sur 48 ont été préparées dans un délai supérieur à trois semaines par rapport à la date de réception des échantillons et cela concerne deux analystes (C-92 pour une cuve et E-48 pour trois cuves).

Un seul analyste (G-96), avec un délai d'analyse de 97 jours, a dépassé le délai maximum de 85 jours pour réaliser les analyses.

Ces faits ne préjugent pas d'une mauvaise conservation des échantillons, si dans l'intervalle, les conditions optimales de stockage ont été respectées.



## 3.2 RESULTATS QUALITATIFS

### Composition spécifique de référence

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

***Akashiwo sanguinea*** (K.Hirasaka) G.Hansen & Ø.Moestrup, 2000

***Azadinium spinosum*** Elbrächter & Tillmann, 2009

***Cylindrotheca closterium*** (Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin, 1964

***Chaetoceros curvisetus*** Cleve, 1889

***Chaetoceros danicus*** Cleve, 1889

***Prorocentrum*** sp.

***Pseudo-nitzschia pungens*** (Grunow ex Cleve) G.R.Hasle, 1993

***Scrippsiella trochoidea*** (Stein) Loeblich III, 1976,

***Trieres chinensis*** (Greville) M.P.Ashworth & E.C.Theriot, 2013

Concernant l'espèce de *Prorocentrum*, nous avons rapportés nos doutes quant à son identification à l'organisateur de l'IPI, Rafaele Salas. Il en a tenu compte et a poursuivi des investigations spécifiques sur ces cellules dans le cadre du workshop qui s'est tenu en novembre à Copenhague. Lors de cet atelier, les participants ont observé les cellules par épifluorescence et ont conclu que cette culture n'appartenait ni à *P. mexicanum*, ni à *P. lima*. De nouvelles investigations sont en cours en utilisant les techniques de séquençage et de microscopie électronique.

### 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 il empêche les identifications 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 soulignés. Les identifications attendues sont indiquées en têtes de colonnes. La mention « NO » signifie « Non Observé », c'est-à-dire qu'aucune cellule de cette espèce n'a été détectée. La case est colorée en vert lorsque l'identification au niveau de l'espèce ou du groupe d'espèces est correcte, en bleu lorsque l'identification est correcte au niveau du genre et en rouge lorsque l'identification est incorrecte au niveau du genre ou que le taxon n'a pas été détecté.

Tableau 2 : Résultats qualitatifs par analyste – Taxa identifiés

| Code Labo-Analyste | <i>Akashiwo sanguinea</i> | <i>Azadinium spinosum</i>        | <i>Cylindrotheca closterium</i> | <i>Chaetoceros curvisetus</i> | <i>Chaetoceros danicus</i> | <i>Prorocentrum</i> sp.      | <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>              | <i>Scrippsiella trochoidea</i> | <i>Trieres chinensis</i> |
|--------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| <b>A-37</b>        |                           | <i>Azadinium/Heterocapsa</i> sp. |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum aporum</i>   | <i>Pseudo-nitzschia multiseriata</i>         | <i>Scrippsiella</i> sp.        |                          |
| <b>B-64</b>        |                           | <i>Azadinium/Heterocapsa</i> sp. |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>              |                                |                          |
| <b>B-91</b>        |                           | <i>Azadinium/Heterocapsa</i> sp. |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>              |                                |                          |
| <b>C-16</b>        |                           | <i>Azadinium</i> sp.             |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia pungens+multiseriata</i> | <i>Scrippsiella</i> sp.        |                          |
| <b>C-92</b>        |                           | <i>Azadinium</i> sp.             |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia pungens+multiseriata</i> | <i>Scrippsiella</i> sp.        |                          |
| <b>C-93</b>        |                           | <i>Azadinium</i> sp.             |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia pungens+multiseriata</i> | <i>Scrippsiella</i> sp.        |                          |
| <b>D-41</b>        |                           | <i>Azadinium spinosum</i>        |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia seriata complex</i>      |                                |                          |
| <b>E-48</b>        |                           | <i>Azadinium spinosum</i>        |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia seriata complex</i>      | <i>Scrippsiella</i> sp.        |                          |
| <b>F-21</b>        |                           | <i>Azadinium spinosum</i>        |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>              |                                |                          |
| <b>F-94</b>        |                           | <i>Azadinium spinosum</i>        |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia multiseriata</i>         |                                |                          |
| <b>G-90</b>        |                           | <i>Azadinium/Heterocapsa</i> sp. |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>              | <i>Scrippsiella</i> sp.        |                          |
| <b>G-95</b>        |                           | <i>Azadinium/Heterocapsa</i> sp. |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>              | <i>Scrippsiella</i> sp.        |                          |
| <b>G-96</b>        |                           | <i>Azadinium/Heterocapsa</i> sp. |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>              | <i>Scrippsiella</i> sp.        |                          |
| <b>H-71</b>        |                           | <i>Azadinium spinosum</i>        |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum cordatum</i> | <i>Pseudo-nitzschia australis</i>            |                                |                          |
| <b>H-97</b>        |                           | <i>Azadinium spinosum</i>        |                                 |                               |                            | <i>Prorocentrum lima</i>     | <i>Pseudo-nitzschia seriata complex</i>      |                                |                          |
| <b>I-9</b>         |                           | <i>Karlodinium veneficum</i>     |                                 |                               |                            | NO                           | <i>Pseudo-nitzschia australis</i>            |                                | <i>Trieres regia</i>     |

## Légende

|    |                                    |
|----|------------------------------------|
|    | Espèce ou groupe d'espèces correct |
|    | Genre correct                      |
|    | Genre incorrect ou non observé     |
| NO | Non observé                        |
|    | Analyste inscrit à l'IPI (Galway)  |

Une majorité d'analystes a su reconnaître correctement les taxons au niveau de l'espèce ou groupe d'espèces avec 89.6 % d'identifications correctes. Les identifications correctes au niveau des genres ou espèces cumulées représentent 98.6 % des résultats.

---

### *Akashiwo sanguinea* (K.Hirasaka) G.Hansen & Ø.Moestrup, 2000

L'espèce *Akashiwo sanguinea* a été identifiée par tous les analystes.

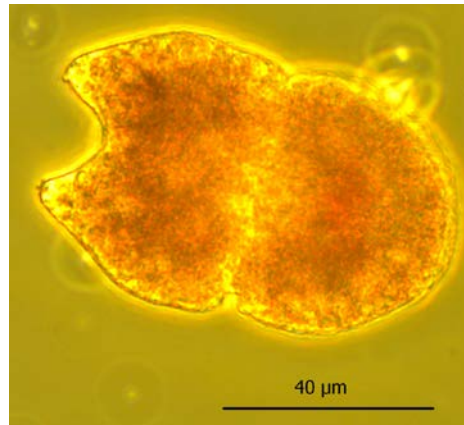


Photo 1 : *Akashiwo sanguinea* échantillon IPI 2017 - photo N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase).

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

Pour cette cellule, parmi les taxons proposés dans le tableau de rendu des résultats, la confusion était possible avec certains *Heterocapsa*. Le groupe de taxons *Azadinium/Heterocapsa* sp. était d'ailleurs proposé. Nous considérons donc les réponses suivantes comme correctes : *Azadinium spinosum*, *Azadinium* sp. et *Azadinium/Heterocapsa* sp.

A noter que dans le rapport PHY-ICN-17-MI1 VR 1.0, les auteurs précisent : « Nous nous attendions à des difficultés pour l'identification d'*A. spinosum* car il s'agit d'un très petit dinoflagellé et très similaire à d'autres espèces du genre *Amphidoma* et *Heterocapsa*. Les résultats suggèrent que c'est le cas avec 36 % identification *Azadinium / Heterocapsa*, 26 % *A. spinosum*, 14 % *Azadinium* et 17 % comme diverses espèces d'*Heterocapsa*. Chacune de ces identifications a été acceptée comme correcte ».

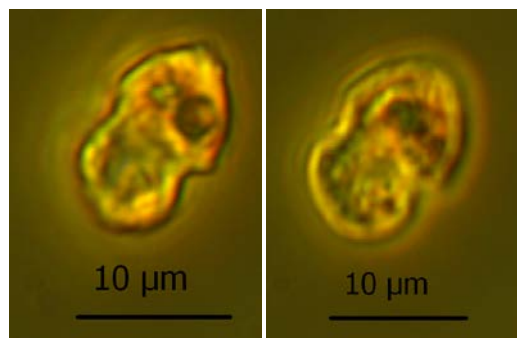


Photo 2 : *Azadinium spinosum* échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)

La difficulté majeure avec les cellules des échantillons de l'essai, est la visualisation de l'épine antapicale d'*A. spinosum* (invisible sur les Photo 2).

Seul l'analyste I-9 a identifié un autre genre avec *Karlodinium veneficum*.

*Karlodinium*, *Azadinium* et *Heterocapsa* sont trois genres qu'il est très difficile de distinguer en microscopie optique photonique. Il est toutefois nécessaire de distinguer *Karlodinium* qui est un Dinoflagellés nu (ne portant pas de thèque), des deux autres genres qui sont des Dinoflagellés cuirassés.

L'épi-fluorescence est une technique qui permet l'observation plus en détail des thèques et de noter la tabulation, comme on peut le voir sur la Photo 3, ce qui est indispensable à une identification des dinoflagellés cuirassés au niveau spécifique. En l'absence de thèque les cellules sont invisibles.

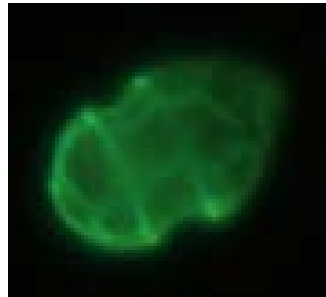


Photo 3 : *Azadinium spinosum* échantillon IPI 2017 - photo Aurore Lejolviet Ifremer LERBN (microscope optique à épifluorescence).

---

### *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin, 1964

Cette espèce a été correctement identifiée par tous les analystes.

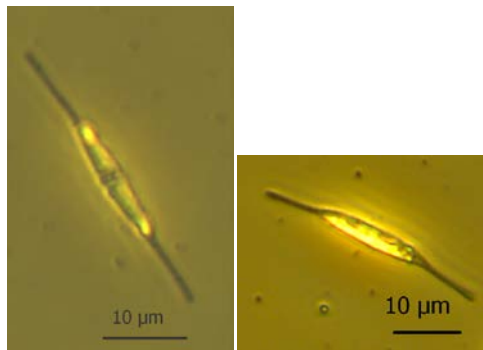


Photo 4 : *Cylindrotheca closterium* échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)

Les cellules sont solitaires et portent deux chloroplastes. Les valves sont fusiformes aux extrémités finement allongées en spirale, droites ou légèrement courbées et portant un nodule central visible. Les stries sont imperceptibles en microscopie optique. La taille peut varier de 10 à 30 µm de longueur.

## *Chaetoceros curvisetus* Cleve, 1889

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

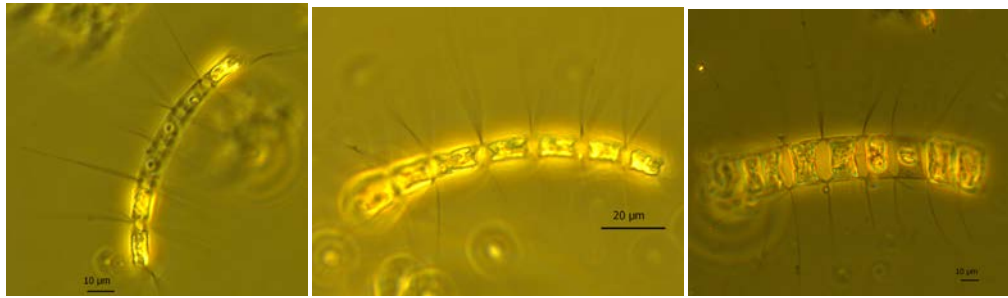


Photo 5 : *Chaetoceros curvisetus* échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)

*Chaetoceros curvisetus* et *C. debilis* faisaient partie des réponses proposées dans le tableau de rendu des résultats. Elles forment toutes les deux des chaînes incurvées.

Ces deux espèces proches morphologiquement peuvent être discriminées principalement par la forme de l'espace entre les cellules. Chez *Chaetoceros curvisetus* l'espace 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.

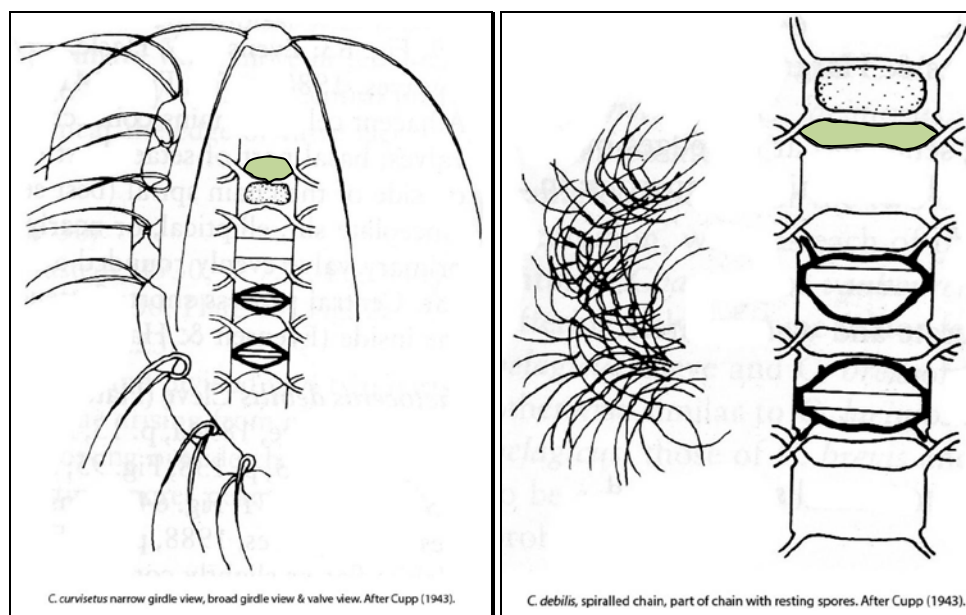


Figure 1 : Planches *Chaetoceros curvisetus* et *C. debilis*  
in Tomas C. (Editor) 1997. Identifying Marine Phytoplankton. ISBN-13 978-0-12-693018-4. ISBN-10 0-12-693018-X

---

### *Chaetoceros danicus* Cleve, 1889

Cette espèce a été correctement identifiée par tous les analystes.

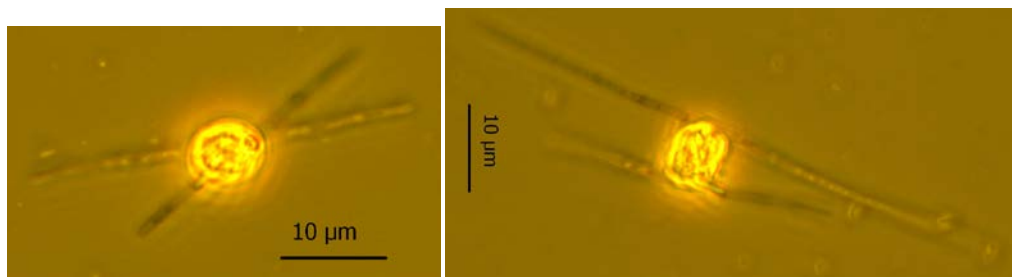


Photo 6 : *Chaetoceros danicus* échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)

Les cellules sont généralement solitaires ou en courtes chaînes de deux ou trois cellules. Elles sont rectangulaires 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 les soies (sous-genre *Chaetoceros*).

---

### *Prorocentrum* sp.

Le genre *Prorocentrum* a correctement été identifié par tous les analystes (avec une majorité d'identification de l'espèce *P. lima*), excepté l'analyste I-9 qui n'a pas fourni de résultat de dénombrement pour ce taxon.

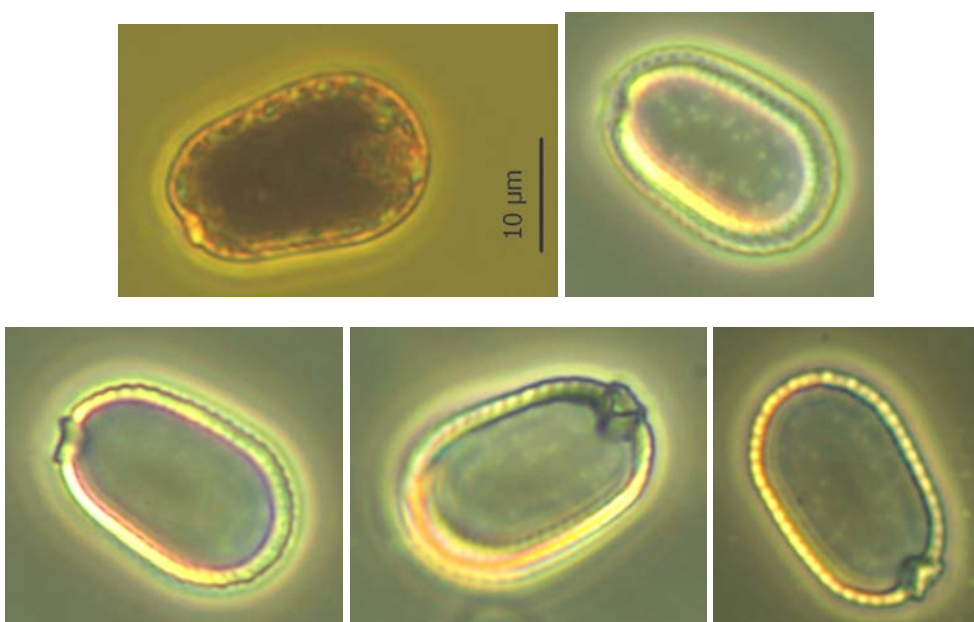


Photo 7 : *Prorocentrum* sp. échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase).

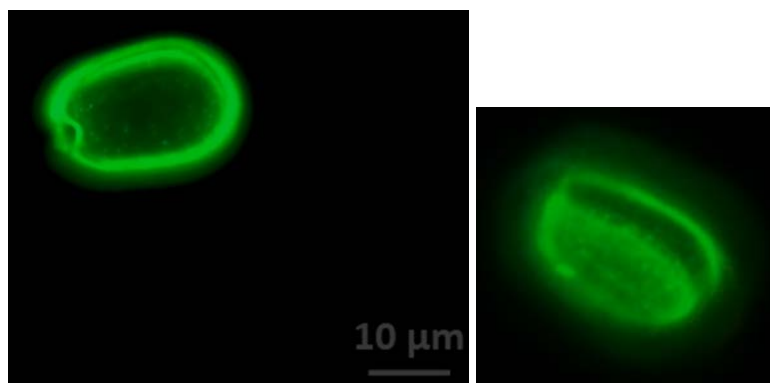


Photo 8 : *Prorocentrum* sp. échantillon IPI 2017 - photos Audrey Duval (microscope optique à épifluorescence).

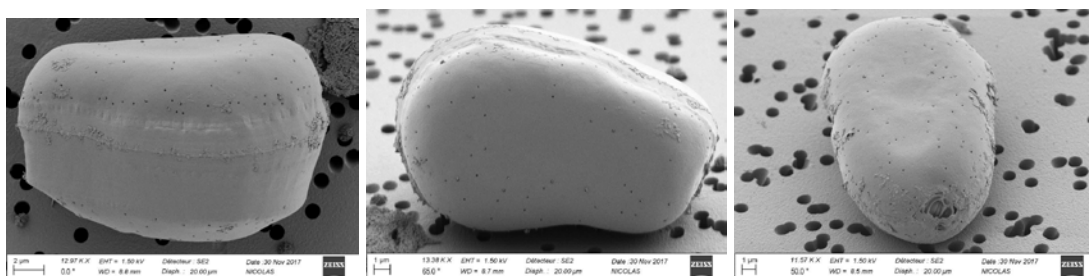


Photo 9 : *Prorocentrum* sp. échantillon IPI 2017 - photos Nicolas Chomérat (microscopie électronique à balayage)

Parmi la liste des espèces de *Prorocentrum* proposées dans le tableau de rendu des résultats, figuraient *P. lima* et *P. mexicanum* qui pouvaient être pressenties comme une identification correcte sans toutefois être très satisfaisante compte tenu de la faible taille (L : 20 µm, l : 14 µm), et de la répartition des pores sur les valves des cellules. En effet, l'absence de pores marginaux n'était pas compatible avec *P. lima*, et l'arrangement des pores ne formant pas de lignes radiales excluait *P. mexicanum* (Figure 2).

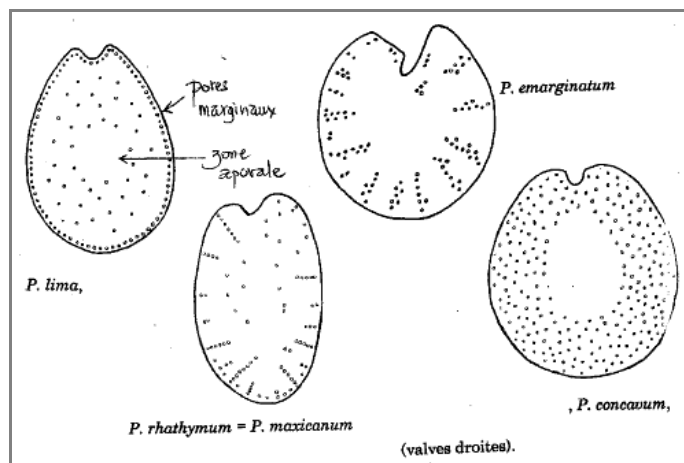
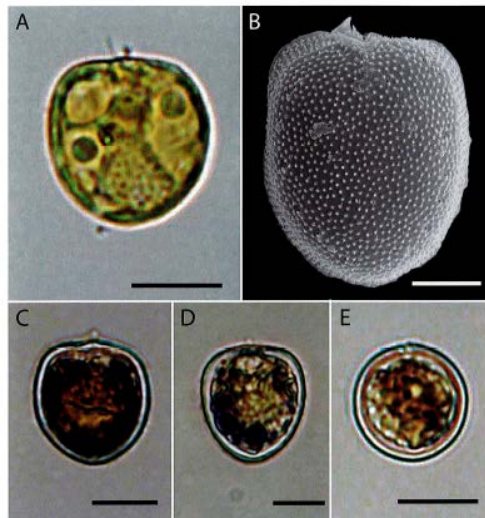


Figure 2 : Image extraite de l'ouvrage P. Lassus, fév 1992 – Stage phytoplancton.

Ces doutes ont été rapportés à l'organisateur de l'IPI, Rafaele Salas, qui en a tenu compte et a poursuivi des investigations spécifiques sur ces cellules dans le cadre du workshop qui s'est tenu en novembre à Copenhague. Lors de cet atelier, les participants ont observé les cellules par épifluorescence et ont conclu que cette culture n'appartenait ni à *P. mexicanum*, ni à *P. lima*. De nouvelles investigations sont en cours par le Marine Institute de Galway, utilisant les techniques de séquençage et de microscopie électronique.

L'espèce *Prorocentrum cordatum* proposée par l'analyste H-71 était à exclure. Comme on peut le voir sur les images suivantes, les valves de *P. cordatum* sont plus arrondies et sa taille est inférieure à celle des cellules de l'échantillon.





**Prorocentrum spp.**

A-D. *Prorocentrum cordatum*. A, C-E. Light micrographs. B. SEM micrograph. A. Live cell showing the round nucleus located posteriorly. B. Cell showing the valve surface. C-D. Two morphotypes (rounded and triangular) fixed with Lugol's solution. E. Cell of *Prorocentrum balticum* fixed with Lugol's solution and may be confused with *P. cordatum*. Scale bars: A, C-E: 10  $\mu$ m and B: 5  $\mu$ m.

A-D. *Prorocentrum cordatum*. A, C-E. Microphotographies photoniques. B. Microphotographie en MEB. A. Cellule non fixée montrant le noyau rond situé postérieurement. B. Cellule montrant la surface des valves. C-D. Deux morphotypes (arrondi et triangulaire) fixés au Lugol. E. Cellule de *Prorocentrum balticum* fixée au Lugol et qui peut être confondue avec *P. cordatum*. Barres d'échelle: A, C-E: 10  $\mu$ m et B: 5  $\mu$ m.

Photo 10 : *Prorocentrum cordatum* – In Lassus P. ; Chomérat N. ; Hess P. ; Nézan E. 2016. Toxic and Harmful Micro-algae of the World Ocean / Micro-algues toxiques et nuisibles de l'océan mondial. Denmark, International Society for the Study of Harmful Algae / Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. IOC Manuals and Guides, 68.

De même, l'espèce *Prorocentrum aporum* proposée par l'analyste A-37 était à exclure. Comme on peut le voir sur les images suivantes, les valves de *P. aporum* sont dépourvues de pore et sont plus arrondies.

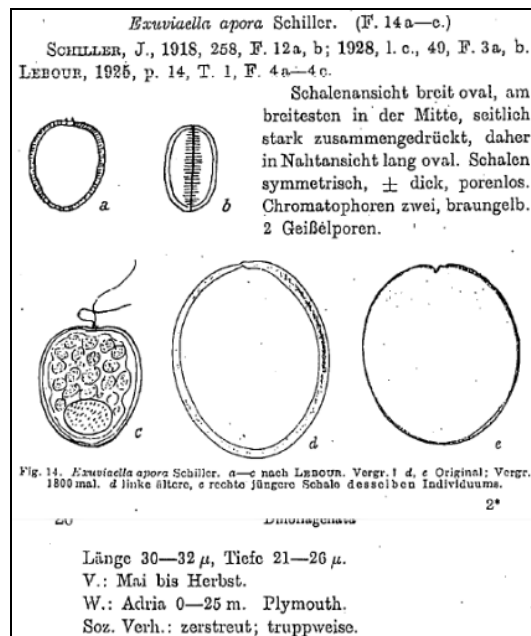


Figure 3 : Description de *Prorocentrum aporum* par Schiller (1918).



### *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex Cleve) G.R.Hasle, 1993

Parmi les espèces proposées, la confusion était possible entre : *Pseudo-nitzschia australis*, *P. fraudulenta*, *P. multiseriata*, *P. pungens* et *P. seriata* qui font toutes partie des *Pseudo-nitzschia* du complexe *seriata*. Ce choix de *P. seriata* complexe était d'ailleurs proposé.

Toutes ces réponses sont considérées comme correctes au niveau de l'espèce ou du groupe d'espèces, à l'exception de *P. australis* dont les caractères morphologiques permettaient de l'exclure (voir ci dessous). La réponse *P. australis* est toutefois considérée comme correcte au niveau du genre.

Certains analystes ont ajouté dans les commentaires de leurs résultats qu'ils avaient identifié *P. multiseriata* ou *P. pungens* sans différentiation possible comme indiqué dans le Tableau 2.

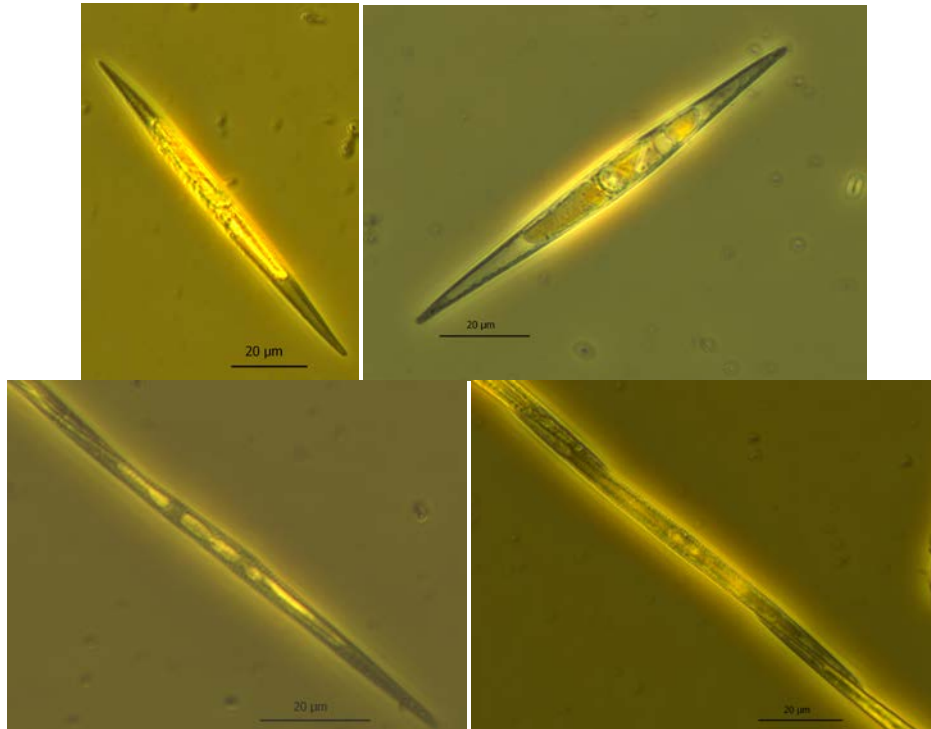


Photo 11 : *Pseudo-nitzschia pungens* échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)

Caractéristiques morphologiques des cellules dans l'échantillon : **Longueur : 100 à 108 µm**  
**Largeur : 4 à 8 µm**  
**Stries visibles**  
**Chevauchement 25 %**  
**Valves symétriques**

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

Les stries étant nettement visibles et les valves symétriques, seules les espèces *P. multiseriata* ou *P. pungens* correspondent aux cellules présentes dans les échantillons.

---

### *Scrippsiella trochoidea* (Stein) Loeblich III, 1976

Tous les analystes ont reconnu le genre *Scrippsiella*. Huit ont identifié correctement l'espèce *S. trochoidea*.

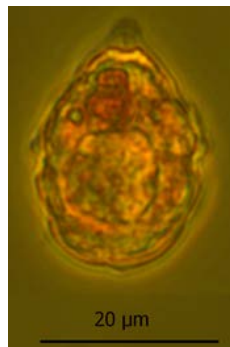


Photo 12 : *Scrippsiella trochoidea* échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)

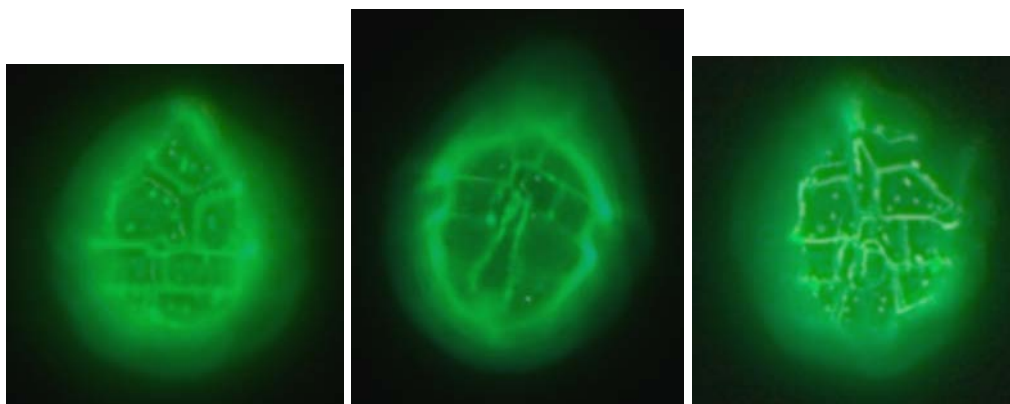
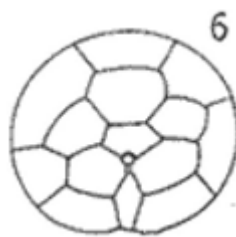
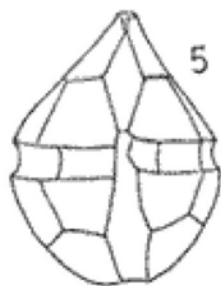


Photo 13 : *Scrippsiella trochoidea* échantillon IPI 2017 - photos Audrey Duval (microscope optique à épifluorescence)



*Scrippsiella trochoidea*  
after Balech, 1980.

Figure 4 : Schéma illustrant la tabulation de *Scrippsiella trochoidea*

Parmi les taxons proposés il était possible d'hésiter entre les espèces des trois genres *Ensiculifera*, *Pentapharsodinium* et *Scrippsiella*. Dans le cadre du REPHY les données sont renseignées sur le regroupement de ces trois genres, car leur distinction ne peut se faire qu'en observant leur tabulation, ce qui est bien plus aisément réalisable grâce à l'épifluorescence.

*Trieres sinensis* synonyme de *Trieres chinensis* (Greville) M.P.Ashworth & E.C.Theriot, 2013

Tous les analystes ont correctement identifié ce taxon au niveau de l'espèce, sauf l'analyste I-9 qui a identifié *Trieres regia*. Les trois réponses possibles proposées dans le tableau de rendu des résultats étaient : *Trieres mobiliensis*, *Trieres regia* et *Trieres sinensis*.

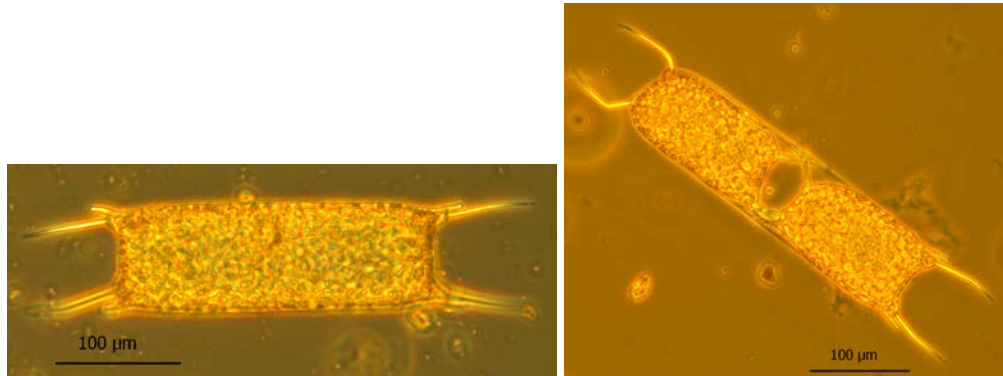


Photo 14 : *Trieres sinensis* échantillon IPI 2017 - photos N. Neaud Masson (microscope optique à contraste de phase)

Les cellules sont solitaires ou reliées par leurs processus en courtes chaînes. Les cellules sont en forme de coussin en vue cingulaire.

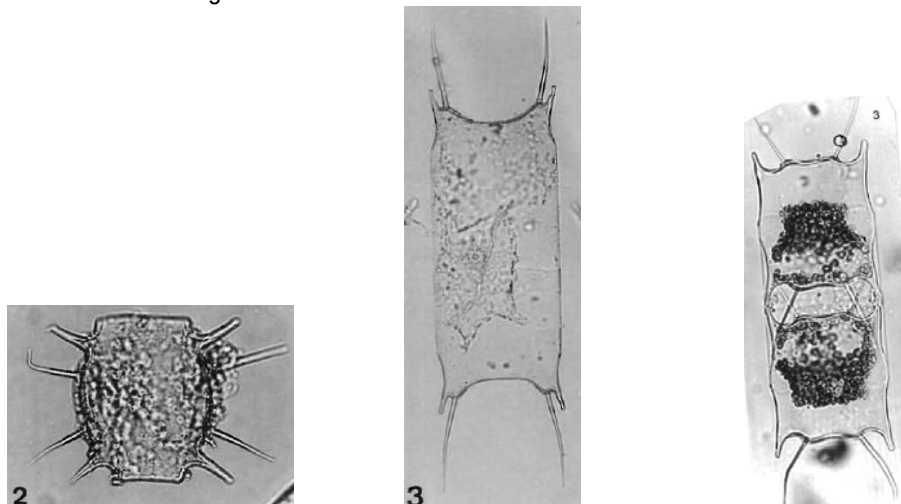


Photo 15 : *Trieres mobiliensis* *T. sinensis* *T. regia.*  
in Paulmier G., 1997. Atlas des diatomophycées des côtes françaises et des aires océaniques adjacentes.  
Rapport interne IFREMER/DRV/RH/97-014, 148 pp. (planches 53 et 55)

Alors qu'il est très difficile de différencier *Trieres regia* de *T. mobiliensis*, *T. sinensis* se distingue par le fait que ses épines sont beaucoup plus rapprochées des processus. De plus, les cellules de *T. sinensis* sont plus larges et plus longues.

### 3.3 RESULTATS DES TESTS D'HOMOGENEITE ET DE STABILITE

Les résultats des tests d'homogénéité et de stabilité sont résumés dans le Tableau 4. Leur implication sur les résultats de « l'essai Ifremer » est également exposée

Tableau 4 : 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>       | Fail   | Pass                  | Pass                         | Pass                 | Pass                        |
| <i>Azadinium spinosum</i>       | Fail   | Fail                  | Fail                         | Fail                 | Pass                        |
| <i>Cylindrotheca closterium</i> | Fail   | Fail                  | Fail                         | Fail                 | Pass                        |
| <i>Chaetoceros curvisetus</i>   | Pass   | Pass                  | Pass                         | Fail                 | Pass                        |
| <i>Chaetoceros danicus</i>      | Pass   | Pass                  | Pass                         | Pass                 | Pass                        |
| <i>Prorocentrum</i> sp.         | Fail   | Fail                  | Fail                         | Pass                 | Pass                        |
| <i>Pseudo-nitzschia pungens</i> | Pass   | Fail                  | Pass                         | Pass                 | Pass                        |
| <i>Scrippsiella Trochoidea</i>  | Fail   | Fail                  | Fail                         | Fail                 | Fail                        |
| <i>Trieres chinensis</i>        | Pass   | Pass                  | Pass                         | Fail                 | Pass                        |

#### HOMOGENEITE

Les trois critères sont remplis pour les espèces *Chaetoceros curvisetus*, *Chaetoceros danicus* et *Trieres chinensis*. Les échantillons sont donc considérés comme homogènes pour ces trois espèces.

L'analyse de variance (F-test) met en évidence une différence significative entre les échantillons pour les espèces *Akashiwo sanguinea*, *Azadinium spinosum*, *Cylindrotheca closterium*, *Prorocentrum* sp. et *Scrippsiella trochoidea*. Cependant, pour l'espèce *A. sanguinea*, 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 cette espèce. *A contrario*, pour les espèces *A. spinosum*, *C. closterium*, *Prorocentrum* sp. et *S. trochoidea*, ni le critère d'homogénéité ni le critère étendu ne sont remplis. Les échantillons ne sont donc pas considérés comme homogènes pour ces quatre taxons.

Enfin, aucune différence significative entre les échantillons n'est mise en évidence par l'analyse de variance pour *P. pungens*. Pour cette espèce, la variance inter-échantillons contribue à plus de 10 % de la variance pour l'évaluation des performances mais le critère étendu est rempli. Il s'agit d'ailleurs de l'espèce pour laquelle l'écart-type pour l'évaluation des performances est le plus faible (Tableau 5). D'après la norme ISO 17043 citée par Salas et Larsen (2017), dans ces cas-là, il faut s'assurer que l'incertitude des valeurs assignées ou que l'évaluation des résultats prend en compte cela. L'incertitude des valeurs assignées a donc été calculée selon la formule présente dans la norme ISO 13528:2015 :

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

Si cette valeur est strictement inférieure à 30 % de  $\hat{\sigma}_s$ , alors l'incertitude de la valeur assignée est considérée comme négligeable. Cela revient à dire qu'il faut au minimum 18 participants, ce qui n'est pas le cas dans le présent exercice. Par conséquent, l'incertitude de la valeur assignée n'est négligeable pour aucun des taxons (Tableau 5). Ces résultats devront être pris en compte lors de l'interprétation des scores z.

**Tableau 5 : Valeurs pour chaque espèce 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. closterium</i> | <i>C. curvisetus</i> | <i>C. danicus</i> | <i>Pror. sp.</i> | <i>P.-n. pungens</i> | <i>S. trochoidea</i> | <i>T. chinensis</i> |
|-----------------------------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|----------------------|-------------------|------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| $X_s$ ( $\log_{10}$ )                         | <b>1.754</b>        | <b>3.376</b>       | <b>3.468</b>         | <b>4.452</b>         | <b>3.878</b>      | <b>3.16</b>      | <b>4.425</b>         | <b>3.363</b>         | <b>3.509</b>        |
| $\hat{\sigma}_s$ ( $\log_{10}$ )              | <b>0.488</b>        | <b>0.177</b>       | <b>0.176</b>         | <b>0.159</b>         | <b>0.164</b>      | <b>0.134</b>     | <b>0.037</b>         | <b>0.082</b>         | <b>0.055</b>        |
| $p$                                           | <b>16</b>           | <b>16</b>          | <b>16</b>            | <b>16</b>            | <b>16</b>         | <b>16</b>        | <b>16</b>            | <b>16</b>            | <b>16</b>           |
| $u(X_s)$                                      | 0.153               | 0.055              | 0.055                | 0.050                | 0.051             | 0.042            | 0.012                | 0.026                | 0.017               |
| Impact de l'incertitude de la valeur assignée | non néglig.         | non néglig.        | non néglig.          | non néglig.          | non néglig.       | non néglig.      | non néglig.          | non néglig.          | non néglig.         |

Selon la norme 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  $\hat{\sigma}'_s = \sqrt{(\hat{\sigma}_s)^2 + (s_s)^2}$ . Il est également précisé que « lorsque  $\hat{\sigma}_s$  est l'écart-type robuste des résultats du participant, alors l'inhomogénéité entre les entités soumises à l'essai d'aptitude est incluse dans  $\hat{\sigma}_s$  et le critère d'acceptabilité de l'homogénéité peut être assoupli, mais avec précaution ». Cependant, étant donné les incertitudes sur les valeurs assignées, il a été décidé de remplacer  $\hat{\sigma}_s$  par  $\hat{\sigma}'_s$  dans le calcul des scores  $z$  (cf. équation de la section 2.3) pour les espèces *A. spinosum*, *C. closterium*, *Prorocentrum* sp., *P.-n. pungens* et *S. trochoidea*.

## STABILITE

Les deux critères sont remplis pour les taxons *A. sanguinea*, *C. danicus*, *Pror. sp.* et *P.-n. pungens*. Les échantillons sont donc considérés comme stables pour ces quatre taxons.

Aucun des critères n'est rempli pour l'espèce *S. trochoidea*. Les échantillons sont donc considérés comme non stables pour cette espèce.

Seul le critère étendu est rempli pour les espèces *A. spinosum*, *C. Closterium*, *C. curvisetus* et *T. chinensis*. Cependant, les échantillons pour les espèces *A. spinosum* et *C. Closterium* ne sont pas considérés comme homogènes, ce qui pourrait avoir une influence sur le résultat du test de stabilité. Pour ces deux espèces, le critère de stabilité étendu étant rempli, les échantillons sont considérés comme stables. Pour les deux autres espèces, il faudra tenir compte de ces résultats lors de l'évaluation des participants.

## BIAIS

Il existe un possible biais pour les taxons *A. sanguinea*, *A. spinosum* et *Prorocentrum* sp. (Tableau 6).

**Tableau 6 : Valeurs pour chaque espèce de la différence entre la moyenne obtenue lors des tests d'homogénéité et la valeur assignée  $|X_{ref} - X_s|$ , de l'incertitude type de la différence  $u(X_{ref} - X_s)$  et résultat de la comparaison entre la différence et deux fois son incertitude type.**

|                                                  | <i>A. sanguinea</i> | <i>A. spinosum</i> | <i>C. closterium</i> | <i>C. curvisetus</i> | <i>C. danicus</i> | <i>P. sp.</i> | <i>P.-n. pungens</i> | <i>S. trochoidea</i> | <i>T. chinensis</i> |
|--------------------------------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| $ X_{ref} - X_s $                                | <b>1.443</b>        | <b>0.215</b>       | <b>0.063</b>         | <b>0.091</b>         | <b>0.106</b>      | <b>0.535</b>  | <b>0.029</b>         | <b>0.048</b>         | <b>0.014</b>        |
| $u(X_{ref} - X_s)$                               | <b>0.159</b>        | <b>0.078</b>       | <b>0.069</b>         | <b>0.052</b>         | <b>0.055</b>      | <b>0.048</b>  | <b>0.018</b>         | <b>0.034</b>         | <b>0.029</b>        |
| $ X_{ref} - X_s  \leq 2 \times u(X_{ref} - X_s)$ | NON                 | NON                | OUI                  | OUI                  | OUI               | NON           | OUI                  | OUI                  | OUI                 |

### **3.4 RESULTATS QUANTITATIFS DES PARTICIPANTS ET DISCUSSION**

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

Tous les scores  $z$ , calculés à partir des moyennes des  $\log_{10}$  des résultats obtenus par analyste et par taxon dénombré, sont consultables dans un tableau en ANNEXE III et représentés sur une figure globale en ANNEXE IV.

Sur les pages suivantes, pour chaque taxon, sont représentés dans la première figure, le score  $z$  de chaque analyste et, dans la seconde figure, les abondances dénombrées dans chaque réplica. Cette deuxième représentation permet d'explorer plus en détail les résultats et de décrire la répétabilité ou la fidélité des résultats par analyste et sur l'ensemble des résultats.

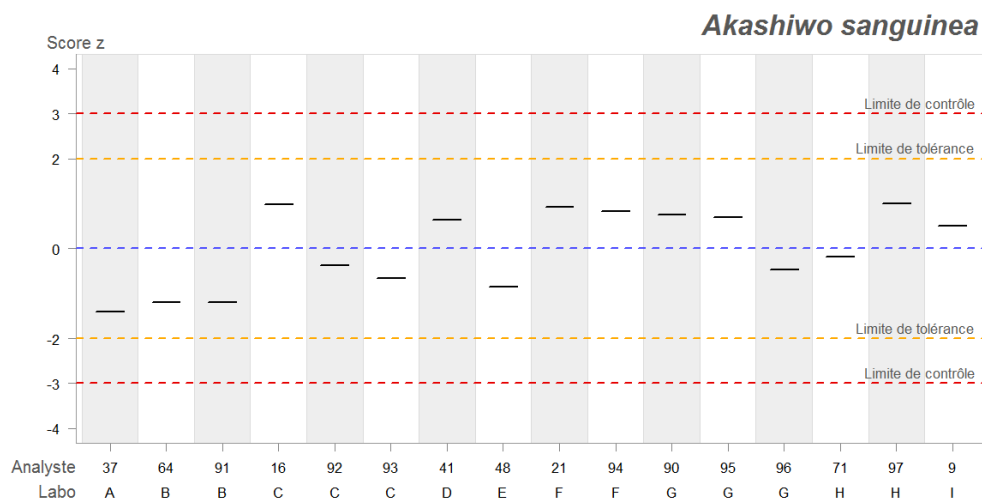


Figure 5 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des  $\log_{10}$  des résultats pour *Akashiwo sanguinea*.

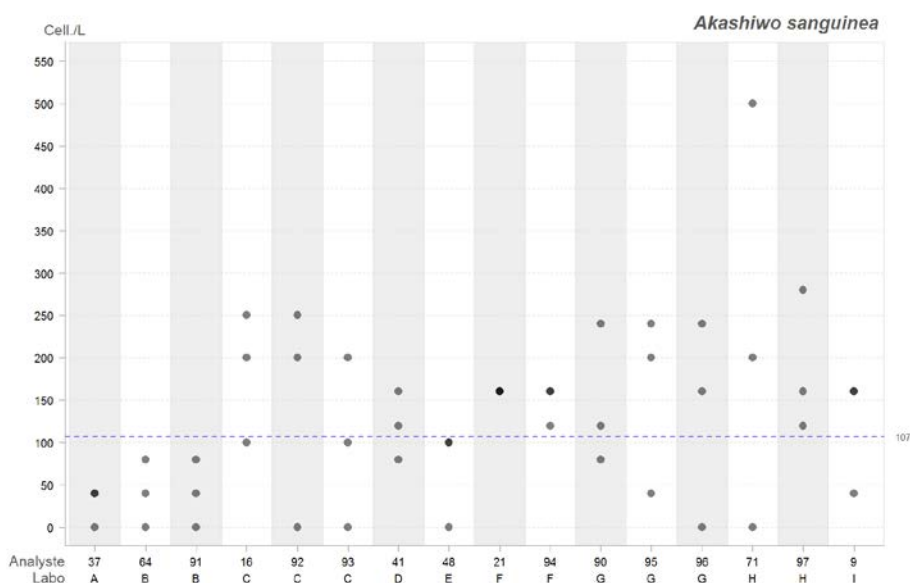


Figure 6 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Akashiwo sanguinea*.

Les tests réalisés ont permis de conclure à une homogénéité et une stabilité suffisante 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 une plus grande variabilité dans les résultats des trois réplicas de l'analyste H-71. Si on exclue l'abondance de 500 cell./L obtenue dans un seul réplica par l'analyste H-71, les abondances s'étendent entre 0 et un maximum de 280 cell./L. La valeur assignée, exprimée en nombre de cell./L, est de 107 cell./L. Ces faibles concentrations expliquent l'absence de cellule de ce taxon dans certaines cuves, c'est le cas pour l'un des réplicas pour huit des seize analystes. En revanche l'abondance de 500 cell./L peut résulter d'une mauvaise homogénéisation ou du fait que l'analyste a utilisé des cuves d'un volume de 10 mL.

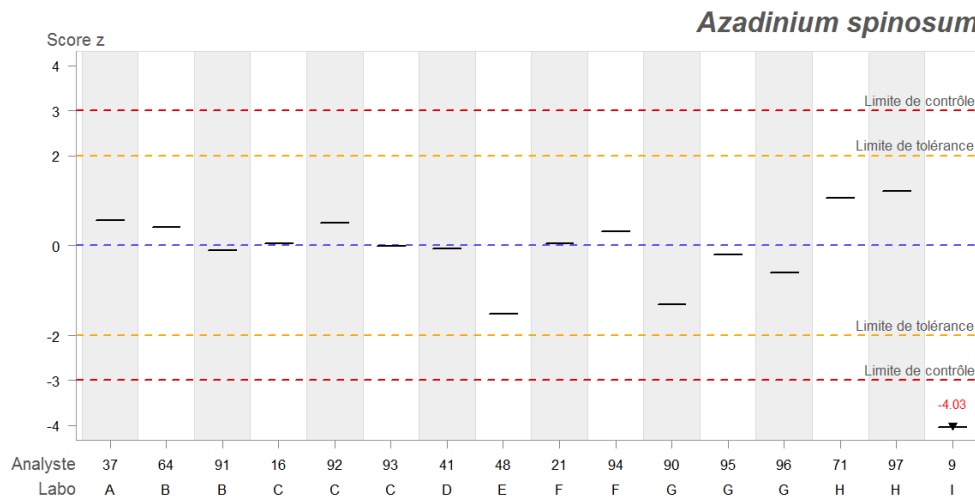


Figure 7 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des  $\log_{10}$  des résultats pour *Azadinium spinosum*.

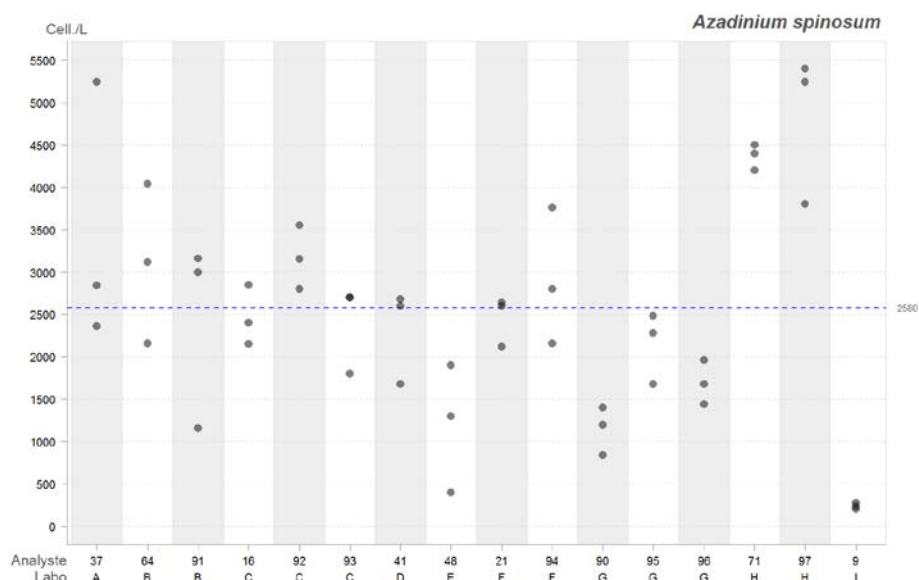


Figure 8 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Azadinium spinosum*.

Pour ce taxon, les résultats des tests d'homogénéité montrent une différence significative et non négligeable entre les échantillons. En conséquence, l'écart-type inter-échantillons a été inclus dans l'écart-type pour l'évaluation de l'aptitude lors du calcul des scores-z (cf. section 3.3).

Pour la majorité des analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement sauf pour l'analyste **I-9** dont le score z est inférieur à la limite de contrôle avec une valeur de -4.033, ce qui implique un signal d'action pour cet analyste.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 200 et un maximum de 5 400 cell./L. avec une moyenne de référence de 2 580 cell./L.

Pour l'analyste I-9 les abondances des trois réplicas sont très faibles et dix fois inférieures à la moyenne de référence. Compte-tenu des résultats des tests d'homogénéité et de stabilité pour ce taxon, ainsi que le faible nombre de participants, entraînant une incertitude non négligeable des valeurs assignées, dans ce cas, 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.



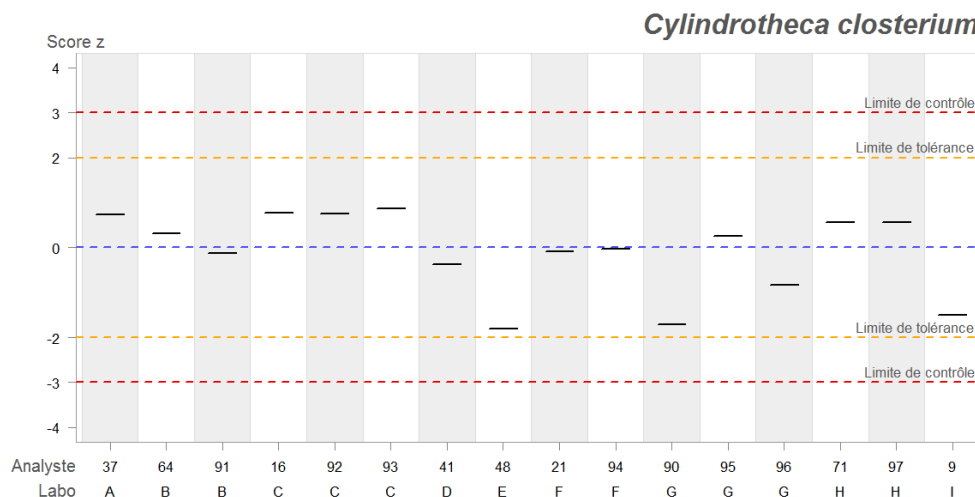


Figure 9 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des  $\log_{10}$  des résultats pour *Cylindrotheca closterium*.

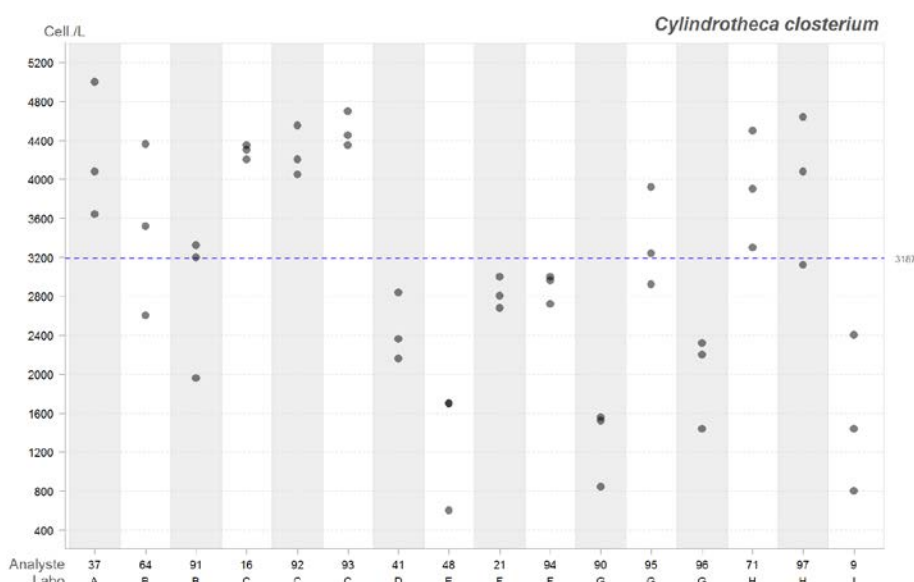


Figure 10 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Cylindrotheca closterium*.

Bien que les tests permettent de conclure sur une stabilité acceptable de ce taxon, les résultats des tests d'homogénéité montrent une différence significative et non négligeable entre les échantillons. En conséquence, pour l'évaluation de l'aptitude, l'écart-type inter-échantillons a été inclus dans le calcul des scores-z (cf. section 3.3).

Pour tous les analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 600 et un maximum de 5 000 cell./L., avec une moyenne de référence de 3 187 cell./L.

Pour chaque analyste, les résultats des trois réplicas sont plutôt peu variables, ce qui est contradictoire avec les résultats des tests d'homogénéité. On note, par ailleurs, que les plus faibles abondances sont obtenues par les analystes E-48, G-90 et I-9, ce qui est déjà le cas avec *Azadinium spinosum*.

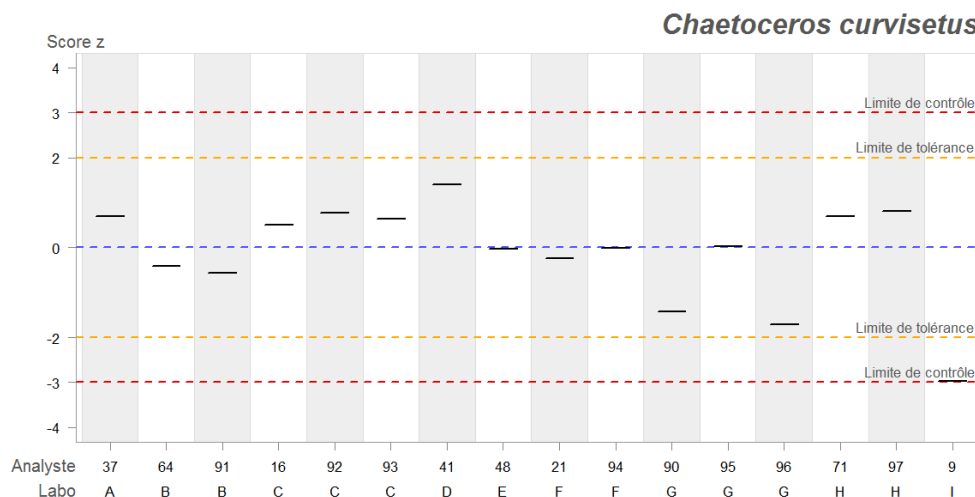


Figure 11 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des  $\log_{10}$  des résultats pour *Chaetoceros curvisetus*.

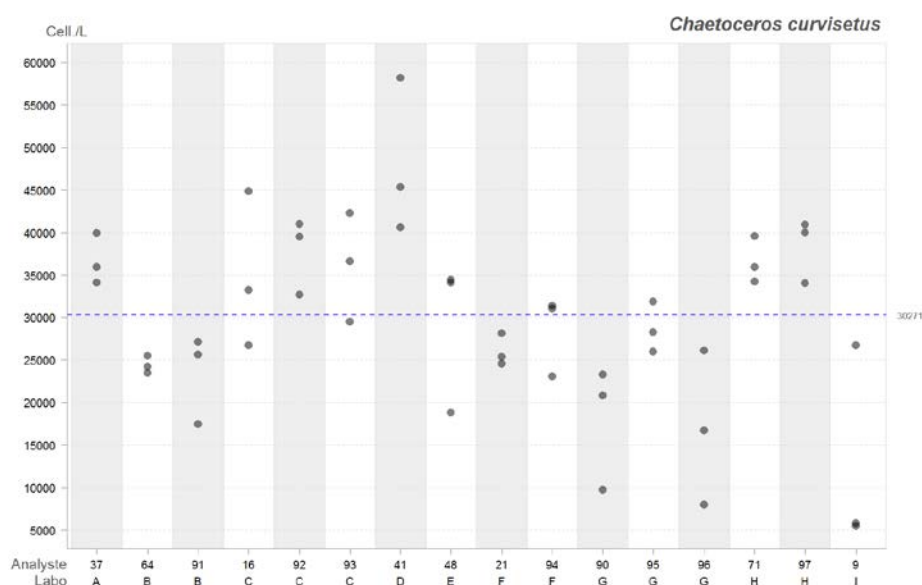


Figure 12 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour *Chaetoceros curvisetus*.

La plupart des scores z sont compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement pour les analystes sauf pour l'analyste **I-9** dont le score z, compris entre les limites basses de contrôle et de tolérance avec une valeur proche de -3, implique un signal d'avertissement pour cet analyste. Cette valeur basse du score z est due à des valeurs d'abondances très faibles pour deux des trois répliques, ce qui peut laisser supposer un problème d'homogénéisation.

On remarque aussi qu'un résultat sur les trois attendus des analystes G-90 et G-96 sont inférieurs à 10 000 cell./L. et que pour ces analystes les scores z sont bas.

La répartition des résultats d'abondances s'étend de 5 480 à 58 160 cell./L. avec une moyenne de 30 271 cell./L. Les résultats des tests ont permis de conclure à une homogénéité suffisante des échantillons pour ce taxon. Seul le critère étendu est rempli pour la stabilité mais cela n'explique pas les faibles valeurs dénombrées. Il peut être noté que cette variabilité des résultats est similaire à celle obtenue dans le cadre de l'IPI, dans lequel il est également observé une mauvaise répétabilité des dénombrements pour ce taxon par opérateur. Les explications sur la variabilité de ces résultats sont à trouver ailleurs. Elles peuvent provenir d'une mauvaise homogénéisation lors de la préparation des cuves, d'une dégradation des cellules pendant le stockage avant analyse ou d'une erreur de l'analyste au cours de la procédure d'acquisition des

résultats. L'espèce *Chaetoceros curvisetus* forme des chaînes incurvées de plusieurs cellules (jusqu'à plusieurs dizaines) et les cellules sont pourvues des soies. Cette morphologie peut conférer à cette espèce une tendance à l'agrégation au moment de l'homogénéisation des échantillons. De plus, le dénombrement de chaque cellule dans une chaîne ou un agglomérat de chaînes nécessite de faire varier la mise au point car toutes les cellules ne sont pas sur le même plan. Cette technique requiert une certaine expérience.

Lorsqu'on compare les résultats des dénombrements des analystes d'un même laboratoire, qui ont donc analysé le même lot d'échantillons, ceux-ci sont homogènes sauf pour le laboratoire G. Rappelons que les laboratoires ont reçu quatre répliques, et que chaque analyste a analysé trois des quatre répliques, soit en utilisant les mêmes cuves soit en effectuant chacun de nouvelles décantations. Ce dernier choix contribue à la variabilité des abondances obtenues.

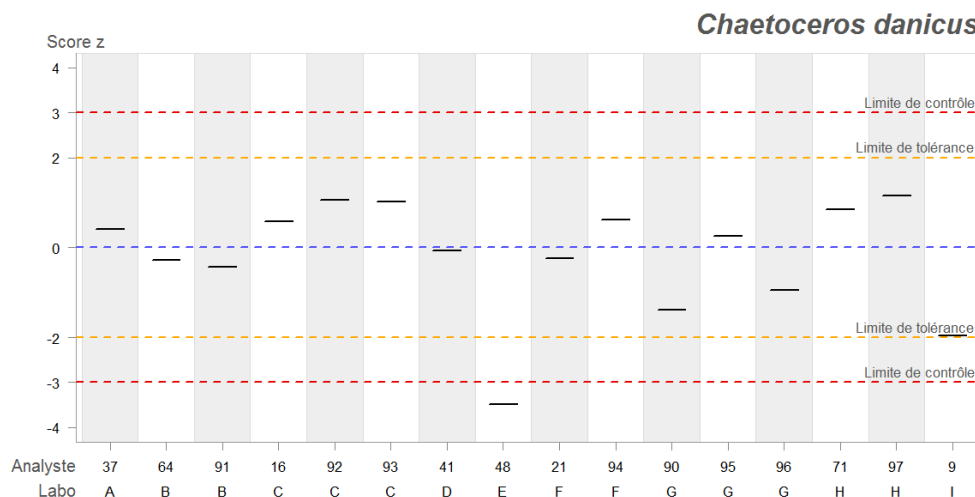


Figure 13 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des  $\log_{10}$  des résultats pour *Chaetoceros danicus*.

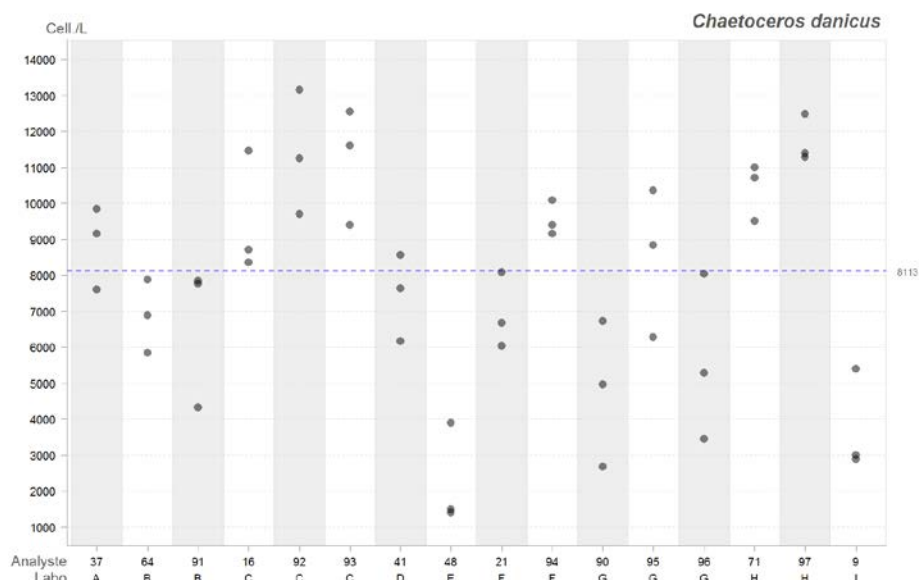


Figure 14 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour *Chaetoceros danicus*.

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

Pour la majorité des analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement sauf pour l'analyste **E-48**, dont le score z est inférieur à la limite basse de contrôle ce qui implique un signal d'action pour cet analyste.

Pour les analystes E-48 et I-9, tous les résultats des trois répliques sont inférieurs à la moyenne de référence avec deux résultats sur trois très inférieurs. Rappelons que l'analyste E-48 a utilisé des cuves d'un volume de 10 ml, ce qui n'est pas conseillé dans le cadre de cet exercice. Néanmoins, tous les autres scores z de l'analyste E-48 sont compris dans les limites de tolérance. Ce résultat est donc assez étonnant.

Il faut noter aussi que, dans le cadre de l'exercice international (IPI), les scores-z de ces deux analystes ne dépassent pas les limites de tolérance pour ce taxon.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 1 400 et un maximum de 13 158 cell./L. avec une moyenne de 8 113 cell./L.

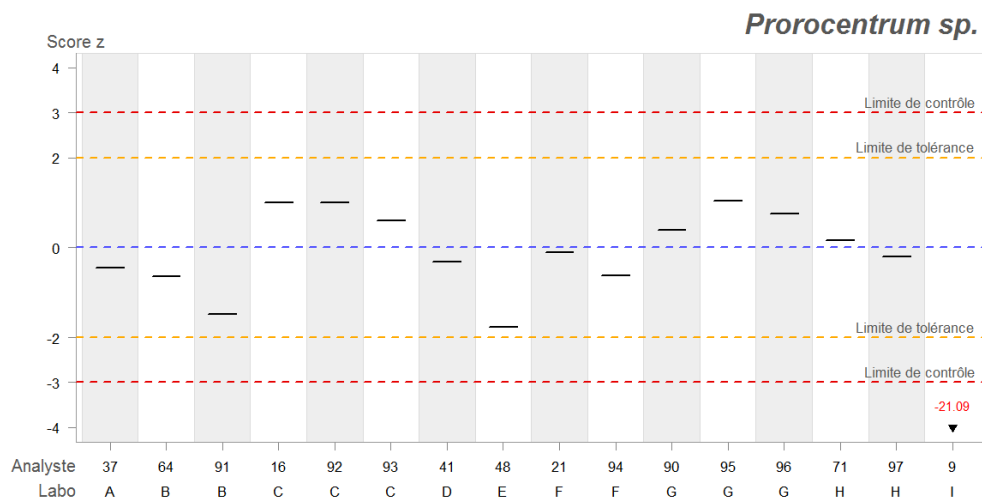


Figure 15 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des  $\log_{10}$  des résultats pour *Prorocentrum* sp..

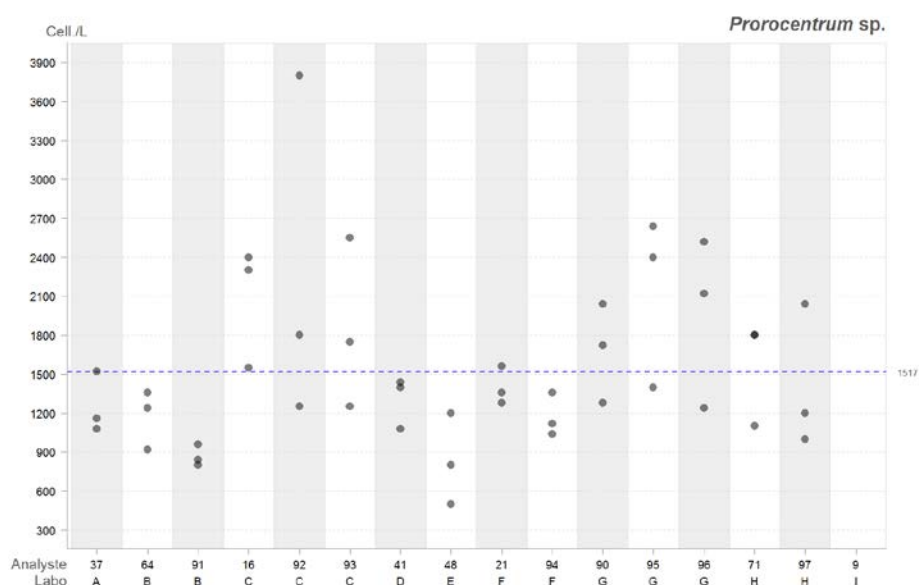


Figure 16 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Prorocentrum* sp..

Pour ce taxon, bien que les tests permettent de conclure à une bonne stabilité, les résultats des tests d'homogénéité montrent une différence significative et non négligeable entre les échantillons. En conséquence, pour l'évaluation de l'aptitude, l'écart-type inter-échantillons a été intégré dans le calcul des scores-z (cf. section 3.3).

Pour tous les analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance, sauf pour l'analyste **I-9**, dont le score z est inférieur à la limite basse de contrôle car cet analyste n'a pas observé ce taxon dans les échantillons. Ceci implique un signal d'action pour cet analyste.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 500 et un maximum de 3 800 cell./L. avec une moyenne de 1 517 cell./L.

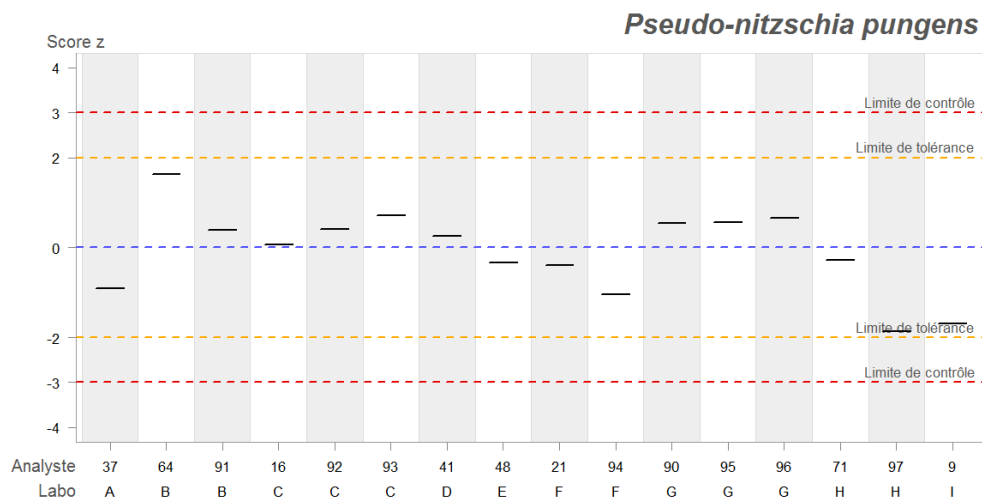


Figure 17 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des  $\log_{10}$  des résultats pour *Pseudo-nitzschia pungens*.

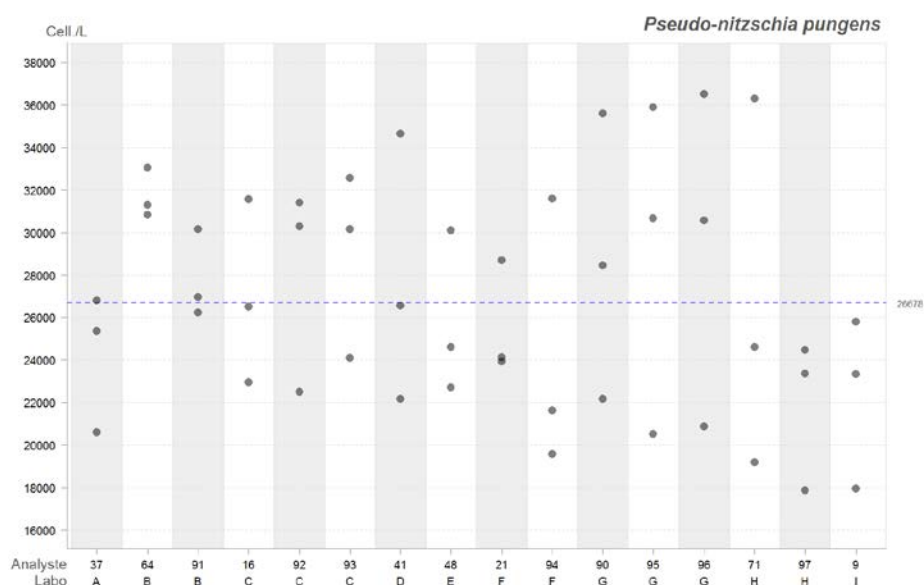


Figure 18 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Pseudo-nitzschia pungens*.

Pour ce taxon, bien que les tests concluent à une bonne stabilité, les résultats des tests d'homogénéité montrent que la variance inter-échantillons n'est pas négligeable relativement à la variance pour l'évaluation des performances. De plus, le nombre de participants étant faible, l'incertitude de la valeur assignée n'est également pas négligeable. En conséquence, pour l'évaluation de l'aptitude, l'écart-type inter-échantillons a été intégré dans le calcul des scores-z (cf. section 3.3).

Pour tous les analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 17 880 et un maximum de 36 520 cell./L. avec une moyenne de 26 678 cell./L.

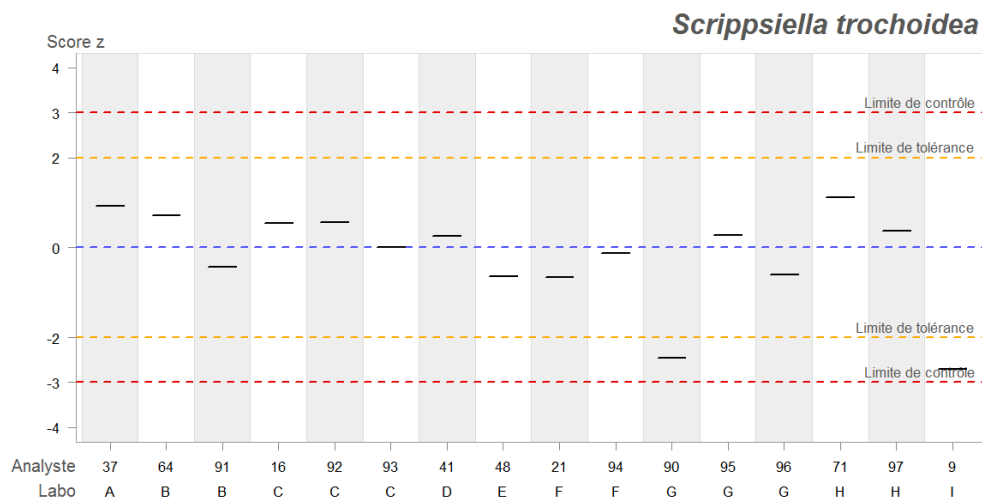


Figure 19 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des  $\log_{10}$  des résultats pour *Scrippsiella trochoidea*.

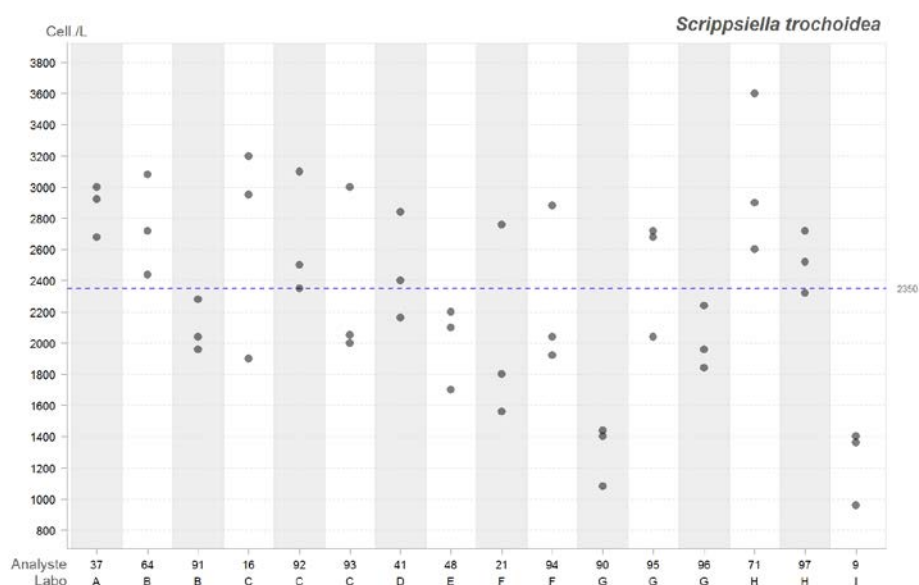


Figure 20 : résultats des abondances des répliques de chaque analyste pour *Scrippsiella trochoidea*.

Pour la majorité des analystes, le score z est compris entre les limites de tolérance, sauf pour les analystes **G-90 et I-9**, dont les scores z sont inférieurs à la limite basse de tolérance, ce qui implique un signal d'avertissement pour ces deux analystes. Ces deux cas sont dus à des résultats très bas pour tous les répliques. Concernant l'analyste G-90, il faut relever que c'est le seul taxon pour lequel son score z donne un signal d'avertissement.

Les abondances s'étendent entre un minimum de 960 et un maximum de 3 600 cell./L. avec une moyenne de 2 350 cell./L.

Pour ce taxon, d'après les tests réalisés, les échantillons sont considérés comme ni homogènes, ni stables. L'écart-type inter-échantillons a donc été inclus dans le calcul des scores-z pour l'évaluation de l'aptitude (cf. section 3.3).

Malgré les conclusions de ces tests, il y a peu de variabilité dans les résultats inter-répliques de chaque analyste et l'écart-type pour l'évaluation des performances est le troisième plus faible parmi ceux obtenus pour l'ensemble des espèces.

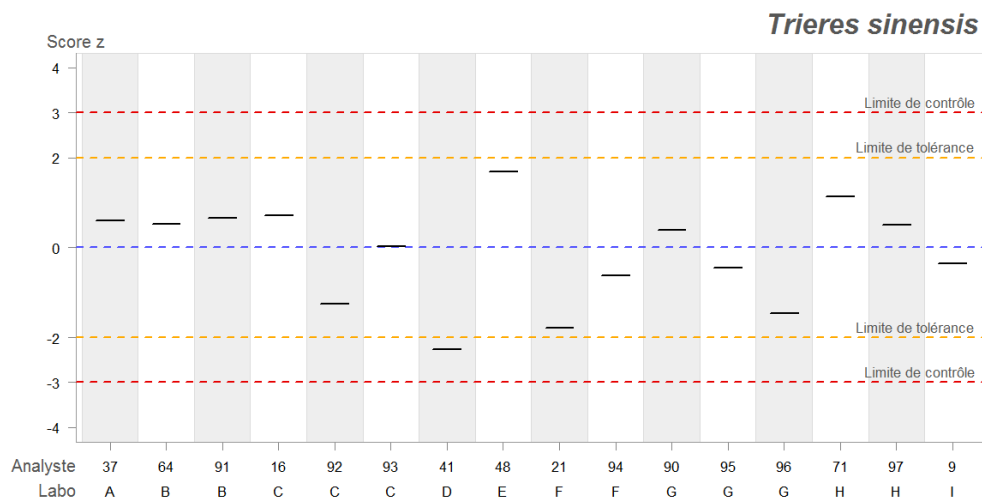


Figure 21 : scores z des analystes, calculés à partir des moyennes des  $\log_{10}$  des résultats pour *Trieres sinensis*.

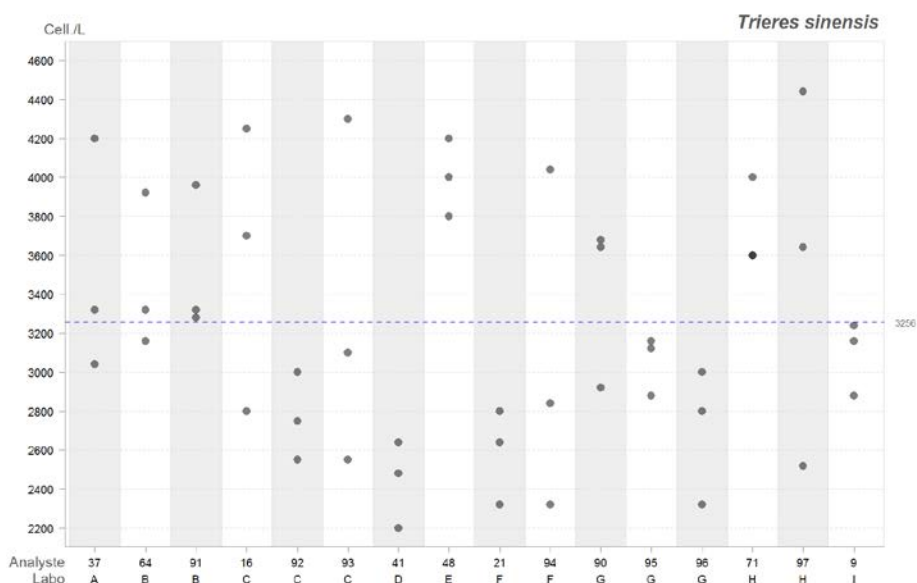


Figure 22 : résultats des abondances des réplicas de chaque analyste pour *Trieres sinensis*.

La plupart des scores z sont compris entre les limites de tolérance, n'impliquant pas de signal d'avertissement pour les analystes sauf pour l'analyste **D-41**.

La répartition des résultats d'abondances s'étend de 2 200 à 4 440 cell./L. avec une moyenne de 3 256 cell./L. Ce qui est similaire aux résultats obtenus dans le cadre de l'IPI.

Le score z de l'analyste **D-41**, compris entre la limite basse de contrôle et de tolérance avec une valeur de -2,26 est due à des valeurs d'abondances très faibles pour les trois réplicas. C'est le seul taxon pour lequel le score z donne un signal d'avertissement à l'analyste D-41.

Pour ce taxon, les tests montrent que les échantillons peuvent être considérés comme homogènes et stables. Le résultat de l'analyste D-41 est donc étonnant comparé aux très bons scores z obtenus par cet analyste pour les autres taxons.



## 4. DISCUSSION GENERALE

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 par exemple « 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. En ne proposant qu'un nombre très restreint de possibilités, 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, une majorité d'analystes a su reconnaître correctement les taxons au niveau de l'espèce ou groupe d'espèces avec 89.6 % d'identifications correctes. Les identifications correctes au niveau des genres ou espèces cumulées représentent 98.6 % des résultats.

Les espèces ***Akashiwo sanguinea***, ***Cylindrotheca closterium***, ***Chaetoceros curvisetus*** et ***Chaetoceros danicus*** ont été correctement identifiées au niveau de l'espèce par tous les analystes.

Pour l'espèce ***Azadinium spinosum***, plusieurs réponses proposées sont considérées comme correctes au niveau de l'espèce : *Azadinium spinosum*, *Azadinium* sp. et *Azadinium* / *Heterocapsa* sp.

Six participants ont identifié *Azadinium spinosum*, trois *Azadinium* sp. et six le groupe *Azadinium* / *Heterocapsa* sp.

Seul l'analyste **I-9** a identifié un autre genre avec *Karlodinium veneficum*. *Karlodinium*, *Azadinium* et *Heterocapsa* sont trois genres qu'il est très difficile de distinguer en microscopie photonique. Il est toutefois nécessaire de distinguer *Karlodinium* qui est un dinoflagellé nu (ne portant pas de thèque), des deux autres genres qui sont des dinoflagellés cuirassés. L'analyste I-9 n'est pas équipé d'un microscope à épifluorescence qui lui aurait permis de constater l'absence de thèque et d'écarter ainsi le genre *karlodinium*. Une dissection, plus complexe et chronophage, lui aurait également permis d'aboutir au même résultat.

Parmi la liste des espèces de ***Prorocentrum*** proposées dans le tableau de rendu des résultats, figuraient *P. lima* et *P. mexicanum* qui pouvaient être pressenties comme une identification correcte sans toutefois être très satisfaisante compte tenu de la faible taille, et de la répartition des pores sur les valves des cellules.

Seul l'analyste I-9 n'a ni identifié ni dénombré les cellules de *Prorocentrum* sp. Compte tenu de l'abondance moyenne de cette espèce dans les échantillons (1 517 cell./L.) il est peu probable que ce taxon ait été totalement absent des échantillons de l'analyste I-9. Suite à la réception de son attestation de performance à l'IPI, l'analyste I-9 a rédigé une fiche d'analyse de ces résultats. La non prise en compte des cellules de *Prorocentrum* est expliquée par une forte dégradation des cellules. Rappelons, que les échantillons ne sont pas issus du milieu naturel et que les taxons sont intentionnellement introduits. En conséquence toutes les cellules présentes doivent être prises en compte sauf les individus complètement vides.

Selon l'organisateur de l'IPI, Rafaele Salas, l'espèce de *Prorocentrum* introduite dans l'échantillon est *P. mexicanum* mais à l'évidence, les caractéristiques morphologiques observables ne correspondent pas à celles de l'espèce. Nous avons donc rapporté nos doutes à l'organisateur concernant l'identification de cette espèce.

Ces doutes ont été pris en compte et des investigations spécifiques sur ces cellules dans le cadre du workshop qui s'est tenu en novembre à Copenhague ont été poursuivies. Lors de cet atelier, les participants ont observé les cellules par épifluorescence et ont conclu que cette culture n'appartenait ni à *P. mexicanum*, ni à *P. lima*. De nouvelles investigations sont en cours par le Marine Institute de Galway, utilisant les techniques de séquençage et de microscopie électronique.

Concernant ***Pseudo-nitzschia pungens***, parmi les espèces proposées, la confusion était possible entre : *P. australis*, *P. fraudulenta*, *P. multiseriata*, *P. pungens* et *P. seriata* qui font toutes partie des *Pseudo-nitzschia* du complexe *seriata*. Ce choix de *P. seriata* complex était d'ailleurs proposé et cette réponse est tout à fait correcte du fait que *P. pungens* et *P. multiseriata* ne peuvent se distinguer morphologiquement qu'en microscopie électronique

Toutes ces réponses sont considérées comme correctes au niveau de l'espèce ou du groupe d'espèces, à l'exception de *P. australis* dont les caractères morphologiques permettaient de l'exclure. Tous les analystes ont correctement identifié le genre, l'espèce ou le groupe d'espèce. Deux analystes ont identifié *P. australis*, leur réponse est toutefois considérée comme correcte au niveau du genre.

Tous les analystes ont reconnu le genre ***Scrippsiella***. Huit participants ont reconnu l'espèce *S. trochoidea*. Dans le cadre du REPHY les données sont renseignées sur le regroupement des trois genres *Ensiculifera*, *Pentapharsodinium* et *Scrippsiella*, car leur distinction peut difficilement se faire en microscopie optique photonique sans épifluorescence pour observer les plaques.

Tous les analystes ont correctement identifié l'espèce ***Trieres sinensis***, sauf l'analyste I-9 qui a correctement identifié le genre mais pas l'espèce en répondant *Trieres regia*. Les trois réponses possibles proposées dans le tableau de rendu des résultats étaient : *Trieres mobiliensis*, *Trieres regia* et *Trieres sinensis*.

Pour pouvoir identifier au niveau de l'espèce des cellules de dinoflagellés cuirassés telles que *Azadinium*, *Prorocentrum* ou *Scrippsiella*, il est nécessaire de pouvoir observer la tabulation ou les détails des plaques soit par dissection manuelle, ce qui nécessite un isolement préalable et est destructeur pour les cellules, soit grâce à l'épifluorescence et coloration spécifique de la cellulose. Cette technique présente le très grand avantage de ne pas requérir d'isolement et préserve le matériel. Dans la mesure où plusieurs analystes doivent se partager les échantillons, les dissections ne sont pas aisément réalisables dans l'immédiat. En revanche, pour toute espèce non identifiable directement au moment du comptage, lorsque tous les analystes ont fini leurs dénombrements, il est recommandé de revenir sur les échantillons qu'on aura pris soin de récupérer et conserver dans un but d'analyse qualitative.

Pour les quatre taxons *Akashiwo sanguinea*, *Chaetoceros curvisetus*, *Chaetoceros danicus* et *Trieres sinensis*, les critères des tests d'homogénéité et de stabilité sont remplis. Pour ces quatre taxons, si les scores z dépassent les limites de tolérance, les participants doivent chercher une ou des raisons dans leurs pratiques.

Pour *Scrippsiella trochoidea*, les critères ne sont remplis ni pour l'homogénéité, ni pour la stabilité. Et pour *Azadinium spinosum*, *Cylindrotheca closterium*, *Pseudo-nitzschia pungens* et *Prorocentrum* sp., les critères d'homogénéité ne sont pas remplis alors que les échantillons sont considérés stables. Pour ces cinq 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.

Les scores z de tous les analystes sont compris entre les limites de tolérance pour trois taxons : *A. sanguinea*, *Cylindrotheca closterium* et *P. pungens*.

Pour douze analystes sur les seize participants, tous les scores z sont compris entre les limites de tolérance. Ce qui représente 95,1 % des résultats.

Les deux analystes D-41 et G-90 ont un score z qui dépasse les limites de tolérance pour respectivement *T. sinensis* et *S. trochoidea*. Impliquant un signal d'avertissement pour ces deux analystes.

L'analyste E-48 a un score z qui dépasse les limites de contrôle et, pour l'analyste I-9, deux scores z dépassent les limites de tolérance et deux scores z les limites de contrôle. Ces résultats impliquent un signal d'action pour ces deux analystes.

Tableau 7 : bilan des scores z

| Tous<br> score z  < 2 | 1 seul<br> score z  > 2     | 1 seul<br> score z  > 3 | 2<br> scores z  > 2<br>et 2<br> scores z  > 3 |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------|
| 12 analystes          | 2 analystes<br>D-41 et G-90 | 1 analyste<br>E-48      | 1 analyste<br>I-9                             |

## 5. **CONCLUSION**

C'est la cinquième année de participation du personnel du réseau d'analystes du REPHY à l'IPI organisé par le Marine Institute de Galway, et la troisième 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 afin d'alimenter 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.

Cette année, avec 98.6 % d'identifications correctes des taxa, les résultats reçus confirment les compétences des analystes dans l'identification du phytoplancton marin. La plupart des taxons présents ont pu être reconnus et les difficultés d'identification rencontrées lors de cet essai 2017 concernent principalement les dinoflagellés cuirassés.

Afin d'identifier les cellules de dinoflagellés cuirassés au niveau de l'espèce, il est nécessaire de pouvoir observer la tabulation et le détail des plaques de la thèque. Cela peut se faire soit par dissection manuelle, ce qui est destructeur pour les cellules et ne peut donc pas être réalisé au cours du balayage de la cuve, soit grâce à une coloration spécifique de la cellulose et observation en épifluorescence. Dans ce cas il n'y a pas destruction du matériel et le passage du contraste de phase à l'épifluorescence peut se faire au fil de l'analyse. Grâce à cet outil, même de très petites cellules de dinoflagellés cuirassés peuvent être rendues visibles au milieu de détritiques et qui peuvent les masquer en observation classique. Cette méthode est avantageuse dans le cadre des CIL, car elle rend possible l'observation de la même cuve par plusieurs analystes.

A ce jour cinq laboratoires sur les douze implantations du réseau d'observateurs du REPHY ont un microscope équipé d'un module d'épifluorescence. Il est envisagé d'équiper progressivement tous les laboratoires de notre réseau.

Concernant les résultats quantitatifs, 95,1% des scores z sont compris entre les limites de tolérance ce qui est globalement satisfaisant.

L'analyse des résultats obtenus cette année met en évidence l'importance du nombre de participants. En effet, seize analystes du réseau REPHY, qui en comptait 21 en juin 2017, ont participé alors qu'un minimum de 18 participants s'avère nécessaire pour que l'incertitude de la valeur assignée soit considérée comme négligeable.

Cinq analystes n'ont pas pu participer en raison de leur plan de charge pendant la période de l'exercice qui se déroule de juin à août. Cette période, cadrée sur la saison des congés estivaux, n'est pas très propice à la mobilisation du personnel, qui voit son plan de charge augmenter en cette période. Toutefois, il n'est pas possible de changer cela, puisque nous sommes dépendants de l'organisation du Marine Institute de Galway.

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

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

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

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

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

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

Rafael Salas & Jacob Larsen (2017). PHY-ICN-17-MI1 VR 1.0. **International Phytoplankton Intercomparison proficiency test in the abundance and composition of marine microalgae 2017 report**

## 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.



### **IPI Phytoplankton Proficiency Test PHY-ICN-17-MI1 Vr1.0**

#### **Instructions**

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

- 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**
- 8. Counting guide IPI2017**
- 9. Online HABs quiz**

## **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.

Registration information about this intercomparison exercise can be obtained in the IOC website; <http://hab.ioc-unesco.org> under the heading 'activities and training courses'. Registration to the exercise is through the Marine institute. You need to contact our administrator Fiona Bradley at [fiona.bradley@marine.ie](mailto:fiona.bradley@marine.ie) to register. Also, in the NMBAQC website ([www.nmbaqcs.org](http://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 water samples for marine phytoplankton.

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 2018. All our work is carried out following the technical and managerial requirements for PT schemes (ISO17043) and the data is statistically analysed using the statistical methods as laid out in ISO13528 '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. Each analyst receives an envelope containing four samples (only 3 needs to be analysed) with a 50ml volume in plastic centrifuge 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 receipt of the samples, every analyst must make sure that they have received everything listed in the checklist confirmation form (Form 1). Make sure that all the samples are intact and sealed properly and check that you have received the enumeration and identification results log sheet (Form 2) as an Excel workbook.

Please complete form 1: 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](mailto: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: IPI17 Rafael Salas**. This validates the traceability of the samples from origin to the laboratories and that all materials have arrived into the testing laboratories to the analysts in good working condition.

Once samples have been receipt by the testing laboratories, analysts are given four weeks to complete the test and return all the results by e-mail ([rafael.salas@marine.ie](mailto:rafael.salas@marine.ie)),



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. The enumeration and identification results log sheet (Form 2) **must be received** in the Marine Institute by **Friday, July 7<sup>th</sup> 2017**.

***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](mailto: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: IPI17 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 1). Three sedimentation chambers are required.

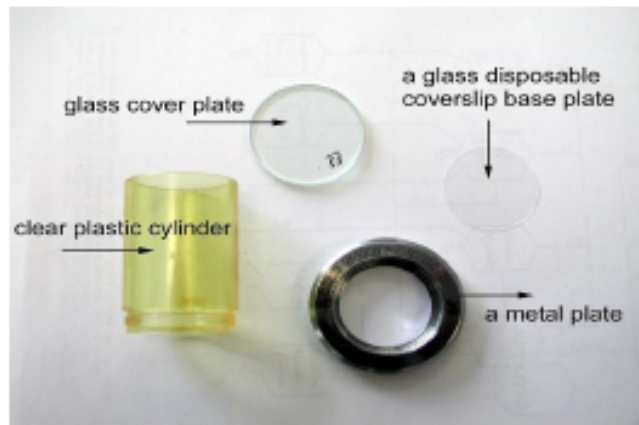


Fig 1: Sedimentation counting chamber

- 5.1 **Storage of samples:** 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:** Samples must be adapted to room temperature before sedimentation takes place. This reduces the risk of air bubbles inside the sedimentation chambers due to temperature differences between room and sample.
- 5.3 **Chamber preparation:**
  - 5.3.1 All sedimentation chambers should be cleaned before you start
  - 5.3.2 Place a new 'not used before' disposable cover slip base plate inside a cleaned metal plate.
  - 5.3.3 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.
  - 5.3.4 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.

#### **5.4 Sample homogenisation and filling:**

- 5.4.1 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
- 5.4.2 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.
- 5.4.3 Label the sedimentation chamber with the sample number from the sterilin tube.

#### **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 of all the species identified in the samples.
- 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.

How samples have been prepared ? First, seawater have been filtered through GF/C Whatmann filter paper and autoclaved using teflon bottles for 15 minutes at 121°C. The seawater was left to cool first and then, 25mls of lugol's iodine per litre were used to stain and preserve the water in preparation for the addition of the inoculum. The Lugol's preserved seawater have been left to stand in the dark at room temperature over 24 hours to allow any impurities to deposit to the bottom and using an eppendorf 50ml dispenser, 47mls of the seawater have been pipette out into 50ml skirted centrifuge tubes and weighted in a four place calibrated balance. Only the first 4L out of a 5L glass bottle was dispensed out to avoid the deposited impurities at the bottom and therefore obtain a cleaner sample. The density of seawater have been taken into account to be 1.025g at room temperature when weighing the volumes. 400 samples have been prepared in this way.

The Master mix, then 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 with the target species at the required concentrations, this mixture has been homogenised 100 times using the Paul-Schatz method every 10 samples aliquoted. 3mls of the Master mix have been inoculated into the centrifuge tubes containing 47ml to a 50ml volume.

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



## 8. Counting guide IPI2017

- 8.1 It is very important to spend some time becoming familiar with the samples and how the cells appear on the base plate before any count is carried out.
- 8.2 How to count single cell diatoms? Figures 2 to 5 show a series of pictures belonging to a diatom that is generally found solitary but that can form short chains when dividing.



Fig.2 These cells look like are undergoing division where the chloroplasts are migrating to both poles of the cells cytoplasm, however, there is only one set of elevations and spines at each end of the cell, so they should be counted as one cell.

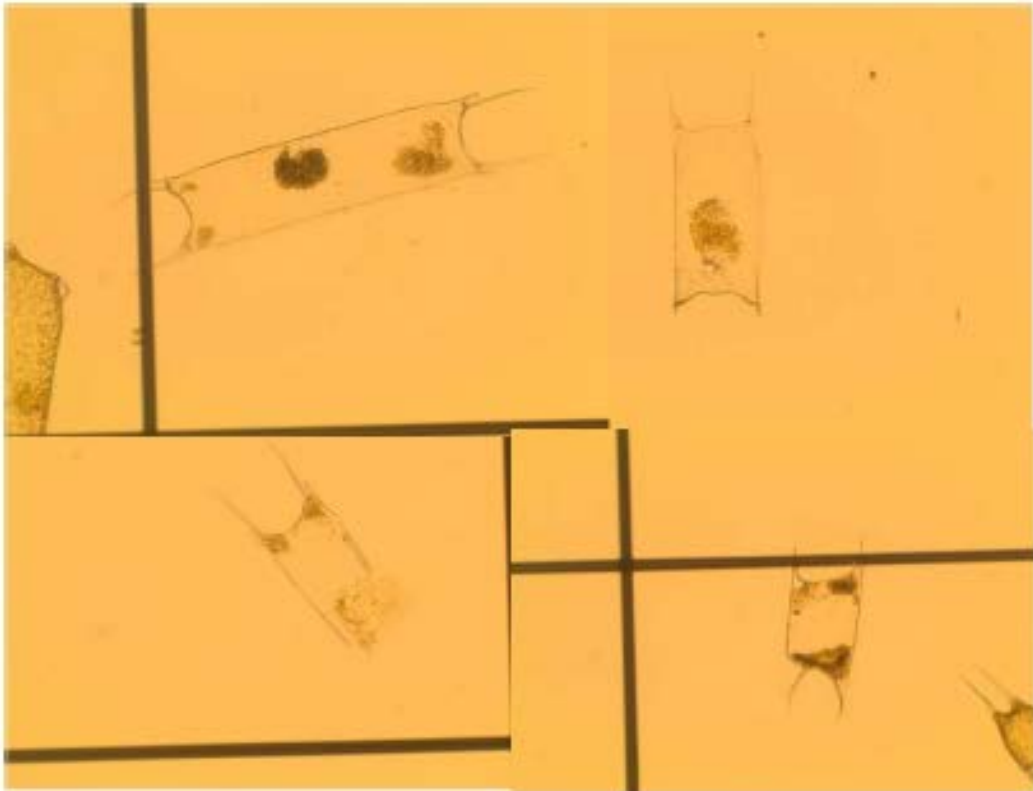


Fig.3 The cells are more or less empty of any cytoplasmic content and therefore should not be counted.



Fig.4 In this example, the cells are undergoing division and two sets of elevations and spines can be observed in each cell, showing fully developed cells that are still joint together. In this case, we would count two cells rather than one. Compare these images with Fig.2

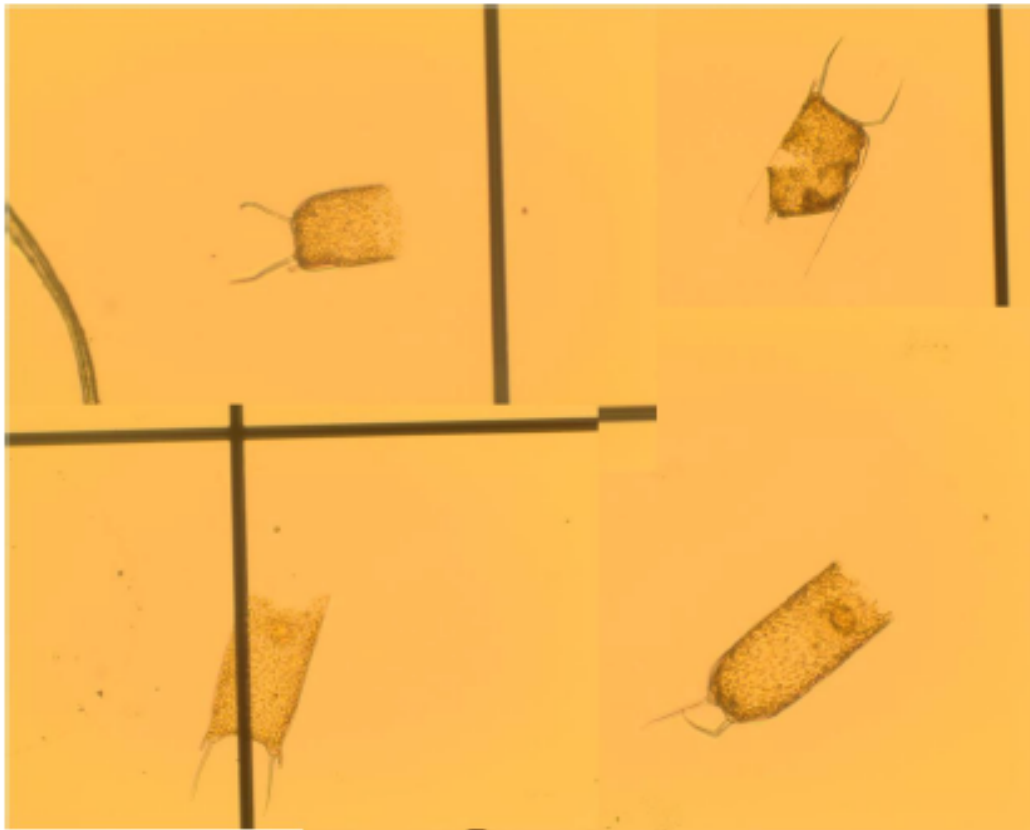


Fig.5 This is a difficult one, but as a general rule when counting, it is easier to count one cell rather than half, as tally counters only operate cell by cell rather than half by half and it is also possible that you may only find one half of the cell in the sample and not the other. For this reason, even if only half cell is visible this should be counted as one at least for the purpose of this intercomparison.



### 8.3 How to count chain forming diatoms? Figures 6- shows

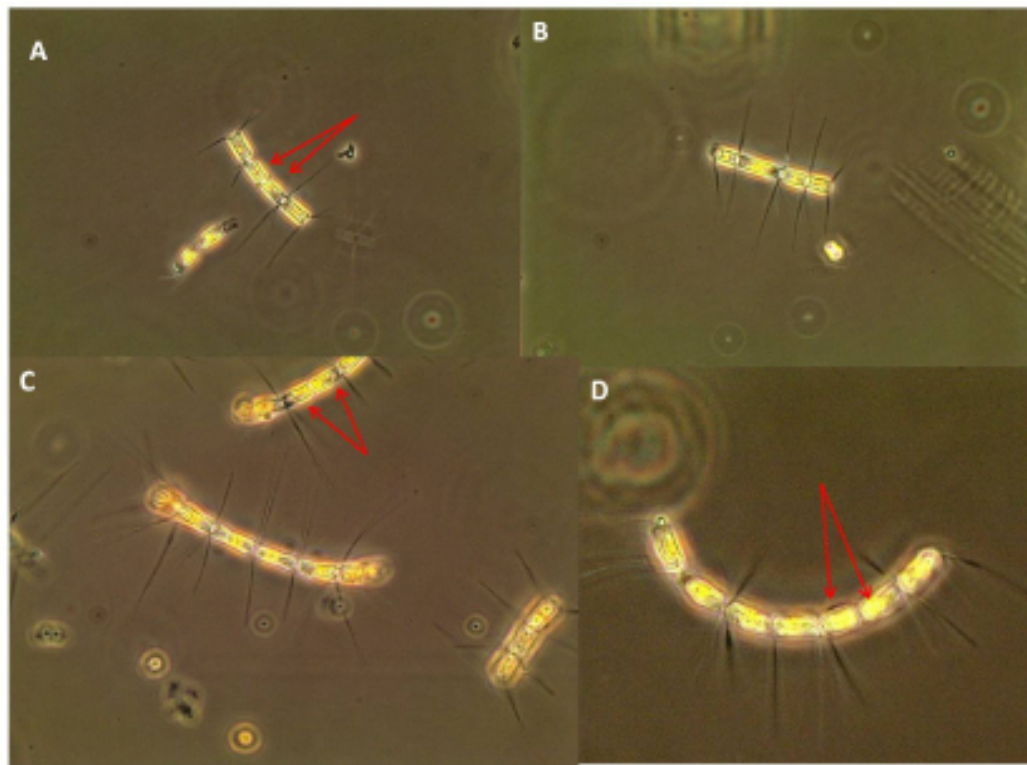


Fig.6 A-D show images of *Chaetoceros* where cells are well defined and differentiated within the chain, as there are pairs of setae (spines) arising from the valve of each cell pair (not in all cases) and they are reasonably in good condition as the chloroplasts are extended fully in the cytoplasm inside the frustule. In image A (red arrows), the middle cells have no setae between them, 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.

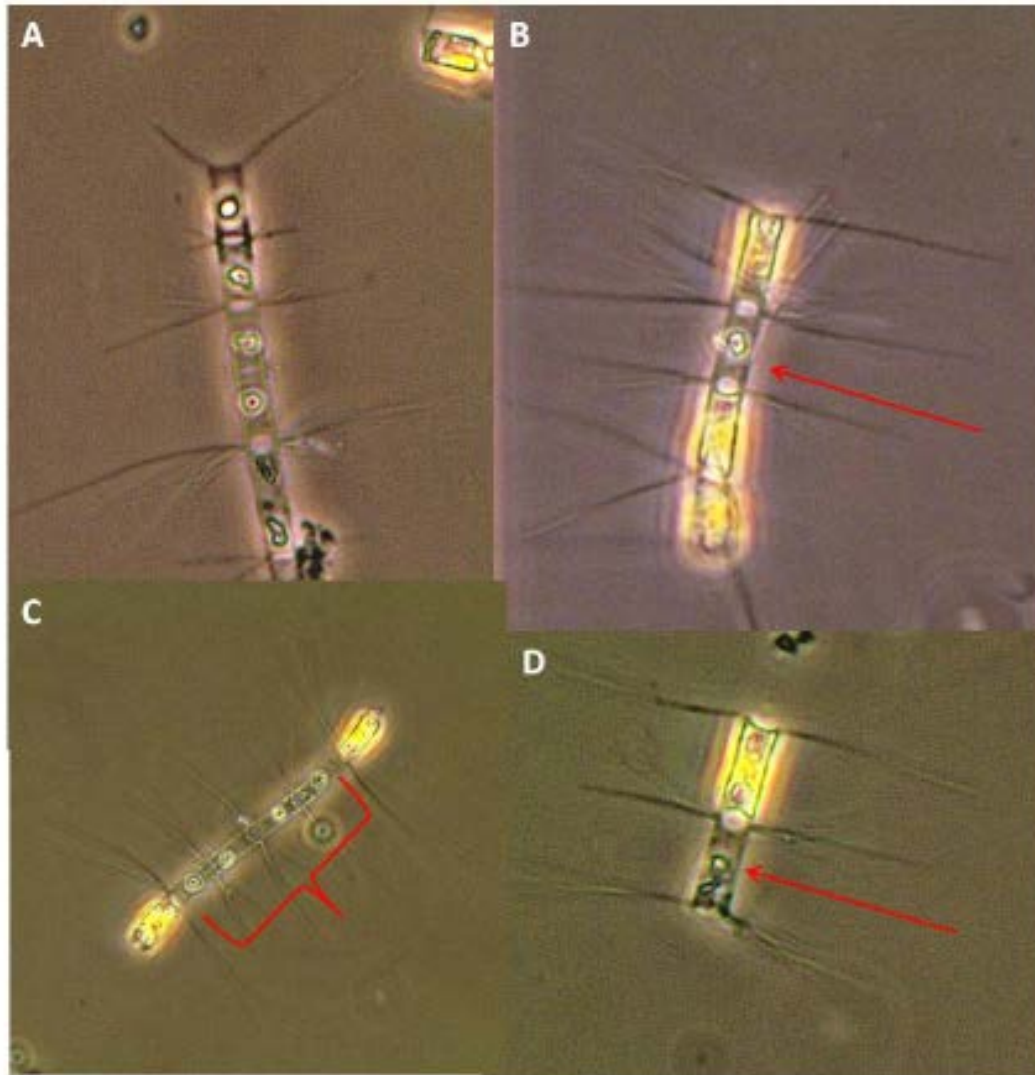


Fig.7 A-D images show chains of *Chaetoceros* where the cells are not in good condition, the chloroplasts are plasmolysed and hardly visible in the chains. In this cases do not count these cells. Image A do not count. Image B count 3 cells but don't count the second cell in the chain. In image C count the terminal cells only and in image D only count one cell.

#### 8.4 How to count dinoflagellates?

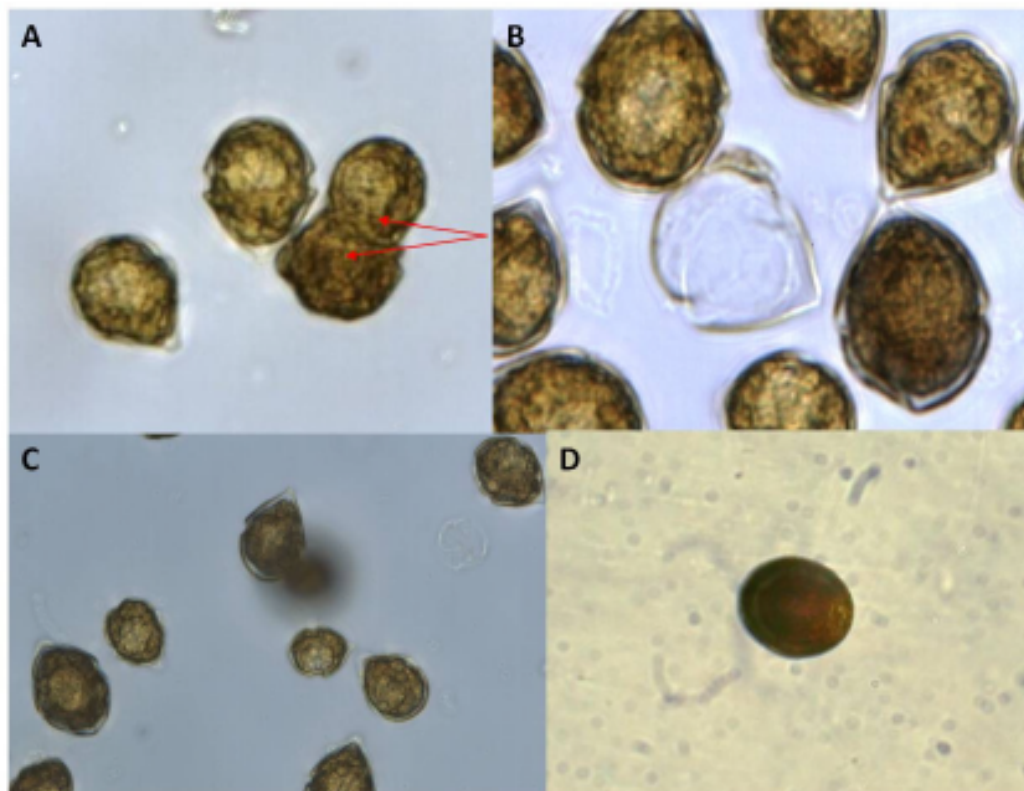


Fig.8 Image A shows two cells fusing or dividing, count only one cell. B: Dinoflagellates empty theca should not be counted. C: Cells may also vary in size, some cells will appear smaller than others, this is normal in culture conditions. Count all cells big or small. D: Sometimes Plasmolysis may occur and the cells appear naked and rounded. Do not count plasmolysed cells as we don't know what they are.

These rules are applicable to this intercomparison exercise only.

#### 9. Online HABs quiz

A HAB taxonomic quiz will be developed in the web platform 'Ocean teacher' and it should be ready by the **end of June 2017**. All participants will need access to the internet to complete this part of the exercise. More information on when participants will be able to access this exercise will be sent to you by e-mail later on.

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

When you go to the page <http://classroom.oceanteacher.org/> in the top right hand corner of this page, you'll see a link to login. Press login and in the next page if you have already registered, then you only have to enter your username and password to access the course, if you forgot your password press the forgotten password link. If this is your first time using this system, then go to create new account and register your details. Once you register your details we will be able to activate your account. Participants should be able to self-enrol to this exercise, so once you are registered and logged in you must supply an enrolment key to access the exercise. This key is **IPI2017**. We will tell you the exact date the exercise is opened to be able to access the quiz.

So, how do you do access the course?, Once you are all logged in, in the main page go to my courses and in the drop down menu choose the IPI 2017 course, enter your enrolment key (**IPI2017**) and start your quiz. Make sure you enter the right course.

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

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



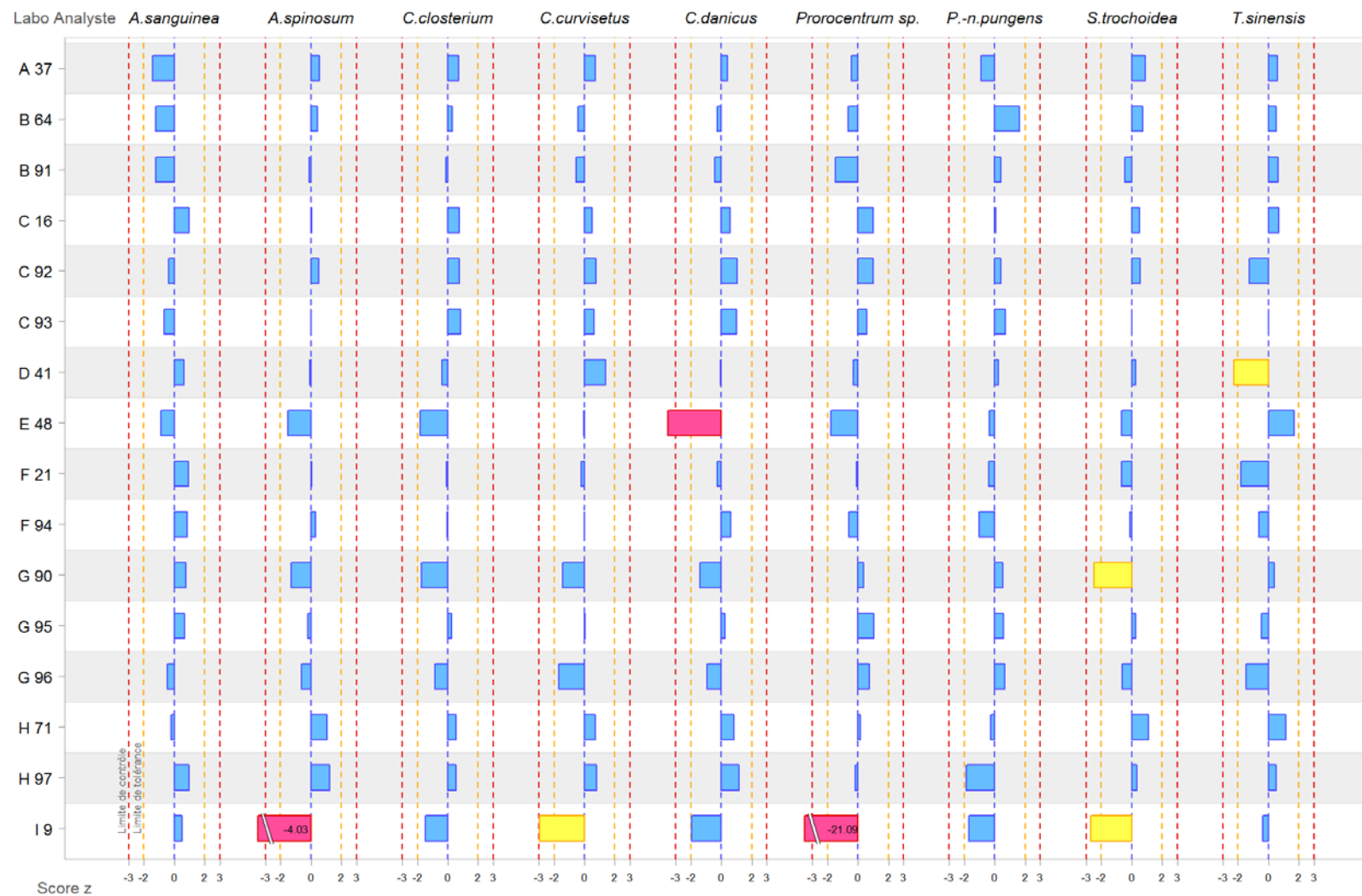
Résultats bruts de chaque réplique en nombre de cellules par litre.

| CODE<br>Labo-<br>Analyst | <i>Akashiwo<br/>sanguinea</i> |     |     | <i>Azadinium<br/>spinosum</i> |      |      | <i>Cylindrotheca<br/>closterium</i> |      |      | <i>Chaetoceros<br/>curvisetus</i> |       |       | <i>Chaetoceros<br/>danicus</i> |       |       | <i>Prorocentrum<br/>sp.</i> |      |      | <i>Pseudo-nitzschia<br/>pungens</i> |       |       | <i>Scrippsiella<br/>trochoidea</i> |      |      | <i>Trieres sinensis</i> |      |      |
|--------------------------|-------------------------------|-----|-----|-------------------------------|------|------|-------------------------------------|------|------|-----------------------------------|-------|-------|--------------------------------|-------|-------|-----------------------------|------|------|-------------------------------------|-------|-------|------------------------------------|------|------|-------------------------|------|------|
| <b><u>A-37</u></b>       | 0                             | 40  | 40  | 5240                          | 2360 | 2840 | 4080                                | 5000 | 3640 | 39920                             | 35920 | 34120 | 7600                           | 9840  | 9160  | 1160                        | 1080 | 1520 | 26800                               | 20600 | 25360 | 3000                               | 2920 | 2680 | 3320                    | 4200 | 3040 |
| <b><u>B-64</u></b>       | 40                            | 80  | 0   | 2160                          | 3120 | 4040 | 2600                                | 3520 | 4360 | 24240                             | 23440 | 25520 | 5840                           | 6880  | 7880  | 920                         | 1240 | 1360 | 30840                               | 31280 | 33040 | 3080                               | 2720 | 2440 | 3320                    | 3920 | 3160 |
| <b><u>B-91</u></b>       | 40                            | 80  | 0   | 1160                          | 3000 | 3160 | 1960                                | 3200 | 3320 | 17480                             | 25640 | 27120 | 4320                           | 7840  | 7760  | 800                         | 960  | 840  | 26240                               | 30160 | 26960 | 2040                               | 2280 | 1960 | 3320                    | 3960 | 3280 |
| <b><u>C-16</u></b>       | 250                           | 200 | 100 | 2400                          | 2850 | 2150 | 4200                                | 4350 | 4300 | 33200                             | 44850 | 26700 | 8700                           | 11450 | 8350  | 2300                        | 1550 | 2400 | 26500                               | 31550 | 22950 | 2950                               | 1900 | 3200 | 3700                    | 2800 | 4250 |
| <b><u>C-92</u></b>       | 0                             | 200 | 250 | 3150                          | 2800 | 3550 | 4550                                | 4050 | 4200 | 32700                             | 39500 | 41000 | 11250                          | 9700  | 13158 | 1250                        | 1800 | 3800 | 31400                               | 30300 | 22500 | 2500                               | 2350 | 3100 | 3000                    | 2550 | 2750 |
| <b><u>C-93</u></b>       | 0                             | 200 | 100 | 2700                          | 2700 | 1800 | 4350                                | 4700 | 4450 | 29500                             | 42300 | 36600 | 9400                           | 12550 | 11600 | 1250                        | 1750 | 2550 | 32550                               | 30150 | 24100 | 2050                               | 2000 | 3000 | 3100                    | 2550 | 4300 |
| <b><u>D-41</u></b>       | 160                           | 80  | 120 | 1680                          | 2680 | 2600 | 2840                                | 2160 | 2360 | 45320                             | 58160 | 40560 | 6160                           | 8560  | 7640  | 1400                        | 1440 | 1080 | 22160                               | 26560 | 34640 | 2840                               | 2400 | 2160 | 2640                    | 2200 | 2480 |
| <b><u>E-48</u></b>       | 100                           | 100 | 0   | 400                           | 1900 | 1300 | 600                                 | 1700 | 1700 | 18800                             | 34400 | 34100 | 1500                           | 3900  | 1400  | 800                         | 500  | 1200 | 22700                               | 30100 | 24600 | 1700                               | 2100 | 2200 | 4000                    | 4200 | 3800 |
| <b><u>F-21</u></b>       | 160                           | 160 | 160 | 2120                          | 2600 | 2640 | 3000                                | 2680 | 2800 | 24560                             | 25360 | 28120 | 8080                           | 6040  | 6680  | 1360                        | 1560 | 1280 | 23920                               | 28680 | 24120 | 2760                               | 1560 | 1800 | 2320                    | 2800 | 2640 |
| <b><u>F-94</u></b>       | 160                           | 120 | 160 | 2800                          | 3760 | 2160 | 3000                                | 2720 | 2960 | 31360                             | 23040 | 31040 | 10080                          | 9400  | 9160  | 1040                        | 1360 | 1120 | 21640                               | 31600 | 19560 | 2880                               | 2040 | 1920 | 2320                    | 4040 | 2840 |
| <b><u>G-90</u></b>       | 240                           | 80  | 120 | 1400                          | 840  | 1200 | 1520                                | 840  | 1560 | 23240                             | 9720  | 20840 | 6720                           | 2680  | 4960  | 1720                        | 2040 | 1280 | 28440                               | 22160 | 35600 | 1080                               | 1440 | 1400 | 3640                    | 2920 | 3680 |
| <b><u>G-95</u></b>       | 240                           | 40  | 200 | 2480                          | 2280 | 1680 | 3920                                | 3240 | 2920 | 31880                             | 26000 | 28240 | 10360                          | 6280  | 8840  | 2400                        | 2640 | 1400 | 30680                               | 20520 | 35880 | 2720                               | 2680 | 2040 | 3120                    | 2880 | 3160 |
| <b><u>G-96</u></b>       | 240                           | 0   | 160 | 1680                          | 1960 | 1440 | 2200                                | 1440 | 2320 | 16720                             | 7960  | 26120 | 3440                           | 5280  | 8040  | 2520                        | 2120 | 1240 | 30560                               | 20880 | 36520 | 2240                               | 1960 | 1840 | 2800                    | 2320 | 3000 |
| <b><u>H-71</u></b>       | 0                             | 200 | 500 | 4200                          | 4400 | 4500 | 3900                                | 4500 | 3300 | 39600                             | 34200 | 35900 | 11000                          | 10700 | 9500  | 1100                        | 1800 | 1800 | 36300                               | 24600 | 19200 | 2600                               | 3600 | 2900 | 3600                    | 3600 | 4000 |
| <b><u>H-97</u></b>       | 280                           | 160 | 120 | 5240                          | 5400 | 3800 | 3120                                | 4080 | 4640 | 34040                             | 40000 | 40920 | 11400                          | 11280 | 12480 | 2040                        | 1200 | 1000 | 17880                               | 23360 | 24480 | 2520                               | 2320 | 2720 | 4440                    | 3640 | 2520 |
| <b><u>I-9</u></b>        | 160                           | 160 | 40  | 200                           | 240  | 280  | 800                                 | 1440 | 2400 | 5840                              | 5480  | 26720 | 3000                           | 2880  | 5400  |                             |      |      | 17960                               | 25800 | 23320 | 960                                | 1360 | 1400 | 2880                    | 3240 | 3160 |

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

| CODE<br>Labo-Analyst              | <i>Akashiwo sanguinea</i> |         | <i>Azadinium spinosum</i> |         | <i>Cylindrotheca closterium</i> |         | <i>Chaetoceros curvisetus</i> |         | <i>Chaetoceros danicus</i> |         | <i>Prorocentrum sp.</i> |         | <i>Pseudo-nitzschia pungens</i> |         | <i>Scrippsiella trochoidea</i> |         | <i>Trieres sinensis</i> |         |
|-----------------------------------|---------------------------|---------|---------------------------|---------|---------------------------------|---------|-------------------------------|---------|----------------------------|---------|-------------------------|---------|---------------------------------|---------|--------------------------------|---------|-------------------------|---------|
|                                   | Moyenne des Log10         | Z score | Moyenne des Log10         | Z score | Moyenne des Log10               | Z score | Moyenne des Log10             | Z score | Moyenne des Log10          | Z score | Moyenne des Log10       | Z score | Moyenne des Log10               | Z score | Moyenne des Log10              | Z score | Moyenne des Log10       | Z score |
| <b><u>A-37</u></b>                | 1.068                     | -1.405  | 3.515                     | 0.564   | 3.624                           | 0.725   | 4.563                         | 0.699   | 3.945                      | 0.409   | 3.093                   | -0.446  | 4.382                           | -0.901  | 3.457                          | 0.916   | 3.542                   | 0.607   |
| <b><u>B-64</u></b>                | 1.168                     | -1.200  | 3.478                     | 0.415   | 3.534                           | 0.306   | 4.387                         | -0.406  | 3.834                      | -0.272  | 3.064                   | -0.644  | 4.501                           | 1.623   | 3.437                          | 0.720   | 3.538                   | 0.527   |
| <b><u>B-91</u></b>                | 1.168                     | -1.200  | 3.347                     | -0.115  | 3.440                           | -0.132  | 4.362                         | -0.567  | 3.807                      | -0.437  | 2.937                   | -1.491  | 4.443                           | 0.391   | 3.320                          | -0.426  | 3.545                   | 0.653   |
| <b><u>C-16</u></b>                | 2.233                     | 0.983   | 3.389                     | 0.055   | 3.632                           | 0.763   | 4.533                         | 0.511   | 3.973                      | 0.580   | 3.311                   | 1.006   | 4.428                           | 0.066   | 3.418                          | 0.534   | 3.548                   | 0.708   |
| <b><u>C-92</u></b>                | 1.566                     | -0.384  | 3.499                     | 0.497   | 3.630                           | 0.753   | 4.575                         | 0.771   | 4.052                      | 1.062   | 3.311                   | 1.005   | 4.444                           | 0.402   | 3.420                          | 0.556   | 3.441                   | -1.252  |
| <b><u>C-93</u></b>                | 1.434                     | -0.656  | 3.373                     | -0.011  | 3.653                           | 0.862   | 4.553                         | 0.637   | 4.045                      | 1.019   | 3.249                   | 0.593   | 4.458                           | 0.707   | 3.363                          | -0.001  | 3.510                   | 0.021   |
| <b><u>D-41</u></b>                | 2.062                     | 0.633   | 3.356                     | -0.078  | 3.387                           | -0.377  | 4.676                         | 1.410   | 3.868                      | -0.060  | 3.113                   | -0.316  | 4.436                           | 0.252   | 3.389                          | 0.254   | 3.386                   | -2.257  |
| <b><u>E-48</u></b>                | 1.333                     | -0.861  | 2.998                     | -1.523  | 3.080                           | -1.807  | 4.448                         | -0.025  | 3.304                      | -3.497  | 2.894                   | -1.777  | 4.409                           | -0.341  | 3.298                          | -0.637  | 3.602                   | 1.694   |
| <b><u>F-21</u></b>                | 2.204                     | 0.924   | 3.388                     | 0.049   | 3.451                           | -0.079  | 4.414                         | -0.235  | 3.838                      | -0.247  | 3.145                   | -0.103  | 4.406                           | -0.389  | 3.296                          | -0.656  | 3.411                   | -1.794  |
| <b><u>F-94</u></b>                | 2.162                     | 0.838   | 3.452                     | 0.310   | 3.461                           | -0.032  | 4.450                         | -0.010  | 3.979                      | 0.617   | 3.067                   | -0.624  | 4.375                           | -1.042  | 3.351                          | -0.123  | 3.475                   | -0.627  |
| <b><u>G-90</u></b>                | 2.121                     | 0.753   | 3.050                     | -1.314  | 3.100                           | -1.713  | 4.224                         | -1.429  | 3.650                      | -1.389  | 3.217                   | 0.383   | 4.450                           | 0.546   | 3.113                          | -2.456  | 3.531                   | 0.394   |
| <b><u>G-95</u></b>                | 2.094                     | 0.699   | 3.326                     | -0.200  | 3.523                           | 0.257   | 4.456                         | 0.029   | 3.920                      | 0.254   | 3.316                   | 1.041   | 4.451                           | 0.566   | 3.391                          | 0.268   | 3.484                   | -0.456  |
| <b><u>G-96</u></b>                | 1.528                     | -0.462  | 3.225                     | -0.606  | 3.289                           | -0.834  | 4.180                         | -1.704  | 3.721                      | -0.955  | 3.274                   | 0.759   | 4.456                           | 0.662   | 3.302                          | -0.597  | 3.430                   | -1.455  |
| <b><u>H-71</u></b>                | 1.667                     | -0.178  | 3.640                     | 1.067   | 3.588                           | 0.557   | 4.562                         | 0.694   | 4.016                      | 0.841   | 3.184                   | 0.160   | 4.411                           | -0.280  | 3.478                          | 1.122   | 3.572                   | 1.141   |
| <b><u>H-97</u></b>                | 2.243                     | 1.004   | 3.677                     | 1.217   | 3.590                           | 0.571   | 4.582                         | 0.817   | 4.068                      | 1.160   | 3.130                   | -0.203  | 4.337                           | -1.866  | 3.400                          | 0.363   | 3.537                   | 0.501   |
| <b><u>I-9</u></b>                 | 2.003                     | 0.512   | 2.376                     | -4.033  | 3.147                           | -1.493  | 3.977                         | -2.979  | 3.556                      | -1.962  | 0.000                   | -21.089 | 4.345                           | -1.696  | 3.087                          | -2.704  | 3.490                   | -0.356  |
| Ecart-type de référence sigma_s   | 0.488                     |         | 0.177                     |         | 0.176                           |         | 0.159                         |         | 0.164                      |         | 0.134                   |         | 0.037                           |         | 0.082                          |         | 0.055                   |         |
| Moyenne de référence Xs           | 1.754                     |         | 3.376                     |         | 3.468                           |         | 4.452                         |         | 3.878                      |         | 3.160                   |         | 4.425                           |         | 3.363                          |         | 3.509                   |         |
| Ecart-type inter-échantillons s_s | 0                         |         | 0.173                     |         | 0.124                           |         | 0                             |         | 0                          |         | 0.066                   |         | 0.029                           |         | 0.061                          |         | 0                       |         |

ANNEXE IV      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 (LER-BO) ;
- La Trinité sur mer (LER-MPL/TM) ;
- Nantes (LER-MPL/NT);
- L'Houmeau/La Rochelle (LER-PC/LR);
- Toulon (LER-PAC/TL);

***Responsables nationaux :***

---

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