

# OBSERVATION ET DÉNOMBREMENT DU PHYTOPLANKTON MARIN PAR MICROSCOPIE OPTIQUE

**Spécifications techniques et méthodologiques appliquées au REPHY**

**Version 2 – Février 2020**



*Diffusion : libre*

*Référence interne du document : ODE/VIGIES/20/03*

*Rédigé par :*

- Nadine Neaud-Masson (ODE-Vigies-Coordination REPHY-REPHYTOX)

*Contributeur :*

- Dominique Soudant (ODE-Vigies)

*Vérifié par :*

- Pierre Masselin (DCA)
- Soazig Manach (ODE-LITTORAL-LERMPL)

*Approuvé par :*

- Philippe Riou (ODE Directeur Pi)
- Maud Lemoine (ODE-Vigies-Coordination REPHY-REPHYTOX)

19.02.2020



## Historique des versions :

Création- Document d'origine (V0)	Grossel H., décembre 2006. Manuel d'observation et de dénombrement du phytoplancton marin. Document de méthode REPHY. Document Ifremer / EMP.
Version révisée d'octobre 2015 (V1)	Cette nouvelle version remanie et s'inspire du document de référence d'origine dont certains paragraphes sont repris intégralement. Elle précise les méthodes appliquées dans le cadre du REPHY. Des précisions au sujet du matériel, de la métrologie et des consignes de sécurité sont ajoutées, ainsi que des informations concernant les limites pour les identifications.
Révision de février 2020 (V2)	<p>Ajouts :</p> <p>Instructions spécifiques aux lieux labellisés PHYTOBS.</p> <p>Épifluorescence, conservation des documents, site collaboratif Alfresco, nouvelles annexes (contrôles qualité, liste des taxons toxiques ou nuisibles cibles en France et liste des taxons virtuels du référentiel quadrigé).</p> <p>Ajout de sites web utiles dans l'Annexe I.</p> <p>Remaniement du sommaire.</p>

Le texte en bleu matérialise les ajouts ou modifications par rapport au document précédent.

**Délai de mise en application : Les laboratoires ont un délai de 18 mois à partir de la diffusion de ce manuel en particulier pour mettre en application les nouvelles instructions de contrôles qualité qui y sont inscrites.**

## SOMMAIRE

<b>1</b>	<b>Introduction - Contexte.....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Domaine d'application et stratégie .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Documents de référence.....</b>	<b>8</b>
3.1	Documents à caractère réglementaire.....	8
3.2	Documents normatifs.....	8
3.3	Documents qualité .....	9
3.4	Documents et outils d'appui aux déterminations .....	9
3.5	Autres documents .....	10
<b>4</b>	<b>Termes et définitions .....</b>	<b>11</b>
<b>5</b>	<b>Équipement et environnement .....</b>	<b>12</b>
5.1	Consignes de sécurité.....	12
5.2	Équipements.....	13
5.3	Matériels et produits.....	15
<b>6</b>	<b>Stratégies d'analyse .....</b>	<b>19</b>
6.1	Flores totales (FLORTOT) .....	19
6.2	Flores indicatrices (FLORIND) .....	19
6.3	Flores partielles (FLORPAR) .....	20
<b>7</b>	<b>Traitement des échantillons.....</b>	<b>21</b>
7.1	Réception.....	21
7.2	Conservation : fixation et stockage des échantillons .....	21
7.3	Délais d'analyse .....	22
7.4	Préparation pour analyse .....	22
7.5	Dilution - concentration .....	24
<b>8</b>	<b>Mode opératoire des comptages.....</b>	<b>25</b>
8.1	Recommandations.....	25
8.2	opération préliminaire .....	27
8.3	Stratégie de dénombrement .....	28
8.4	Mode opératoire .....	31
<b>9</b>	<b>Contrôles qualité et Validation de la méthode.....</b>	<b>33</b>
9.1	Métrologie .....	33
9.2	Blanc d'essai .....	34
9.3	Validation quantitative.....	34

9.4	Validation qualitative .....	35
<b>10</b>	<b>Gestion des compétences et habilitation.....</b>	<b>36</b>
10.1	Habilitation initiale .....	37
10.2	Maintien de l'habilitation .....	37
10.3	Re-habilitation .....	37
<b>11</b>	<b>Bancarisation des données dans quadriges.....</b>	<b>38</b>
<b>12</b>	<b>Conservation des documents .....</b>	<b>41</b>
<b>ANNEXE I.</b>	<b>Documents et outils d'aide à l'identification.....</b>	<b>42</b>
<b>ANNEXE II.</b>	<b>Étalonnages .....</b>	<b>45</b>
<b>ANNEXE III.</b>	<b>Modèle exemple de fiche de résultat .....</b>	<b>48</b>
<b>ANNEXE IV.</b>	<b>Précision des comptages.....</b>	<b>52</b>
<b>ANNEXE V.</b>	<b>Contrôles qualité et validation de la méthode.....</b>	<b>53</b>
<b>ANNEXE VI.</b>	<b>Identification, comptage et saisie : cas particuliers posant question .....</b>	<b>56</b>
<b>ANNEXE VII.</b>	<b>Taxon virtuels dans le référentiel de quadriges.....</b>	<b>64</b>
<b>ANNEXE VIII.</b>	<b>Les microalgues "cibles" en France (toxiques – nuisibles) E. Nezan 2017 ..</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUCTION - CONTEXTE

Rappel des missions et objectifs du Réseau d'observation et de Surveillance du Phytoplancton et de l'hydrologie dans les eaux littorales (REPHY) :

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 \(MTES ex-MEEM\)](#), à l'[OFB](#) (Office Française pour la Biodiversité), et aux Agences de l'Eau des façades littorales (AEAP, AESN, AELB, AEAG, AERMC2) pour la réponse aux Directives européennes DCE et 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, de l'Alimentation (MAA, ex MAAF), pour l'application de la réglementation relative au suivi de la salubrité des zones de production de coquillages, incluant la surveillance du phytoplancton toxique qui contribue à la mise en œuvre de la surveillance des phycotoxines.

La surveillance du phytoplancton et des paramètres hydrologiques dans les masses d'eaux désignées en contrôle de surveillance et en contrôle opérationnel dans le cadre de la DCE, fait l'objet de conventions avec l'[OFB](#) et avec les cinq Agences de l'Eau concernées par le littoral.

La surveillance des espèces phytoplanctoniques toxigènes ou suspectes est incluse dans la subvention pour charge de services publics, en application de la Loi de Finances (programme 206 - sécurité et qualité sanitaires de l'alimentation, sous-action n°37) attribuée dans le cadre d'une convention avec la DGAL.

Les modalités de la surveillance assurée par le REPHY sont détaillées dans le cahier de Procédures REPHY qui rassemble les contraintes et obligations nationales en termes de programmation. Celles-ci incluent les aspects institutionnels, par exemple les obligations relevant de la DCE, [mais aussi les recommandations scientifiques ayant émergé ces dernières années, suite aux travaux réalisés et publiés sur les données historiques de surveillance, et aux groupes de réflexion qui ont contribué à l'optimisation du REPHY. Cette optimisation s'est déroulée entre mi 2013 et mi 2016, et a abouti à déterminer trois composantes :](#)

- le **REPHY Observation**, qui a pour objectif de répondre à des questions de recherche. Ce réseau inclut les lieux labellisés **PHYTOBS**.
- le **REPHY Surveillance**, qui complète le réseau d'Observation pour répondre aux directives européennes (DCE et DCSMM) pour le phytoplancton et l'hydrologie
- le **REPHY Sanitaire**, qui complète les deux autres pour le déclenchement de prélèvements de coquillages effectués dans le cadre du REPHYTOX

## 2 DOMAINE D'APPLICATION ET STRATÉGIE

Ce manuel vise à décrire les protocoles usuellement appliqués par les équipes de l'Ifremer dans le cadre du Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie dans les eaux littorales (REPHY), pour l'estimation de l'abondance et de la composition taxinomique du phytoplancton marin, en nombre de cellule par litre, dans un échantillon d'eau fixée au lugol, à l'aide d'un microscope inversé.

Les résultats de ces analyses attendus dans le cadre des objectifs du REPHY cités en introduction sont bancarisés dans la base de données Quadrige.

Les protocoles appliqués s'inspirent des lignes directrices de la norme NF EN 15204 fondée sur la technique de sédimentation classique telle que définie par Utermöhl en 1958.

Ce manuel ne concerne pas : la collecte d'échantillon sur le terrain, l'analyse du picoplancton, l'analyse quantitative d'amas flottant de cyanobactéries, ni l'estimation de biovolume.

Les recommandations inscrites dans ce manuel visent à optimiser la durée d'une analyse tout en conservant un bon niveau de qualité du résultat.

La validation des résultats repose sur le système qualité du laboratoire incluant la traçabilité, la métrologie, les contrôles qualité, et la participation à des essais d'inter-comparaisons intra et inter laboratoires.

La méthodologie décrite dans ce document n'interdit pas l'application d'autres recommandations inscrites dans la norme NF EN 15204 sauf en ce qui concerne les méthodes appliquées aux échantillons des lieux labellisés PHYTOBS pour les quels un protocole **PHYTOBS** est à appliquer strictement. Ces spécifications sont décrites dans le présent document.

Mnémonique	Libellé
002-P-007	Point 1 Boulogne
006-P-001	At so
010-P-109	Cabourg
022-P-018	les Hébihens
027-P-028	Loguivy
040-P-017	Kervel large
047-P-016	Concarneau large
055-P-001	Men er Roue
063-P-002	Ouest Loscolo
079-P-026	Le Cornard
082-P-001	Auger
088-P-050	Teychan bis
095-P-002	Barcares
097-P-002	Parc Leucate 2
104-P-001	Bouzigues (a)

Tableau 1 : Liste des lieux REPHY labellisés PHYTOBS



Figure 1 : carte des lieux PHYTOBS

### 3 DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE

Le Cahier de Procédure REPHY liste les documents de référence qui composent les instructions générales.

Les points suivants listent les documents de référence qui concernent plus spécifiquement l'objet du présent manuel.

#### 3.1 DOCUMENTS À CARACTÈRE RÉGLEMENTAIRE

Pour le phytoplancton en tant qu'indicateur biologique

**Directive n° 2000/60/CE du 23 octobre 2000** du Parlement européen et du Conseil, établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.

*Cette directive établit un cadre pour la protection des eaux intérieures de surface, des eaux de transition, des eaux côtières et des eaux souterraines. Elle définit le « bon état écologique » à atteindre pour une « masse d'eau » déterminée géographiquement. Pour les eaux côtières, ce bon état écologique englobe (annexe 5 de la Directive, éléments de qualité biologique) la composition et l'abondance des taxons phytoplanctoniques.*

**Arrêté du 27 octobre 2011** portant modalités d'agrément des laboratoires effectuant des analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques au titre du code de l'environnement.

*L'arrêté indique : le laboratoire national de référence pour la surveillance de l'eau et des milieux aquatiques (AQUAREF) définit les méthodes associées aux éléments de qualité biologiques. Ces méthodes sont publiées conformément aux conditions définies dans l'article 12 du présent arrêté.*

*Ceci concerne, entre autres, le paramètre phytoplancton avec de plus un délai maximal de 18 mois pour s'assurer que les prélèvements sont réalisés soit par un organisme accrédité, soit par une personne habilitée des services de police de l'environnement.*

**Avis du 04 février 2012** relatif aux méthodes des couples « élément de qualité biologique – méthode » sur lesquels porte l'agrément des laboratoires.

*Ces méthodes ainsi que leurs dates d'entrée en vigueur sont mises en ligne sur le site Internet de gestion des agréments du ministère chargé de l'environnement ([www.labeau.ecologie.gouv.fr](http://www.labeau.ecologie.gouv.fr)).*

#### 3.2 DOCUMENTS NORMATIFS

Le présent document est rédigé en s'appuyant principalement sur les normes :

**NF EN 15204**, Qualité de l'eau – Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode d'Utermöhl). Parue en décembre 2006.

*Pour certains points, peu ou pas abordés dans la précédente norme et en lien avec le traitement de l'échantillon, ce manuel s'appuie aussi sur :*

**NF EN 15972**, Guide pour l'étude quantitative et qualitative du phytoplancton marin. Parue en décembre 2011.

Ces normes sont des normes françaises et européennes commercialisées par AFNOR Éditions (Association Française de Normalisation)

<https://www.boutique.afnor.org/recherche/resultats/mot/phytoplancton>



### 3.3 DOCUMENTS QUALITÉ

#### 3.3.1 DOCUMENTS QUALITÉ GÉNÉRAUX

**Norme NF EN ISO/CEI 17025** : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. Version en vigueur. ([Commercialisée par AFNOR Éditions](#))

**LAB Réf 02.** Version en vigueur. Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 ; document du COFRAC.

**LAB-REF-18** du COFRAC (exigences spécifiques - analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques au titre du code de l'environnement) est **applicable depuis le 1er janvier 2012**.

*Il définit les exigences à satisfaire par les laboratoires œuvrant dans le cadre de l'arrêté du 27 octobre 2011 et ce, conformément aux obligations imposées par le ministère chargé de l'environnement et aux textes réglementaires en vigueur, en vue d'obtenir l'agrément pour ces activités.*

Les documents COFRAC (Comité français d'accréditation) sont téléchargeables sur le site du COFRAC <https://tools.cofrac.fr/fr/documentation>

#### 3.3.2 DOCUMENTS QUALITÉ IFREMER

Chaque laboratoire dispose d'un système documentaire nécessaires pour :

- répondre aux exigences des documents qualité généraux de référence,
- assurer l'application des instructions nationales du cahier des procédures REPHY,
- assurer la traçabilité et la qualité des résultats, du prélèvement à la saisie des données dans la base Quadrige,
- assurer le contrôle et la validation des données dans la base Quadrige<sup>2</sup>.

Dans le cadre du projet qualité de l'Ifremer, la certification ISO 9001 a été obtenue en novembre 2012, pour l'ensemble de nos sites et l'ensemble de nos activités.

Un site intranet est dédié à cette démarche : <https://w3z.ifremer.fr/qualite/>

### 3.4 DOCUMENTS ET OUTILS D'APPUI AUX DÉTERMINATIONS

La liste de référence des taxons phytoplanctoniques potentiellement identifiables se trouve dans le référentiel taxinomique de la base de données Quadrige<sup>2</sup>, qui s'appuie sur le référentiel mondial **WORMS**<sup>1</sup>.

Chaque LER doit connaître la liste des taxons historiquement identifiés dans leurs secteurs géographiques.

Une liste non exhaustive des documents et outils d'aide à la détermination est fournie en ANNEXE I. Les laboratoires disposent de tout ou partie de ces références.

---

<sup>1</sup> WORMS = World Register of Marine Species - <http://www.marinespecies.org/index.php>

### 3.5 AUTRES DOCUMENTS

D. Soudant, L. Miossec, 2013. Note bibliographique : Incertitude des mesures phytoplanctoniques. DYNECO/VIGIES/13-10/DS

IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae - a product of the IOC Harmful Algal Bloom Programme and the World Register of Marine Species.  
<http://www.marinespecies.org/hab/>

NF EN 16695 – Qualité de l'eau – Lignes directrices pour l'estimation du biovolume des microalgues.

## 4 TERMES ET DÉFINITIONS

**Chambre de sédimentation** (aussi appelée **cuve** de sédimentation) : enceinte en général tubulaire, dont la face inférieure est une lamelle d'observation au microscope (épaisseur de quelques 10<sup>ème</sup> de mm), et la face supérieure une lame de verre.

**Champ de comptage du microscope** : zone délimitée (par exemple un carré ou une grille) dans le champ de vision du microscope, utilisée pour le dénombrement. Ce champ est positionné au niveau de l'oculaire. Le champ de comptage peut aussi correspondre au champ oculaire dans sa totalité.

**Cœnobe** : ensemble pluricellulaire, numériquement et morphologiquement défini (le nombre de cellule d'un cœnobe est généralement égal à une puissance de deux). Le cœnobe correspond à une unité dans laquelle on reconnaît une harmonie et une solidarité fonctionnelles entre les individus. Exemple : *Scenedesmus*, *Pediastrum* (Chlorophycées).

**Conservation** : processus qui protège les substances organiques contre la décomposition.

**Echantillon d'eau** : c'est une partie représentative du prélèvement d'eau.

**Erreur** : différence entre un résultat individuel et la valeur vraie.

**Fixation** : protection contre la désintégration de la structure morphologique des organismes.

**Incertitude** : valeur associée au résultat d'un comptage qui caractérise la dispersion des valeurs qui peut être raisonnablement attribuée à l'objet mesuré.

**Lecture, comptage, dénombrement** : réalisation de l'identification des espèces phytoplanctoniques présentes dans la cuve et leur dénombrement dans un volume élémentaire (totalité ou partie de la cuve).

**Microplancton** : organismes planctoniques de taille supérieure à 20 µm.

**Nanoplancton** : organismes planctoniques de taille comprise entre 2 µm et 20 µm.

**Objet algal** : unité/groupe d'une ou plusieurs cellules d'algues, rencontré(es) lors de l'analyse du phytoplancton, qui est indépendant(e) (peut sédimenter de manière indépendante) des autres particules de l'échantillon.

**Phycome** : Colonie globuleuse, forme enkystée à double paroi, typique chez *Halosphaera*, *Pachysphaera* ou *Pterosperma*, correspondant au stade non mobile du cycle de vie de ces cellules.

**Phytoplancton** : communauté d'organismes libres en suspension principalement photosynthétiques dans les systèmes aquatiques, comprenant les cyanobactéries et les algues.

**Picoplancton** : organismes planctoniques de taille comprise entre 0,2 µm et 2 µm.

**Prélèvement d'eau** : c'est une partie représentative d'une masse d'eau, sur un point de prélèvement donné, à une date et une heure donnée, avec un engin de prélèvement donné à une profondeur donnée (ou sur une partie de la colonne d'eau, en cas de prélèvement intégré).

**Validation** : confirmation par examen et preuves tangibles que les exigences particulières pour un usage spécifique prévu sont satisfaites.

**Nota** : la validation au sens de la base Quadriga est l'action effectuée dans la base qui certifie que l'opération de contrôle a été réalisée, en vérifiant la cohérence entre les données saisies dans la base et le cahier de laboratoire.

## 5 ÉQUIPEMENT ET ENVIRONNEMENT

### 5.1 CONSIGNES DE SÉCURITÉ

Les utilisateurs doivent connaître les consignes générales de sécurité et mettre en place les pratiques appropriées en matière d'hygiène et sécurité.

Plus spécifiquement, en ce qui concerne l'objet de ce manuel, l'utilisateur doit savoir que le travail au microscope est considéré comme un travail à forte charge visuelle dans le domaine de la sécurité du travail.

L'analyse microscopique du phytoplancton pendant de longues durées peut engendrer de la fatigue physique et influencer sur la vue.

Afin de prévenir les risques :

Il convient de veiller à bien doser l'intensité du faisceau lumineux afin que l'éclairage dans les oculaires soit suffisant mais pas trop intense.

Il convient aussi de prêter attention aux caractéristiques ergonomiques du poste de travail.

Il convient de pratiquer des poses régulières, et d'éviter, autant que possible, des séquences de travail supérieures à 4 heures par jour, particulièrement lorsque cette activité est effectuée quotidiennement.

*Note : en cas d'interruption d'un comptage en cours, il faut signaler de manière visible qu'un comptage est en cours, et noter si possible la position de la platine grâce aux échelles verticale et horizontale qui la bordent ou à partir de repères disposés sur la platine à cet usage.*

L'emploi des produits chimiques mentionnés dans ce manuel peut être dangereux pour l'utilisateur et/ou pour l'environnement. Les utilisateurs doivent suivre les recommandations des fabricants, et des fiches toxicologiques de l'iode et du formol qui doivent être disponibles aux endroits où ces produits sont stockés ou utilisés.

*Note : Attention l'iode peut réagir violemment avec certains métaux, tels que l'aluminium.*

La solution de lugol utilisée et le formol sont des produits dangereux pour l'environnement, les déchets doivent donc être conservés dans des récipients étanches clairement étiquetés et être éliminés dans les conditions autorisées par la réglementation.

Pour plus de renseignement concernant l'hygiène et sécurité en laboratoire, l'Ifremer dispose d'un site intranet consultable à l'adresse suivante :

<http://w3z.ifremer.fr/securite/>

L'organisme de référence dans le domaine de la santé et la sécurité au travail est l'INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité : <http://www.inrs.fr/>)

## 5.2 ÉQUIPEMENTS

### 5.2.1 MICROSCOPE

Le laboratoire doit être équipé au moins d'un microscope inversé à contraste de phase avec les caractéristiques préférentielles suivantes :

- source lumineuse halogène de 50 à 100 W. 100 W de préférence ou équivalent en LED.
- condenseur avec une ouverture numérique (ON)  $\geq 0.3$  /contraste de phase et une longue distance de travail (ULWD : Ultra Long Working Distance)
- objectifs plans fluorite phase de x 10 (ON = 0.3), x 20 (ON  $\geq 0.45$ )
- objectif plan fluorite x 40 (ON  $\geq 0.60$ ) avec une bague de correction d'épaisseur
- accessoirement un objectif achromatique x 4 (ON 0.10)
- oculaires grand champ (Field number F.N.  $\geq 22$  mm) de grossissement x 10
- micromètre oculaire (réticule) étalonné pour chaque objectif
- platine mobile actionnée par des commandes coaxiales et équipée de réglettes (X,Y)

Si l'appareil est équipé d'une bague de grossissement supplémentaire (x 1.5 ou x 1.6) l'objectif x 20 devient inutile, car le balayage de la chambre de sédimentation peut se faire avec l'objectif x 10 couplé à la bague x 1.5.

Ces spécifications diffèrent, volontairement, légèrement, de celles préconisées dans la norme NF EN 15204 car elles sont mieux adaptées pour les observations en cuves (ON plus faibles avec longues distances de travail). De plus, il vaut mieux privilégier l'optique que prendre un statif très performant (donc très coûteux). Un statif milieu de gamme avec un seul port photo/vidéo suffit.

Afin d'améliorer l'identification des cellules et en particulier les dinoflagellés cuirassés, il est souhaitable que le laboratoire soit équipé d'un microscope à épi-fluorescence avec les caractéristiques suivantes :

- un statif de milieu de gamme type Olympus IX53/Zeiss AxioVert/Leica DM IL, Nikon Eclipse Ti-S. Il vaut mieux privilégier l'optique que de prendre un statif trop performant. Equipé d'un port photo/vidéo.
- un condenseur à très longue distance de travail ELWD et O.N de 0.30 / contraste de phase. Surtout ne pas prendre un condenseur avec ON plus grande mais courte distance de travail, c'est inconfortable et inadapté
- objectifs : 4/0.10 achromatique (suffit amplement), 10/0.30 plan fluorite phase, 20/0.45 plan fluorite phase (avec bague de correction d'épaisseur), 40/0.60 plan fluorite phase (LWD) avec bague de correction d'épaisseur (c'est très important).
- une platine à mouvements orthogonaux équipée de réglettes de repérage
- oculaires grand champ (F.N.>22) dont un avec micromètre
- éclairage suffisamment puissant (100W ou équivalent en LED)

Pour la partie fluorescence, cet équipement n'est envisagé que pour 2 applications (étude des tabulations de dinoflagellés à thèque et autofluorescence de la chlorophylle pour évaluer l'état des cellules), deux combinaisons de filtres sont suffisantes.

- système d'éclairage pour la fluorescence (vapeur de mercure ou LED de préférence)
- tourelle porte cubes (si pas intégrée au statif)
- 2 cubes : excitation UV (DAPI) et bleu (FITC/Chlorophylle), on pourra toujours en rajouter par la suite si des besoins apparaissent.

Afin de permettre la confirmation de la détermination spécifique par consultation d'un expert, ainsi que de constituer une base documentaire photographique, il est recommandé qu'au moins un microscope du laboratoire soit équipé d'un appareil photo numérique ou d'une caméra.

Les consignes de maintenance et d'entretien préconisées par le constructeur doivent être respectées et toute intervention de maintenance doit être tracée. Une visite annuelle est requise via un contrat de maintenance souscrite auprès d'un professionnel.

Le microscope doit être positionné sur une surface horizontale et stable et ne doit pas être exposé à la lumière directe du soleil, **pour l'épifluorescence il est même nécessaire de pouvoir travailler dans l'obscurité.**

Les analyses étant réalisées sur de l'eau de mer et le sel étant extrêmement corrosif, le nettoyage doit être systématique et méticuleux, sous peine d'endommagement irréversible du matériel.

Afin de préserver toutes les performances du microscope et de limiter les particules parasites, Il convient de protéger le microscope des poussières en le couvrant d'une housse entre deux usages.

Avant chaque usage il convient d'effectuer les réglages préconisés dans les documents du constructeur.

Des opérations de contrôle métrologique sur le micromètre oculaire et sur les diamètres des champs pour chaque grossissement doivent être réalisées (cf. 9.2 Métrologie et ANNEXE II).

**Chaque microscope doit disposer d'un dossier comprenant au moins :**

- **Les documents du constructeur (à lire attentivement)**
- **Un document d'enregistrement des opérations de maintenance**
- **La fiche d'enregistrement des contrôles métrologiques de l'appareil**

### 5.2.2 RÉFRIGÉRATEUR

Le laboratoire estime les volumes nets nécessaires des réfrigérateurs en fonction du volume d'échantillons traités par celui-ci.

**Les températures de stockage des échantillons vivants ou fixés indiquées dans les normes NF EN 15204 et NF EN 15972 sont les suivantes :**

- Pour le stockage des échantillons d'eau non fixés le réfrigérateur doit permettre une température de 4 à 10 °C.
- Pour le stockage de longue durée des échantillons fixés, la température recommandée est comprise entre 1 et 5 °C.

Les réfrigérateurs font l'objet d'un contrôle régulier de la température.

Le système de froid statique est suffisant, et particulièrement recommandé pour les échantillons non fixés, dans ce cas la sonde de contrôle de la température devra être disposée dans la partie haute de l'enceinte du réfrigérateur (la partie la plus chaude).

## 5.3 MATÉRIELS ET PRODUITS

### 5.3.1 LAME ÉTALON



Figure 2 : Image d'une lame micromètre étalon

Cette lame, généralement constituée par la gravure d'un millimètre divisé en 100 parties de 10  $\mu\text{m}$  sous une lamelle, permet l'étalonnage du micromètre oculaire (observation lamelle tournée vers l'objectif). Ce micromètre étalon doit être certifié par le fabricant.

### 5.3.2 FLACONNAGE



Figure 3 : photos de flaconnages de terrain

Flaconnage de prélèvement :

- Flacons n'ayant jamais contenu de fixateur, ces flacons sont utilisés pour les échantillons d'eau brute non fixée.
- Flacons ayant déjà servi pour un échantillon d'eau fixé au lugol (parois colorées en brun).
- Flacons bruns.

Pour les prélèvements, le transport et un stockage de courte durée, ils peuvent être en polyéthylène (PE), polypropylène (PP) ou en chlorure de polyvinyle (PVC).

De préférence à col large pour faciliter le remplissage sur le terrain. En générale d'un litre de volume et au minimum de 250 mL.

Il est utile de marquer le niveau de l'échantillon afin d'en contrôler l'éventuelle évaporation ultérieure. Ce marquage des flacons peut être permanent et correspondre à environ 80% du volume du flacon et donc au niveau maximum de remplissage afin de faciliter l'homogénéisation de l'échantillon.

#### Prescriptions spécifiques pour les prélèvements sur les lieux labellisés PHYTOBS :

Utiliser obligatoirement un flacon en verre transparents de 250 mL (voir flaconnage de stockage longue durée) et fixer l'échantillon obligatoirement au lugol acide. Ceci en plus d'un échantillon d'eau brute non fixée qui pourra servir aux identifications.



Flaconnage de stockage longue durée :

Pour une conservation de longue durée les échantillons sont transférés dans des flacons en verre transparent de préférence afin de pouvoir contrôler la décoloration due à l'oxydation du lugol.

Figure 4 : photos de flaconnages de stockage longue durée

### 5.3.3 CHAMBRE DE SÉDIMENTATION

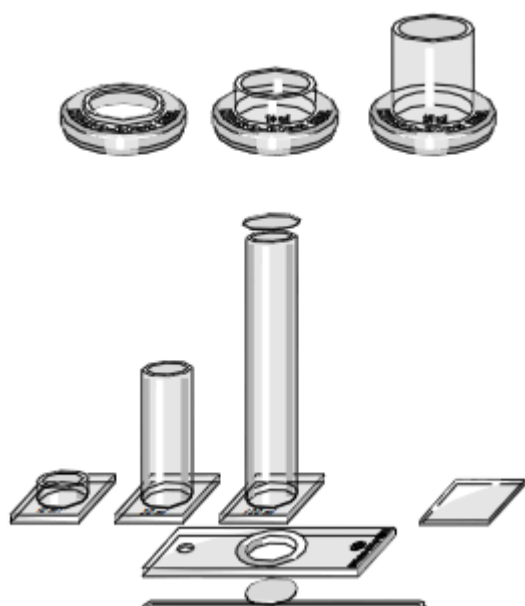


Figure 5 : images de chambres de sédimentation

Les chambres de sédimentation couramment utilisées par les observateurs du REPHY sont cylindriques, d'un volume de 10 mL.

Ce volume peut être porté à 20 ou 25 mL, pour des eaux peu turbides et peu chargées en phytoplancton. Inversement, pour les eaux très turbides ou très chargées en phytoplancton des cuves de 1 ou 5 mL peuvent être utilisées.

Les chambres d'un volume supérieur (50 ou 100 mL) présentent l'inconvénient que la sédimentation peut être gênée par la formation de courants de convections au sein de la colonne d'eau. Elles sont donc déconseillées pour réaliser des flores totales, mais peuvent être utilisées en complément d'une cuve de 10 mL, pour la détection des espèces rares.

L'épaisseur de la lamelle basale ne doit de préférence pas être supérieure à 0,17 mm.

**Le volume de chaque cuve est contrôlé selon les méthodes métrologiques appliquées pour les volumes (cf. 9.2 Métrologie).**

Chaque cuve doit être étiquetée ou gravée d'un identifiant unique permettant d'enregistrer les contrôles métrologiques effectués et d'assurer la traçabilité des échantillons analysés.

Les chambres de sédimentation (et leur couvercle) sont nettoyés entre deux utilisations (Cf. 5.3.6.2 Produits de nettoyage et nettoyage du matériel).

Les fonds de cuves sont très fragiles et doivent être remplacés régulièrement. Leur état doit être contrôlé lors du nettoyage.



### 5.3.4 PIPETTES

Le remplissage des chambres de sédimentation peut se faire soit directement à partir du flacon si son col le permet [ce qui est obligatoire pour les échantillons des lieux labellisés PHYTOBS](#), soit avec une pipette de transfert de volume adéquat. Le pipetage s'effectue à l'aide d'une poire d'aspiration. Il convient de choisir des pipettes dont l'extrémité est assez large (> 4 mm) pour ne pas rompre d'éventuelles colonies de phytoplancton, ou exclure des cellules de grande taille.

Le volume des chambres de sédimentation étant contrôlé métrologiquement, il n'est pas utile de contrôler celui des pipettes.

### 5.3.5 COMPTEUR DE CELLULE

Différents types de compteurs manuels de cellules, empruntés aux compteurs de type analyse médicale (analyse sanguine) sont proposés dans le commerce. Ils peuvent être une aide utile pour le dénombrement des taxons les plus abondants d'un échantillon. Ils peuvent être manuels ou à affichage digital, à simple ou multiples touches. Les compteurs manuels évitent tout effacement accidentel du décompte.



Figure 6 : photos de différents types de compteurs de cellule

Il convient d'effectuer un **contrôle de bon fonctionnement du compteur** et de le **remettre zéro** avant toute utilisation.

### 5.3.6 PRODUITS

#### 5.3.6.1 PRODUITS DE FIXATION

Dans le cadre du REPHY, le fixateur utilisé habituellement est le lugol acide.

**Préparation du lugol acide** : effectuer la dissolution sous hotte et porter des gants en nitrile et des lunettes de protection. Dissoudre 100 g de KI (iodure de potassium) dans 1 L d'eau distillée ou déminéralisée, puis ajouter 50 g d'iode (cristallin), agiter jusqu'à complète dissolution puis ajouter 100 g d'acide acétique glacial (préparation à réaliser dans l'ordre en s'assurant que le composant précédent a été complètement dissous avant d'ajouter le suivant). Lorsque la solution est proche de la saturation, il convient d'éliminer tout précipité éventuel en faisant décanter la solution avant l'utilisation. Cette solution doit être conditionnée dans un flacon brun sombre étiqueté (Lugol acide – date de fabrication) et peut être stockée pendant au moins un an à température ambiante à l'abri de la lumière.

Dans la perspective de l'utilisation de l'épi-fluorescence, l'utilisation du lugol neutre est préférable, car l'acide nuit à la coloration des plaques celluloses par le calcofluor. Si le lugol acide est tout de même utilisé, il est possible d'ajouter une goutte de solution de soude (NaOH) au moment de l'ajout du calcofluor. La préparation du lugol neutre est identique à celle du lugol acide sans ajout d'acide acétique.

L'usage du formol est réservé aux cas particuliers tels que la conservation sur de longues durées ou la fixation des échantillons très concentrés (cas des traits de filet à plancton). Le formol utilisé est de préférence neutre à faiblement basique soit pour 1 L de formaldéhyde à 20 % ajouter 100 g d'hexaméthylènetétramine (hexamine,  $C_6H_{12}N_4$ ) et filtrer après une semaine pour éliminer tout précipité.

En raison des risques induits sur la santé des utilisateurs, le formol doit être manipulé avec des gants (caoutchouc nitrile ou néoprène), des lunettes de sécurité et sous hotte aspirante.

#### 5.3.6.2 PRODUITS DE NETTOYAGE ET NETTOYAGE DU MATÉRIEL

Pour le nettoyage des cuves à sédimenter et des flacons ayant contenu un échantillon lugolé et tout autre matériel ayant contenu de l'eau lugolée, afin de s'assurer de l'élimination de toutes les particules, l'usage d'un détergent alcalin à haute rinçabilité est préconisé.

Les flacons sont vidés, rincés à l'eau du robinet, remplis d'eau + détergent alcalin, frottés à l'aide d'un écouvillon, rincés à l'eau du robinet puis séchés. Une machine à laver le matériel de laboratoire peut être utilisée.

Le nettoyage des cuves comprend le vidage, le trempage et lavage avec du détergent à l'aide d'un pinceau souple, le rinçage à l'eau courante puis à l'eau distillée pour éviter les traces résiduelles. La base métallique est frottée à l'aide d'une brosse légèrement plus rigide afin d'éliminer le sel et les traces de corrosion.

L'usage du méthanol, de l'éthanol, de l'alcool « dénaturé » industriel, l'isopropanol ou l'acétone est à proscrire, en raison de leur toxicité d'une part et de la sensibilité des parois des cuves à ce type de solvant d'autre part.

Le nettoyage des cuves ne doit pas endommager les surfaces internes des parois qui doivent être maintenues lisses afin d'éviter l'accrochage des cellules lors de la sédimentation.

La procédure de nettoyage appliquée par le laboratoire doit faire l'objet d'un contrôle régulier (Cf. 9.1 et ANNEXE V)

Pour le nettoyage des parties optiques du microscope (oculaires et objectifs), aucun détergeant ne doit être utilisé. L'essuyage est réalisé uniquement à l'aide de papier optique non abrasif.

## 6 STRATÉGIES D'ANALYSE

Trois stratégies d'analyses sont appliquées dans le cadre du REPHY (FLORTOT, FLORIND, FLORPAR cf. Cahier de Procédure REPHY en vigueur) :

Quelle que soit la stratégie, le résultat final du dénombrement dans la chambre de sédimentation est converti pour obtenir une concentration en nombre de cellule par litre.

### 6.1 FLORES TOTALES (FLORTOT)

*Cette stratégie de dénombrement est appliquée sur tous les lieux du REPHY observation*

C'est l'identification et le dénombrement de toutes les cellules phytoplanctoniques présentes dans la chambre de sédimentation et pouvant être identifiées dans les conditions d'observation, c'est à dire globalement toutes les cellules dont la taille est supérieure à 20 µm, et celles dont la taille est inférieure mais qui sont en chaîne ou colonie. Les cellules plus petites sont dénombrées seulement quand elles sont potentiellement toxiques ou qu'elles présentent de fortes abondance (> 100 000 cellules/L).

D'une manière générale, le zooplancton tel que les tintinnidés (Ciliophora), les larves de coquillage ou de poisson ne sont pas dénombrés. Toutefois, *Mesodinium rubrum* qui fait partie des Ciliophora fait l'objet d'une attention particulière car d'une part, il intervient dans la chaîne trophique de *Dinophysis*, et, d'autre part, il peut provoquer une coloration rouge vif des mollusques (cf. fiche MESORUB du classeur : Guide pratique à l'usage des analystes du phytoplancton – E. Nézan et G. Piclet ISBN 2-910373-21-5). Comme *Mesodinium rubrum* est difficile à reconnaître, tous les ciliés d'une morphologie approchante, sont saisis sur le taxon Ciliophora ou, s'il est formellement identifié, son dénombrement est saisi sur le taxon *Mesodinium rubrum*.

### 6.2 FLORES INDICATRICES (FLORIND)

*Cette stratégie de dénombrement est appliquée sur tous les lieux du REPHY surveillance (DCE)*

C'est l'identification et le dénombrement *à minima* :

- des *Alexandrium*, *Dinophysis* et *Pseudo-nitzschia* identifiés au niveau de l'espèce, du genre ou du complexe ou groupe d'espèce (cas des *Pseudo-nitzschia*),
- de tous les taxons présents dans la chambre de sédimentation à une concentration supérieure à 100 000 cellules par litre, toxiques ou non ; identifiés de préférence au niveau de l'espèce ou bien du genre (correspondant au dénombrement d'une seule espèce du genre). En cas de bloom de plusieurs espèces du même genre il est nécessaire d'identifier chaque espèce. En cas de difficulté d'identification, on sollicitera le réseau de soutien et expertise (cf. 9.4).

*NOTE : L'indice Abondance décrit dans le guide relatif aux règles d'évaluation de l'état des eaux littorales correspond au pourcentage d'échantillons d'eau avec au moins un bloom d'un taxon unique, sur six ans. Un bloom est défini par un nombre de cellules/L > 100 000 (grandes cellules > 20 µm) ou > 250 000 (petites cellules < 20 µm). Il est donc pénalisant de saisir des blooms sur un niveau phylogénique trop élevé ou englobant le comptage de plusieurs espèces.*

### 6.3 FLORES PARTIELLES (FLORPAR)

Cette stratégie de dénombrement est appliquée principalement dans le cadre sanitaire strict. Dans ce cas les trois genres toxiques principaux, *Dinophysis*, *Alexandrium* et *Pseudo-nitzschia* sont obligatoirement recherchés et les résultats sont communiqués dans le cadre de la surveillance sanitaire officielle (bulletin info-toxines) et saisis dans Quadrigé quelle que soit l'abondance (Zéro compris).

Par ailleurs, toute espèce toxique ou nuisible présente dans l'échantillon doit être dénombrée (cf. liste des espèces cibles en ANNEXE VIII)

Dans d'autres cas, hors surveillance sanitaire (eaux colorées, événement exceptionnel...) ce sont des flores simplifiées pour lesquelles aucune contrainte n'est imposée et pouvant être réduites au dénombrement d'un seul taxon cible dans la chambre de sédimentation.

**NB : Pour les FLORIND et FLORPAR**

Tous les genres ou espèces cités dans le catalogue des micro-algues toxiques, nuisibles ou douteuses du site de IOC-UNESCO (IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae - **a product of the IOC Harmful Algal Bloom Programme and the World Register of Marine Species**. <http://www.marinespecies.org/hab/>) **doivent** être ajoutés aux dénombrements, **lorsqu'elles sont présentes**.

Une attention particulière est portée sur la liste des taxons "cibles" de France (cf. ANNEXE VIII).

Ces taxons sont difficiles à identifier avec certitude en microscopie photonique. Si leur identification est certifiée par des techniques complémentaires, le dénombrement est saisi au niveau de l'espèce, dans le cas contraire la saisie se fait au niveau du genre **ou du taxon virtuel correspondant** (cf. ANNEXE VII).

Les genres *Karenia*, *Heterocapsa*, *Fibrocapsa* et *Pseudochattonella* renferment des espèces ichtyotoxiques qui peuvent avoir un impact sur la faune en cas de bloom. De tailles inférieures à 20 µm, ils sont difficiles à reconnaître en microscopie photonique. Toutefois en cas de prolifération massive, l'observateur est alerté et peut solliciter une expertise, le cas échéant.

## 7 TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

### 7.1 RÉCEPTION

Le laboratoire doit se munir d'une procédure de réception des échantillons décrivant les étapes entre l'arrivée d'un échantillon et sa préparation pour l'analyse. Celle-ci doit préciser au minimum : où les échantillons sont pris en charge et par qui, que faire en l'absence de responsable, quels sont les critères d'acceptation des échantillons.

Les critères d'acceptabilités minimum et principaux sont :

- Flacon étanche rempli par l'échantillon à hauteur d'environ 80 %
- Échantillon correctement identifié permettant de connaître au minimum le lieu, la date et l'heure du prélèvement et de faire le lien avec tous les renseignements liés (niveau, engin de prélèvement, agent préleveur, paramètres physico-chimiques mesurés *in situ*, etc).

Chaque échantillon réceptionné, accepté ou non selon les critères établis, doit être enregistré dans un document. Les raisons de la non acceptation de l'échantillon y sont tracées. Il est d'usage d'attribuer un numéro d'enregistrement incrémenté pour chaque échantillon et d'inscrire ce numéro sur le flacon.

### 7.2 CONSERVATION : FIXATION ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Dans le cadre du REPHY, les échantillons peuvent être de deux types, soit ce sont des échantillons dit "frais" ou "vivants" ne contenant pas de fixateur, soit l'échantillon est fixé (généralement au lugol acide ou neutre au moment du prélèvement). Le stockage est différent selon les cas.

#### 7.2.1 FIXATION DE L'ÉCHANTILLON

Afin d'éviter la perte de cellules phytoplanctoniques, la fixation doit avoir été réalisée immédiatement lors du transfert du prélèvement dans le flacon d'échantillonnage (cf. p 13 NF EN 15972).

Pour un flacon d'1 litre, la quantité de lugol à ajouter varie entre 1 et 10 mL en fonction de la densité algale. **Il est toutefois recommandé d'éviter une sursaturation de coloration des algues ce qui rend leur identification difficile. La couleur de l'échantillon doit virer au jaune paille ou couleur Cognac.**



Une post-fixation avec du formaldéhyde est recommandée si l'échantillon doit être stocké pendant plus de 12 mois ou s'il contient une grande quantité de matière organique. Toutefois, cela détruit irrémédiablement l'ADN et par conséquent rend toute expertise avec des techniques moléculaires, impossible ultérieurement.

~~Les autres fixateurs cités dans les normes de référence peuvent être utilisés et sont choisis par les laboratoires en fonction des recommandations des normes.~~

## 7.2.2 STOCKAGE DE L'ÉCHANTILLON

Les échantillons non fixés (vivant) servent à une analyse [qualitative](#) préliminaire ou à la confirmation de l'identification de certains taxons. Ces échantillons doivent être conservés à l'abri de la lumière à une température comprise entre 4 et 10 °C (l'abaissement de la température doit être réalisé progressivement afin de ne pas endommager les cellules phytoplanctoniques). L'analyse doit être effectuée dans les 36 heures suivant le prélèvement. Il est recommandé de laisser le flacon ouvert pour éviter l'appauvrissement en oxygène.

Le flaconnage utilisé pour le prélèvement sur le terrain est usuellement en matière plastique pour éviter la casse ([à l'exception des prélèvements sur les lieux PHYTOBS qui sont déjà conditionnés en flacons en verre](#)). Pour protéger l'intégrité de l'échantillon fixé, lors d'une conservation prolongée (> 3 mois), il est recommandé de transvaser l'échantillon dans un flacon en verre.

Les échantillons fixés, dont l'analyse est prévue dans les [quatre semaines maximum](#) qui suivent le prélèvement, doivent être conservés à l'abri de la lumière, [il est possible de les stocker](#) à température ambiante [mais préférablement au frais](#).

Après l'analyse, et à l'appréciation du laboratoire, les échantillons peuvent être conservés pour une plus longue durée. Dans ce cas la température de stockage est comprise entre 1 et 5 °C. Dans ces conditions, la qualité de l'échantillon est préservée pendant environ 12 mois à condition de contrôler régulièrement l'oxydation du lugol et d'ajuster la coloration en ajoutant de la solution de lugol le cas échéant. Même dans ces conditions, le stockage longue durée ne garantit pas la conservation de l'intégralité de tous les organismes présents à l'origine.

[Dans tous les cas il est recommandé de marquer le niveau de l'échantillon afin d'en contrôler l'éventuelle évaporation.](#)

## 7.3 DÉLAIS D'ANALYSE

Les analyses réalisées dans le cadre de la détection et du suivi des espèces phytoplanctoniques productrices de toxines (volet sanitaire) sont réalisées le plus rapidement possible et au moins durant la semaine suivant le prélèvement.

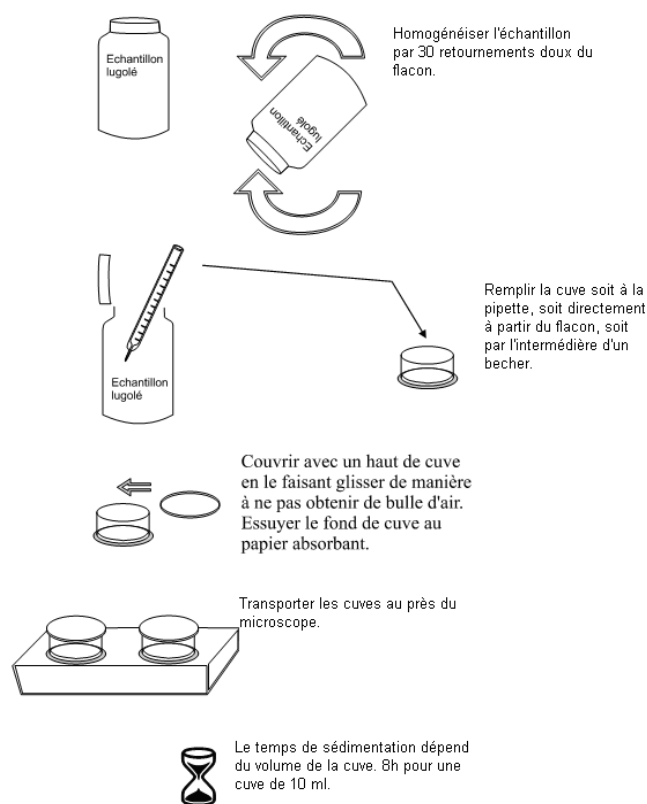
Un délai plus large est accordé pour les analyses réalisées dans le cadre environnemental, sans toutefois excéder les temps optimum de conservation et sans atteindre une accumulation d'un trop grand nombre d'échantillons. Dans ces conditions, le délai maximum préconisé est d'un mois.

## 7.4 PRÉPARATION POUR ANALYSE

Afin de permettre une distribution aléatoire du plancton après sédimentation dans le fond de la cuve, et d'éviter la formation de bulles par dégagement gazeux lors du réchauffement de l'échantillon, tout le matériel doit avoir atteint l'équilibre avec la température ambiante de la pièce dans laquelle les analyses vont être effectuées. Pour un échantillon d'1 litre la période d'atteinte de l'équilibre thermique peut aller jusqu'à 12 heures, d'où l'utilité de stocker l'échantillon en attente d'analyse à température ambiante et à l'obscurité.

L'homogénéisation est une étape critique de l'analyse. Celle-ci est effectuée manuellement par 30 retournements doux du flacon [alternés de roulement horizontal](#). Cette homogénéisation n'est efficace que si le flacon n'a pas été rempli complètement (remplir à hauteur d'environ 80%). [Il est possible d'utiliser un agitateur mélangeur rotatif à mouvement tridimensionnel \(mouvement en huit avec rotation : principe de Paul Schatz\)](#). [Il ne faut pas utiliser de mélangeurs orbitaux qui induisent un vortex dans le flacon.](#)

Ces deux recommandations sont extrêmement importantes pour la qualité du résultat.



**Figure 8 : illustration de la préparation pour l'analyse en chambre de sédimentation**

Le remplissage de la chambre doit se faire aussitôt après l'homogénéisation (pour éviter d'exclure du prélèvement des taxons sédimentant rapidement), **directement du flacon dans la cuve pour les échantillons PHYTOBS**. Pour les autres cas il est possible d'utiliser une pipette dont l'ouverture de l'embout est > 4 mm. Cela doit se faire rapidement en une seule fois, jusqu'à l'obtention d'un léger excès d'eau provoquant un ménisque convexe à la surface de la chambre. Ce surplus d'eau est aussitôt chassé avec le glissement de la lame supérieure, tout en faisant attention à ne pas enfermer de bulle d'air dans la chambre. Il est en même temps épongé par un papier absorbant.

Il faut veiller à ce que le surplus d'eau ne s'écoule pas le long de la chambre, faisant courir le risque qu'un écoulement sous la lamelle d'observation, ne la salisse, et nuise à l'observation à venir.



La sédimentation doit se dérouler sur un plan horizontal de faible chaleur massique (par exemple une fine plaque en acrylique, en bois, en cellulose...), à l'abri de la lumière directe et à une température ambiante constante. Les vibrations sont à proscrire.

Volume de la chambre mL	Hauteur de la chambre cm	Temps de sédimentation h
10	2	8
25	5	12
50	10	24
100	20	48

**Tableau 2 : temps de sédimentation en chambre pour les échantillons lugolés**

NB : Ces temps de **sédimentation** prennent en compte la totalité des espèces présentes, y compris jusqu'aux plus petites. L'expérience montre que certaines espèces (en particulier pour le microplancton) peuvent sédimenter assez vite. Cette propriété permet aux observateurs du REPHY, dans des cas pour lesquelles il est utile d'évaluer rapidement une densité cellulaire d'espèces cibles (toxiques ou nuisibles) par rapport à un seuil d'alerte, de procéder à un examen préliminaire dans un temps inférieur à celui du temps de sédimentation recommandé ci-dessus. En effet, dès que le seuil concerné est

franchi, ce dépassement ne pourra qu'être confirmé lors du comptage final. Cette pratique peut être particulièrement applicable pour les *Dinophysis*.

Après sédimentation, juste avant l'analyse, si des bulles se sont formées celles-ci sont éliminées en ouvrant le haut de cuve, en ajoutant de l'eau, de préférence de l'eau de mer filtrée (filtre de 0,45 µm de vide) et lugolée ceci afin d'éviter les turbulences ; puis en remplaçant le haut de cuve.

## 7.5 DILUTION - CONCENTRATION

Voir page 24 de la norme NF EN 15204.

Pour les échantillons présentant une très forte densité algale il est conseillé de procéder à une dilution précise et connue à l'aide d'eau de mer filtrée (filtre 0.45 µm). Dans ce cas il est préférable de diluer un volume relativement grand en utilisant une éprouvette graduée.

Pour les échantillons présentant une très faible densité algale (eau oligotrophe), il est possible de concentrer l'échantillon par sédimentation en éprouvette graduée d'1 à 2 litre (Classe A). Durant la décantation, qui doit durer au moins une semaine, l'éprouvette doit être placée à l'abri de la lumière à température ambiante. Quotidiennement, l'éprouvette doit être tournée rapidement d'un quart de tour autour de son axe tout en la laissant au contact de la table. Ceci afin de décrocher les cellules éventuellement accrochées aux parois. Le surnageant est retiré par siphonage et le volume d'échantillon conservé au fond de l'éprouvette est mesuré afin de calculer le coefficient de concentration.

La méthode par filtration sur gaze à plancton ne convient pas bien à l'étude quantitative mais peut être utilisée pour l'observation qualitative des espèces rares, particulièrement avec l'échantillon frais non fixé.

Si possible, les étapes de concentration sont à éviter car elles contribuent à l'erreur globale de la mesure.



## 8 MODE OPÉRATOIRE DES COMPTAGES

L'identification des cellules repose sur l'observation visuelle des caractères généraux et des attributs morphologiques remarquables des cellules, soit par comparaison aux documents de référence en s'appuyant aussi sur les textes d'accompagnement des illustrations (liste non exhaustive des documents en ANNEXE I), soit à l'aide de clés d'identification, ceci, accompagné de la connaissance :

- des espèces caractéristiques de la région échantillonnée
- des variations morphologiques au sein d'une même espèce
- des données environnementales liées à l'échantillon analysé (température, salinité ...)

Il est à noter que bon nombres de caractères sont plus visibles sur du matériel frais (vivant) que fixé et qu'en conséquence, une observation préliminaire d'échantillon frais constitue une source d'information très précieuse au niveau taxinomique.

*L'usage de la technique de l'épi-fluorescence, est particulièrement intéressant pour discriminer les dinoflagellés nus des cuirassés et, permet d'améliorer les identifications par l'observation de la tabulation des thèques.*

Les résultats des observations sont consignés sur une fiche de résultat du système documentaire du laboratoire. Un exemple de fiche est proposé en ANNEXE III. Toutes les informations permettant de retrouver le volume élémentaire dans lequel le dénombrement a été effectué (volume de la cuve ou partie de cuve, nombre de transects, nombre de champs oculaires, grossissement de l'objectif adopté, ...), y seront renseignés, ce qui permet, si nécessaire, d'évaluer la précision des comptages.

*La prise d'images, en particulier des espèces cibles, est fortement recommandée. Les images doivent être les plus documentées possibles et en particulier, l'échelle doit y être intégrée. Ces images peuvent être bancarisées dans Quadrigé, dans l'onglet "Photos" de l'échantillon concerné.*

### 8.1 RECOMMANDATIONS

Il convient de ne pas identifier les taxons à un niveau de précision supérieur à celui maîtrisé par l'analyste. Toutefois afin de conserver un maximum d'information, et de ne pas remonter à un niveau supérieur trop vaste et souvent peu informatif, des taxons virtuels ont été créés dans le référentiel de Q<sup>2</sup>, aussi, certains taxons du référentiel, sont considérées comme un groupe d'espèces de morphologie identique en microscopie photonique constituant le complexe de cette espèce (voir ANNEXE III). *Pour les espèces présentant de fortes abondances, en cas de difficulté d'identification l'analyste doit faire appel à de l'aide auprès du réseau d'analystes et de la cellule d'expertise (voir point 9.4).*

*NOTE : Selon la norme NF EN 15204, Il convient que la liste des taxons identifiés par les analystes dans un laboratoire inclus les caractéristiques d'identification et les références bibliographiques pertinentes pour chaque taxon. Il convient d'effectuer des dessins et de prendre des photographies numériques des taxons observés et de les conserver comme une collection de référence.*

Les cellules de taille inférieure à 20 µm ne sont pas à dénombrer, à l'exception des abondances exceptionnelles de certains taxons nuisibles comme *Phaeocystis*, ou potentiellement toxiques comme *Chysochromulina* ; sensu lato : les dinoflagellés nanoplanctoniques et les Cyanophyceae sont à enregistrer (cf. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae).

Du fait des limites de résolution liées à l'optique, l'identification de certains taxons reste forcément limitée en microscopie photonique. Le tableau en ANNEXE III liste quelques exemples et le ou les choix de saisie à appliquer.

### Comptage de cœnobes, phycomes, colonies et filaments

Selon la norme NF EN 15204 p15 : "il convient de traiter les cœnobes comme une seule unité. Ces associations de cellules appelées cœnobes correspondent à une unité dans laquelle on reconnaît une harmonie et une solidarité fonctionnelles entre les individus (définition Encyclopaedia universalis). Exemples : *Scenedesmus* et *Pediastrum* (cf. illustrations p.70 - Nézan E., 1996. Surveillance du phytoplancton marin - les principales classes hormis les diatomophycées. Manuel illustré pour la formation des opérateurs de laboratoires).

Un cœnobe est donc compté comme une seule unité et non comme des cellules en colonie.

Pour les genres *Halosphaera*, *Pachysphaera* et *Pterosperma* (classe des Prasinophyceae), seuls les phycomes (stade non mobile du genre) sont détectables et identifiables (cf. Manuel illustré E. Nézan, 1996 p. 68). Dans ce cas, seul les phycomes sont dénombrés et un commentaire est ajouté sur la données saisie dans Quadrigé : "*Le dénombrement ne correspond pas au nombre de cellule, mais au nombre de phycomes (stade non mobile du genre).*"

Cas des *Pyrocystis* (syn. *Dissodinium*) : Seuls les kystes secondaires, en forme de croissant et renfermant une ou plusieurs spores ressemblant à des cellules de *Gymnodinium*, sont aisément reconnus. **Dans ce cas on compte une seule unité.**

Pour les comptages de colonies et filaments, on dénombre toutes les cellules. On peut alors utiliser des approches différentes :

- Comptages directs de cellules — Les cellules des colonies et des filaments sont comptées, comme s'il s'agissait de cellules individuelles, en ne comptant que les cellules qui se trouvent dans le champ.
- Comptages séparés du nombre de colonies/filaments et du nombre moyen de cellules par colonie/filament — Le nombre d'objets algaux (colonies/filaments entiers et cellules individuelles du même taxon) est compté normalement, avec un comptage séparé du nombre de cellules dans au moins 30 objets. Le nombre moyen de cellules par objet multiplié par le nombre d'objets permet d'obtenir le nombre total de cellules. Cette méthode ne peut être utilisée que lorsque le nombre de cellules par objet ne varie pas largement dans l'échantillon (*Phaeocystis*, *Microcystis*, *Merismopedia*, Cyanophytes, *Dinobryon*...).

### Comptage dans les cas particuliers

#### Cellules en division :

Lorsque l'observation montre des cellules en division, on dénombre alors les cellules en considérant que la phase de division est achevée (une cellule en division = deux cellules).

#### État physiologique et diversité morphologique au sein d'une même espèce :

Les frustules de diatomées ou thèques de dinoflagellés vides (**ou en décomposition avancée**) ne sont normalement pas comptés. Par contre, ils peuvent être utiles pour observer des détails morphologiques et identifier certaines espèces surtout les plus abondantes de l'échantillon analysé. Par ailleurs, si l'abondance de ces enveloppes vides témoigne de la fin de la floraison d'une espèce donnée qui n'a pas été détectée lors de l'échantillonnage précédent, il faut les compter.

Les cellules brisées ayant conservé leur contenu cellulaire sont comptées en reconstituant une cellule entière (2 demi cellules = 1 cellule) cas de cellules longues et fines (*Rhizosolenia*, *Proboscia*...)

Quelques exemples sont illustrés en ANNEXE III.

## 8.2 OPÉRATION PRÉLIMINAIRE

### Distribution aléatoire des particules

La première opération à réaliser au début d'une observation est une observation rapide ou "survol" de la cuve au plus faible grossissement, afin d'évaluer le mode global de distribution des particules.

On peut ainsi avoir une idée de la charge générale en particules de l'échantillon (matières en suspension + plancton) et de la possibilité d'en réaliser "la lecture" au microscope :

- si la charge particulaire est trop élevée, la fiabilité de l'identification et du dénombrement des espèces phytoplanctoniques sera compromise : on pourra alors procéder à une éventuelle dilution de l'échantillon, ou à une filtration de l'échantillon avec une maille de filtration choisie en fonction de la taille des particules observées.
- si la cuve n'est pas trop chargée, des modes de distribution à grande échelle peuvent facilement être observés, bien que les particules les plus petites puissent passer inaperçues. La répartition idéale correspond à celle du schéma ci-dessous.

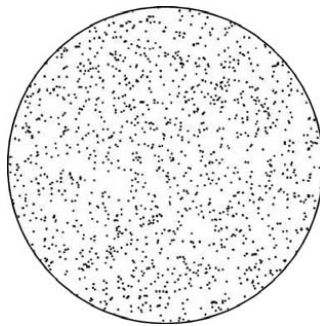


Figure 9 : image illustrant une distribution aléatoire des particules dans le fond de la cuve à sédimentation

Ce mode de répartition autorise en effet un traitement statistique robuste des dénombrements permettant en particulier d'avoir une information fiable sur la précision du comptage. Ces aspects sont développés au point 9.3, et précisés en ANNEXE IV.

### Perturbation du mode de répartition dans la chambre de sédimentation

Le mode de distribution le plus souvent observé, lorsque la température n'est pas contrôlée, est une distribution de type concentrique dans laquelle les particules les plus grandes et les plus lourdes ont tendance à se concentrer vers la paroi de la chambre et les particules les plus petites plutôt vers le centre de la chambre. Ce mode apparaît lorsque la température de la chambre est supérieure à celle du sous-échantillon. Si le sous-échantillon présente une température supérieure à la chambre au moment où il y est versé, le mode inverse se produit avec les particules les plus petites près de la paroi de la chambre.

Si la chambre de sédimentation est posée sur une surface en pente, la distribution présente un gradient.

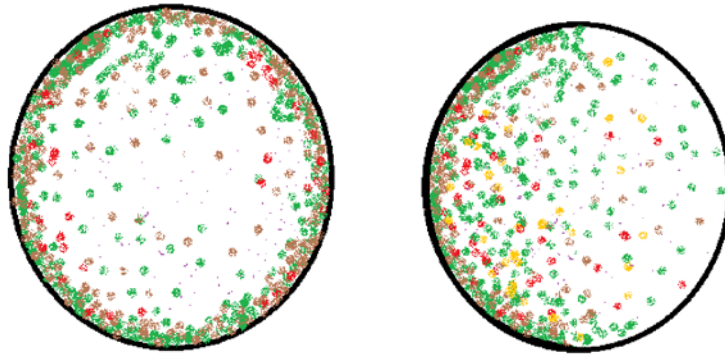


Figure 10 : images illustrant des distributions perturbées des particules dans le fond de la cuve à sédimentation

Dans tous ces cas si les accumulations de cellules ne permettent plus de les distinguer, il convient de procéder à la préparation d'une nouvelle cuve. S'il est toujours possible de distinguer toutes les cellules, il n'est toutefois pas possible d'adopter une stratégie de comptage sur un sous échantillonnage de la cuve, et le comptage de tous les taxons doit donc être réalisé sur toute la cuve.

### 8.3 STRATÉGIE DE DÉNOMBREMENT

Le comptage des espèces phytoplanctoniques est une opération coûteuse en temps, aussi il convient d'optimiser la méthode appliquée tout en conservant la meilleure précision possible.

Le comptage consiste à enregistrer les taxons observés et le nombre d'unités d'algues (cellule) de chaque taxon (excepté pour les coenobes et les phycomes qui sont traités comme une seule unité) dans une zone de surface connue de la chambre de sédimentation ou dans la chambre entière.

De même que la surface totale de la chambre correspond à un volume connu (par exemple 10, 20 ou 25 mL), des surfaces élémentaires correspondant à des sous-échantillonnages de la chambre doivent être transformées dans les volumes correspondants. Ceci doit être réalisé lors de la mise en service du microscope, pour chaque mode de sous-échantillonnage, et pour chaque type d'oculaire et d'objectif utilisé (cf. ANNEXE II).

Les principaux modes de sous-échantillonnage sont :

- le comptage d'un nombre de champs choisis aléatoirement,
- le comptage de transects,
- le comptage de la  $\frac{1}{2}$  chambre,
- le comptage de la chambre entière.

Habituellement, les organismes planctoniques sont comptés dans l'ordre de leur apparition dans le champ de vision. Ceci n'est pas toujours pratique. En se concentrant seulement sur une forme spécifique, la reconnaissance est plus certaine et grandement facilitée. Ainsi, le gain de temps justifie une division de la tâche de comptage, de sorte que les variétés abondantes sont comptées séparément dans un sous échantillonnage de la chambre.

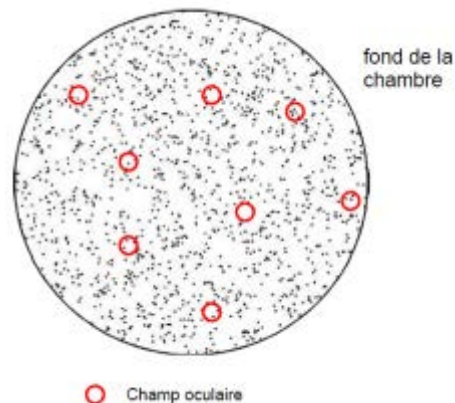
Dans tous les cas, *in fine*, toute la surface de la cuve doit être balayée pour ne pas omettre les cellules rares.

Il est très important de se rappeler qu'il est préférable d'identifier correctement les microalgues à un niveau taxonomique supérieur (e.g. Famille, Ordre) plutôt que de les identifier de façon incertaine à un niveau inférieur (e.g. genre, espèce).

### Le comptage d'un nombre de champs choisis aléatoirement

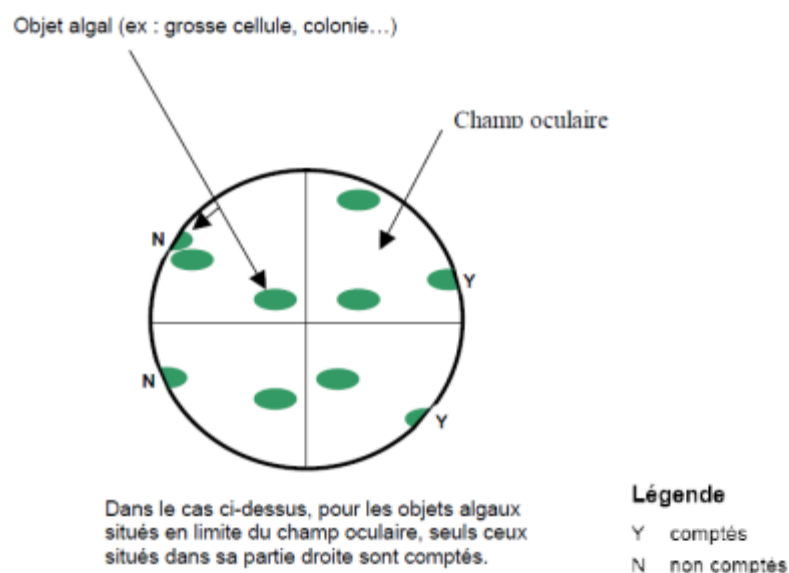
Ce mode de comptage sera préférentiellement utilisé pour dénombrer les espèces représentées en **forte** abondance dans l'échantillon (cas des efflorescences) **avec une occurrence cumulée de tous les champs dénombrés  $\geq 200$  (pourcentage de confiance du dénombrement : 14%)**.

Il peut se faire en positionnant de manière aléatoire l'objectif sur le fond de la chambre, sans regarder dans l'oculaire. Le champ optique "lu" est le champ oculaire total, sans que celui-ci soit bien sûr déplacé. Le nombre total de champs comptés est noté et le calcul de l'abondance par litre est effectué à partir du nombre moyen par champ.



**Figure 11 :** image illustrant un choix aléatoire de champs oculaires dénombrés sur le fond de la chambre à sédimentation

Lors de l'utilisation de comptage par champ oculaire d'un microscope, il est important de s'assurer de la cohérence de la méthode utilisée pour déterminer quels objets algaux se trouvent dans le champ et hors du champ. Il convient de mettre en place une règle simple, telle que celle décrite sur les figures suivantes, applicable en particulier pour les grosses cellules, les colonies ou les cœnobes.



**Figure 12 :** image illustrant le choix de dénombrer une particule lorsque celle-ci n'apparaît pas entièrement dans le champ

### Le comptage par transect-diamètre

Ce mode de comptage est intéressant pour des espèces assez bien représentées dans la chambre. Il est valable si la répartition est aléatoire, et il offre aussi l'avantage, par rapport à un comptage par champs aléatoires (cf. ci-dessus), de compenser la perturbation par une répartition concentrique liée à des influences thermiques, telles que décrites plus haut.

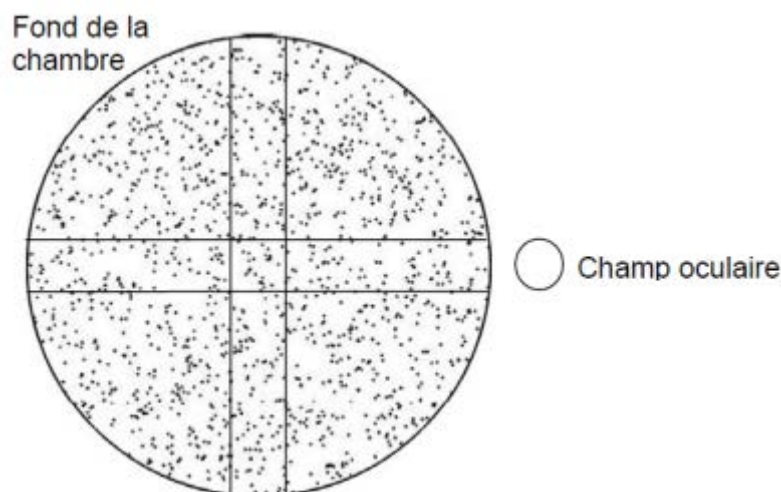


Figure 13 : image illustrant un transect-diamètre sur le fond d'une chambre de sédimentation

Afin d'obtenir un nombre minimum de 200 objet algaux pour un taxon donné (pourcentage de confiance du dénombrement : 14%), il convient d'ajouter un nombre adéquat de transects de lecture, en général un ou deux. Dans ce cas, il est utile de mettre des repères sur la base de la chambre pour faciliter les nouveaux positionnements. En ce qui concerne le comptage répété au lieu du croisement des transects (centre de la cuve), il n'y a pas lieu de s'en soucier pour les espèces abondantes, réparties aléatoirement et qui font l'objet du dénombrement sur plusieurs transects-diamètres, car à l'issue de ces comptages, le nombre total d'occurrence du taxon dénombré est rapporté à la surface cumulée du nombre de transects-diamètres puis au litre (Cf. ANNEXE II)

Cette méthode est particulièrement adaptée pour les cellules nanoplanctoniques (ex : *Phaeocystis*, Cryptophyceae) qui ne sont correctement reconnaissables qu'à l'objectif x 40, pour des raisons de durée d'analyse, Il n'est pas envisageable d'effectuer leur dénombrement à l'objectif x 40 sur toute la cuve.

### Le comptage de la ½ cuve

Lors du balayage de la cuve, arrivé à la demi-surface, pour les cellules dont l'occurrence est > 200 le dénombrement peut être arrêté là.

### Le comptage de la chambre entière

Le comptage dans la chambre entière est obligatoire pour les taxons en faible quantité en particulier si l'occurrence est de quelques rares cellules, ou pour compter des taxons de grande taille dont la distribution peut ne pas être aléatoire dans la chambre.

## 8.4 MODE OPÉRATOIRE

La lecture d'une cuve se fait par déroulement (horizontal ou vertical) du champ oculaire. Le basculement d'un niveau à l'autre se fait grâce à des repères identifiés (objet caractéristique sur le fond de la cuve).

Le transect-diamètre est balayé successivement avec les objectifs x 40, x 20 ou x 10. L'objectif x 40 permet d'observer et de détecter les taxons de petite taille, et de dénombrer ceux dont l'occurrence est supérieure à 200 sur le diamètre.

Une fois le diamètre balayé successivement avec les trois objectifs, et, le cas échéant, les comptages des transects-diamètres et/ou des champs terminés, deux méthodes peuvent être appliquées :

- 1/ On revient à la position de départ avec l'objectif x 20 pour effectuer un dénombrement de tous les taxons (exceptés ceux qui ont été comptés sur les sous échantillonnages), d'abord sur une première demi-surface de la cuve. L'autre demi-surface n'est balayée que pour les taxons ayant présenté des occurrences < 200 dans la première demi surface.

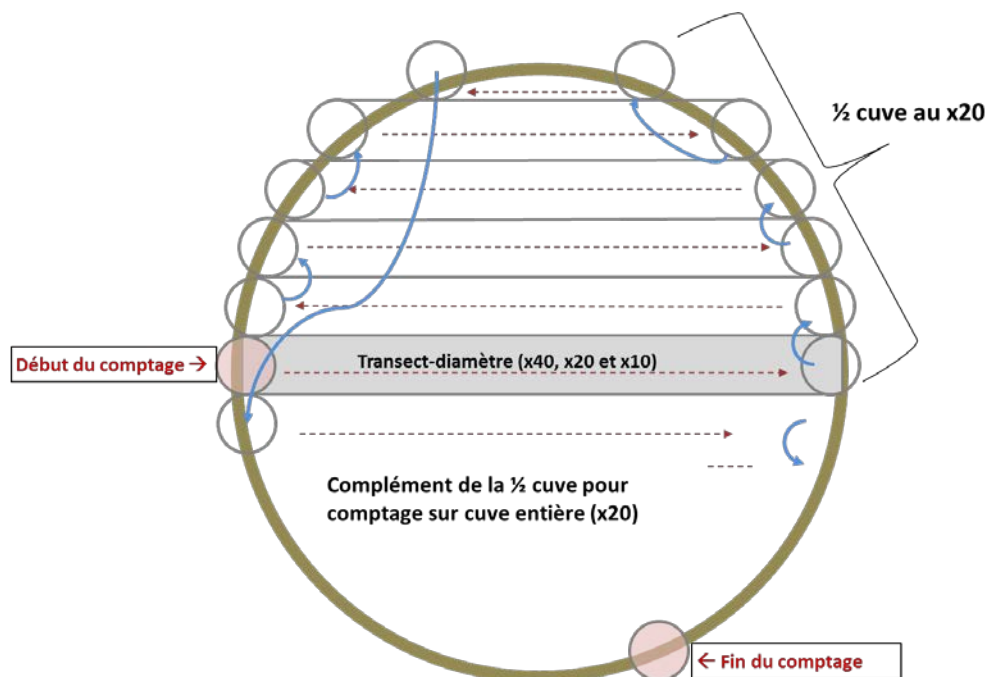


Figure 14 : 1<sup>ère</sup> méthode de balayage de la chambre à sédimentation



2/ On démarre le balayage de la cuve en haut ou en bas si on avance horizontalement, à droite ou à gauche si on avance verticalement selon la préférence de l'analyste.

Arrivé au diamètre, les taxons dont l'occurrence est  $>200$  ne sont plus comptés dans la demi-cuve restante.

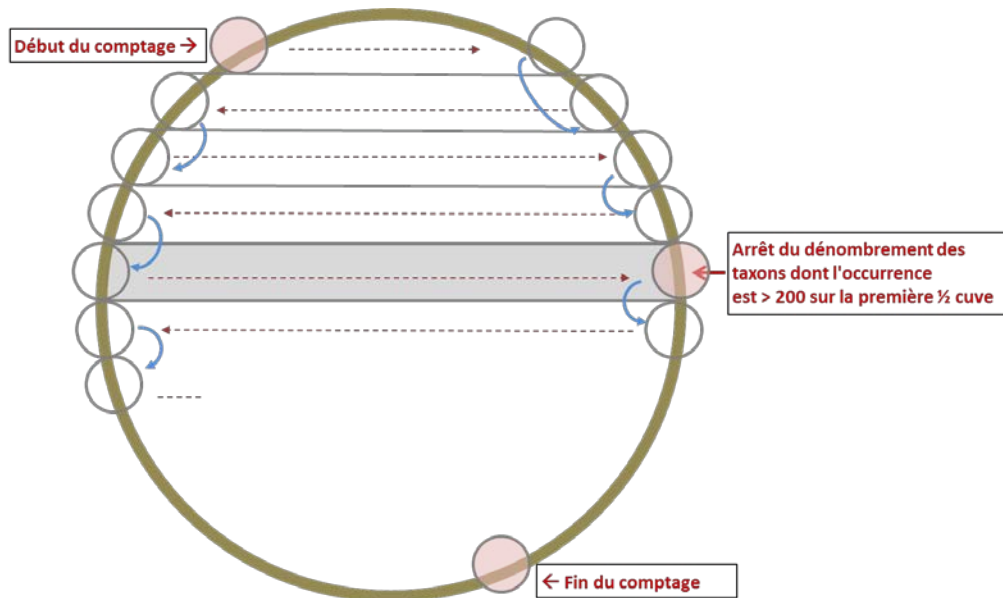


Figure 15 : 2<sup>ème</sup> méthode de balayage de la chambre à sédimentation

Les cellules caractéristiques en limite de champ pourront aisément ne pas être comptabilisées deux fois. Pour éviter tout double comptage, on peut opter pour le comptage de celles qui sont repérées sur l'une des limites du champ, et pas sur l'autre où elles seront prises en compte au passage suivant (voir Figure 12). Lorsqu'il s'agit de chaînes ou de colonies qui s'étendent au delà du champ observé, les cellules apparentes sont dénombrées en appliquant les règles de la Figure 12 le reste des cellules de la colonie seront dénombrées au passage parallèle suivant voir Figure 16.

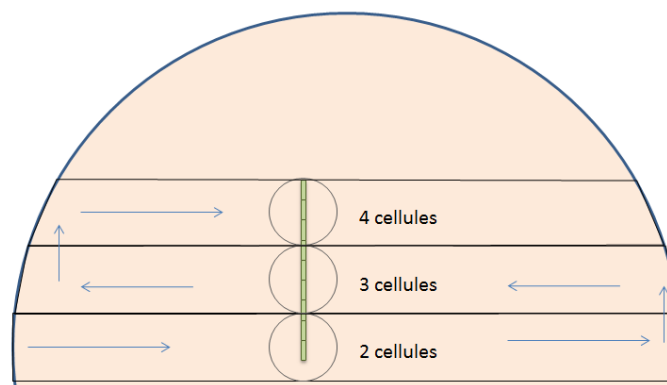


Figure 16 : dénombrement des cellules d'une chaîne s'étalant sur plusieurs transects.



## 9 CONTRÔLES QUALITÉ ET VALIDATION DE LA MÉTHODE

Les contrôles qualité incluent tous les tests qui confirment et garantissent la qualité des résultats et la compétence des opérateurs. Ces résultats doivent être soutenus par un système qualité qui garantit la traçabilité et la confiance dans les résultats. Les laboratoires participant aux surveillances officielles, ce qui est le cas dans le cadre de la DCE par exemple, doivent être agréés et disposer de procédures qualité leur permettant de fournir des données et des mesures conformes à une norme donnée.

Ces mesures comprennent la mise en place d'une méthode validée, du personnel bien formé, une série de contrôles qualité internes, la traçabilité des résultats et la participation à des programmes d'essais d'aptitude (ISO / IEC 17025).

Tous les résultats des contrôles qualité et de validation de la méthode doivent être enregistrés dans le système documentaire du laboratoire.

### 9.1 MÉTROLOGIE

Afin de limiter au maximum l'incertitude sur le résultat quantitatif, les chambres de sédimentation doivent être certifiées par le constructeur ou faire l'objet d'un contrôle métrologique. Ce contrôle porte sur le volume et le diamètre des cuves.

L'incertitude quantitative la plus élevée affecte les taxons dont l'abondance est la plus faible. Afin de minimiser cette incertitude, l'écart du volume mesuré de la cuve par rapport au volume attendu ne devrait pas dépasser 5 % (valeur fixée arbitrairement car il n'existe pas de recommandation précise. Cela donne une tolérance inférieure à 0,5 ml pour une cuve de 10 ml).

Les cuves ne répondant pas à ce critère sont, soit écartées du matériel utilisé, soit leur volume réel est utilisé pour les calculs des abondances.

Celles dont le volume est supérieur à celui attendu peuvent éventuellement être rectifiées par abrasion au papier de verre très fin. Chaque cuve doit être identifiée pour assurer la traçabilité.

L'échelle micrométrique oculaire du microscope doit être étalonnée pour toutes les conditions d'observation (différents grossissements des objectifs, présence de dispositifs optiques intermédiaires [bague 1,5 ou 1,6...](#)). Ceci afin de maîtriser les mesures des tailles des cellules ou colonies, mesures indispensables dès lors que l'on veut confirmer l'identification.

La valeur du diamètre de la cuve sert à calculer la surface du champ et du transect-diamètre (valeur du diamètre de l'objectif x valeur du diamètre de la cuve).

Les surfaces des champs de chaque objectif doivent être calculées à partir des mesures de leurs diamètres. D'abord on étalonne le micromètre oculaire, puis on mesure les diamètres des champs pour chaque objectif à l'aide du micromètre oculaire (voir ANNEXE II).

Ceci permet de déterminer les coefficients à appliquer pour calculer les concentrations en nombre de cellules par litre lorsque le comptage a été effectué sur un sous échantillonnage de la cuve (champ, transect...),

Chaque laboratoire élabore, pour chacun des microscopes utilisés, un tableau de transformation des nombres de cellules phytoplanctoniques comptées, en nombre de cellules par litre. Chaque tableau renseigne, pour chaque mode de sous-échantillonnage pratiqué (transects ou champs aléatoires) et chaque grossissement utilisé, en fonction du nombre d'opérations pratiquées le rapport multiplicatif qui amène au nombre de cellules par litre. Cette démarche est présentée en ANNEXE II.

En cas d'utilisation d'un compteur manuel, son bon fonctionnement doit être contrôlé et il doit être remis à zéro avant toute utilisation.

Tous les résultats des contrôles métrologiques sont enregistrés selon les procédures internes au laboratoire.

## 9.2 BLANC D'ESSAI

Le blanc d'essai est destiné à garantir l'absence de contamination des échantillons analysés.

A cette fin, l'efficacité de la procédure de nettoyage des cuves et des flacons doit être contrôlée pour s'assurer qu'elle permet l'élimination de toute particule, et en particulier de toutes les cellules phytoplanctoniques de l'échantillon précédemment prélevé et analysé.

Pour le contrôle des cuves, sélectionner au hasard une cuve du stock utilisé, la remplir d'eau distillée. Laisser décanter dans les conditions habituelles et balayer tout le fond de la cuve au microscope. Aucune cellule phytoplanctonique ne doit être présente. Dans le cas contraire revoir la procédure interne de nettoyage.

Pour les flacons, sélectionner un flacon du lot dernièrement nettoyé, remplir d'eau distillée (1/3 du volume du flacon), secouer énergiquement pour rincer les parois des flacons, attendre la disparition des bulles avant de mettre à décanter dans les cuves contrôlées. Laisser décanter dans les conditions habituelles et balayer tout le fond de la cuve au microscope. Aucune cellule phytoplanctonique ne doit être présente. Dans le cas contraire revoir la procédure interne de nettoyage.

Il convient de planifier ces contrôles au moins une fois par an et à chaque modification introduite dans la procédure de nettoyage (changement de produit de nettoyage, nouveau personnel intervenant...)

## 9.3 VALIDATION QUANTITATIVE

### 9.3.1 VALIDATION DE LA MÉTHODE ET CONTRÔLES QUALITÉ INTERNES

En principe la validation de la méthode d'analyse doit être réalisée avant que le protocole ne soit mis en œuvre. Dans le cadre du REPHY, cette méthode est appliquée depuis 1987 au sein de chaque laboratoire du réseau. Il n'est toutefois jamais trop tard pour appliquer des tests de contrôles visant à apporter les preuves tangibles concernant la qualité des résultats.

Au delà de la validation de la méthode, il convient de tester régulièrement les pratiques du laboratoire, afin d'assurer que les caractéristiques de performance du laboratoire évaluées par la validation sont maintenues.

L'ANNEXE V décrit les procédures de contrôle qualité et de validation de la méthode d'Utermöhl à mettre en œuvre au sein de chaque laboratoire conformément au chapitre 8 de la norme de référence NF EN 15204.

### 9.3.2 INCERTITUDE QUANTITATIVE

Toutes les informations qui ont permis les calculs des abondances et qui sont enregistrées dans la fiche de résultat, permettent d'évaluer la précision des comptages (cf. ANNEXE IV)

## 9.4 VALIDATION QUALITATIVE

Des contrôles qualité doivent être réalisés pour vérifier la capacité des analystes à identifier correctement les taxons de phytoplancton. A cette fin, tous les analystes du réseau participent au moins une fois tous les trois ans à un essai comparatif inter-laboratoire (CIL). Ces essais sont complétés par des tests de comparaison inter-analystes (CIA) au sein d'un même laboratoire. Ces contrôles s'inscrivent dans la procédure de maintien des habilitations (cf. 10)

Des formations et ateliers sont organisés régulièrement afin de maintenir ou améliorer les compétences des analystes.

**Lors d'une analyse de routine**, dans le cas où l'analyste est confronté à l'impossibilité d'identification de cellules jamais observées, ou de cellules nécessitant une expertise plus poussée, il fait appel au réseau d'observateurs du REPHY, ou aux experts de la communauté scientifique du domaine, et plus particulièrement aux taxinomistes du laboratoire Ifremer de Concarneau, ~~Élisabeth Nézan~~, Nicolas Chomérat et Kenneth Mertens.

Dans un premier temps, il devra adresser par mail des images (format jpg) accompagnées d'un minimum d'informations relatives à la taille des cellules ainsi qu'à l'échantillon source (non fixé, lugolé, formolé) et au prélèvement (date, lieu, température, salinité, ...). Si un examen approfondi s'avère nécessaire, il devra expédier un sous-échantillon à l'assistance. Cette expertise n'est utile que lorsque l'espèce présente une forte abondance, **qu'elle présente un caractère rare ou nouveau**, ou pour les espèces potentiellement toxiques ou nuisibles. Dans les autres cas, l'observateur identifie au rang supérieur le plus sûr.

Un site collaboratif Alfresco nommé *Forum phyto* a été mis en fonction en janvier 2019. Tous les observateurs phyto du REPHY sont membres de ce site. L'espace documentaire comprend différents dossiers dont au moins : i/ une arborescence phylogénique destinée à recevoir des photos et documents pour chaque taxon, ii/ un dossier "Fiche expertise" destiné à recevoir des documents de demande d'assistance. Le site comprend également un espace de discussions. Une procédure d'utilisation de ce site est en cours de rédaction.

## 10 GESTION DES COMPÉTENCES ET HABILITATION

Les responsables des laboratoires doivent s'assurer de la compétence de leur personnel.

Le personnel opère les analyses avec une compétence qui s'appuie sur :

1. **des documents** présents dans les locaux : clés d'identifications, ouvrages, guides et flores, documents élaborés par le laboratoire lui-même (compilations photographiques, dessins...) cf. liste non exhaustive en ANNEXE I ; sur des études portant sur l'ensemble des résultats acquis.
2. **des moyens en expertise** : avec la mise en place, à Concarneau, d'un pôle d'expertise en soutien à la taxinomie du phytoplancton, et d'une procédure d'échange d'information en temps réel, afin de permettre l'expertise sur les échantillons, comme le permettent aujourd'hui les moyens de photographie numérique et d'échange internet.

L'envoi des échantillons eux-mêmes à Concarneau permet de lever les doutes avec l'utilisation de techniques plus fines que les laboratoires côtiers n'ont pas toujours vocation à acquérir.

3. **des formations et par l'usage d'outils d'auto formation** : formations internes (en particulier avec l'appui du pôle d'expertise de la station Ifremer de Concarneau pour les aspects taxinomiques [et/ou de la coordination REPHY](#)), et/ou formations externes ; sur la mise à disposition de divers outils de formation créés à l'Ifremer (diaporamas, rapport et documents...).
4. **des essais comparatifs inter et intra-laboratoire** : l'ensemble des analystes du REPHY participe régulièrement aux exercices d'inter-comparaison organisés par l'unité Phytoplankton du Marine Institute d'Irlande. En interne, des essais inter-analyste d'un même laboratoire sont réalisés régulièrement.
5. **un réseau d'entraide et d'échange d'expériences entre observateurs** ([site collaboratif Alfresco Forum phyto](#)).

La qualité des résultats repose sur les compétences du personnel qui réalise les analyses. La taxinomie est un domaine qui demande beaucoup d'investissement personnel et où l'on peut se perfectionner tous les jours.

Pour les analystes débutants une formation initiale est nécessaire et doit être prévue durant l'habilitation initiale. [Cette formation peut être dispensée par un analyste confirmé du laboratoire et complétée par des sessions organisées nationalement.](#)

Les analystes affichant deux ans d'expérience sont considérés comme confirmés toutefois pour le maintien de l'habilitation, des formations régulières sont nécessaires ainsi que la participation à des essais de comparaison inter-analystes (CIA) et inter laboratoire (CIL).

Les analystes confirmés affichant un arrêt d'activité de plus d'un an doivent participer à un CIA avant de reprendre leur activité, c'est la procédure de réhabilitation.

Lors des procédures d'habilitation et de réhabilitation, en plus de ces instructions, chaque laboratoire veille au maintien des connaissances du système qualité par le personnel (système documentaire interne et référentiels externes).

## 10.1 HABILITATION INITIALE

- Etape 1 : désignation d'un responsable d'habilitation, et d'un tuteur, par le Responsable du Laboratoire
- Etape 2 : formation au système documentaire du laboratoire
- Etape 3 : prise de connaissance du système documentaire (documentation générale et documentation spécifique au domaine d'activité)
- Etape 4 : tutorat par le personnel habilité du laboratoire et formation(s) initiale(s) par des formateurs experts internes (LER-BO [et/ou Coordination REPHY](#)) et/ou externes. Cette étape s'étale sur une durée de un à deux ans
- Etape 5 : examen des connaissances CIA ([Comparaison Inter-Analyste](#))
- Etape 6 : présentation du dossier d'habilitation au Responsable Laboratoire et au Responsable ou Correspondant Qualité par le responsable d'habilitation, après vérification de la conformité aux critères d'habilitation.

## 10.2 MAINTIEN DE L'HABILITATION

Le maintien d'habilitation est conditionné par :

- La prise de connaissance et revue des créations/modifications de documents de prescription et de méthodes
- La pratique régulière de l'activité avec une période de non pratique ou d'absence maximum tolérable de un an
- La [réalisation d'un CIA et la participation aux contrôles qualité interne \(cf.9\)](#)
- La participation à un CIL [au moins](#) une fois tous les trois ans.

## 10.3 RE-HABILITATION

La procédure de réhabilitation consiste en :

- La prise de connaissance des créations/modifications de documents de prescription et de méthodes ainsi que des documents du système documentaire du laboratoire.
- La réalisation [d'un CIA et la participation aux contrôles qualité internes \(cf.9\)](#).

## 11 BANCARISATION DES DONNÉES DANS QUADRIGE

### Saisie et validation des données

Pour les saisies dans la base de données Quadrigé se référer au document de prescription : Quadrigé<sup>2</sup> - Manuel de saisie pour les programmes REPHY et REPHYTOX (version en cours). Ici sont traités les points qui ne figurent pas dans le manuel.

Les calculs finaux des résultats par taxon en nombre de cellules par litre doivent être vérifiés avant saisie dans la base Quadrigé. Ces résultats sont saisis sans décimale et, arrondis avec au maximum 4 chiffres significatifs.


EXEMPLE de résultats obtenus avec une cuve de 25 ml :

Résultat calculé	Résultat à saisir
40	40
180	180
1 240	1 200
25 680	25 700
166 440	166 400

**Tableau 3** : exemples d'arrondis des résultats en nombre de cellules par Litre pour la saisie dans Quadrigé

 Pour la saisie des résultats :

Lorsqu'en raison des délais de rendu de résultats imposés pour la surveillance sanitaire (résultats attendus dans la semaine du prélèvement), une flore partielle a été réalisée, puis ultérieurement une flore totale sur le même échantillon, il faut compiler les résultats et ne saisir qu'une flore totale comprenant tous les taxons dénombrés. Tous les taxons présents dans l'échantillon doivent être saisis dans la flore totale. Si ce n'est pas le cas, lors d'une extraction des flores totales, les taxons présents dans l'échantillon mais non saisis dans la flore totale sont perdus. Parallèlement si le même taxon est saisi à la fois sur une flore partielle et une flore totale sur le même échantillon, lors de l'extraction des données de ce taxon, l'utilisateur obtiendra 2 lignes de résultats pour le même taxon.



**Ne pas saisir une partie des taxons sur FLORPAR et une autre sur FLORTOT.**  
**Si deux analyses ont été réalisées sur le même échantillon (FLORPAR + FLORTOT), tous les taxons présents dans l'échantillon doivent être regroupés dans la FLORTOT sans doublon et seule une FLORTOT est saisie.**

ALEX	0
DINO	100
PSNZ	180 000

ALEX	FACULTATIF
DINO	100
PSNZ	180 000
TAX1	X
TAX2	X
TAX3	X
...	

ALEX	0
DINO	0
PSNZ	120 000
TAX1	X
TAX2	X
TAX3	X
...	

Dénombrement facultatif puisque déjà dénombré dans la FLORPAR

MAX des 2 dénombrements

### Autres exemples d'erreurs de saisie :

Si aucun *Pseudo-nitzschia* n'a été observé, seul le genre *Pseudo-nitzschia* est saisi à "0"

Si une espèce de *Dinophysis* a été identifiée et dénombrée, seule cette espèce est saisie.

FLORIND-Masse ...	Pseudo-nitzschia	0
FLORIND-Masse ...	Ostreopsis	0
FLORIND-Masse ...	Alexandrium	0
<del>FLORIND-Masse ...</del>	<del>Dinophysis</del>	<del>0</del>
FLORIND-Masse ...	Lingulodinium polyedrum	0
<del>FLORIND-Masse ...</del>	<del>Pseudo-nitzschia, groupe des larges symétriques (fraudulenta)</del>	<del>0</del>
<del>FLORIND-Masse ...</del>	<del>Pseudo-nitzschia, groupe des larges asymétriques (australis + se...</del>	<del>0</del>
<del>FLORIND-Masse ...</del>	<del>Pseudo-nitzschia, complexe seriata, groupe des larges (australis ...</del>	<del>0</del>
<del>FLORIND-Masse ...</del>	<del>Pseudo-nitzschia, complexe delicatissima, groupe des fines (calli...</del>	<del>0</del>
<del>FLORIND-Masse ...</del>	<del>Pseudo-nitzschia, complexe seriata, groupe des effilées (multiser...</del>	<del>0</del>
FLORIND-Masse ...	Prorocentrum lima	0
FLORIND-Masse ...	Gonyaulax spinifera	0
FLORIND-Masse ...	Protoceratium reticulatum	0
FLORIND-Masse ...	Dinophysis tripos	100

De nombreuses flores ne sont pas saisies sur le bon paramètre, il faut être très vigilant.

Lors de la sélection du paramètre il est très facile de cliquer à côté.

<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Paramètre	Support	Fraction	Métho
FLORTOT	Masse d'eau, e...	Sans objet	Comp'
FLORPAR	Masse d'eau, e...	Sans objet	Comp'
FLORIND	Masse d'eau, e...	Sans objet	Comp'

### Vérification – contrôle – validation

Toutes les données des documents d'enregistrement du laboratoire doivent être **vérifiées** avant saisie. Particulièrement les calculs des abondances de cellules.

Après saisie, les données de la base doivent être **contrôlées** avant validation. Pour ces contrôles, Il convient de vérifier si toutes les données de la base sont égales à celles notées dans les documents d'enregistrement du laboratoire et si toutes les données existantes dans les documents du laboratoire, sont bien présentes dans la base.

Il convient d'utiliser les documents d'enregistrement initiaux du laboratoire pour ces contrôles. Particulièrement : les étiquettes ou autres documents d'identification des prélèvements d'échantillon pour la partie [Passage-prélèvement-échantillon] et les originaux des fiches de résultat pour la partie [Résultat].

Il convient de tracer les vérifications et contrôles.

Lorsque tous les documents ont été comparés, si besoin, les corrections sont réalisées. Le cas échéant, un contrôle des corrections est effectué.

Lorsque toutes les données sont correctes dans la base QUADRIGE<sup>2</sup>, elles sont **validées** (au sens quadrigé) ce qui les rend disponibles au delà du producteur de la données et notamment dans SURVAL. Toutefois, ces données ne sont pas qualifiées, c'est pourquoi, en cas de fourniture de données à un utilisateur extérieur, l'envoi doit toujours être accompagné d'un message avertissant le destinataire que l'utilisation de ces données est sous sa responsabilité, en lui demandant de citer la source ([voir Cahier REPHY en vigueur, Point : Mise à disposition des information et données](#)).

### Référentiel taxinomique

Le référentiel taxinomique de la base Quadrigé<sup>2</sup> est maintenu conforme au Worms<sup>2</sup>. Lorsque une mise à jour est réalisée par la cellule Q<sup>2</sup>, celle ci impacte également les données déjà saisies. Un commentaire est ajouté sur la donnée renseignant le précédent nom de taxon qui avait été saisi.

Pour certains taxons dont l'identification est incertaine le référentiel est complété par des taxons dit virtuels qui correspondent à des regroupements de taxons aux morphologies très proches. La liste de ces taxons ainsi que des conseils d'utilisation sont présentés en ANNEXE III.

Nouveauté octobre 2019 dans Quadrigé :

Pratiquement, le saisisseur sélectionne sa liste de taxon à saisir comprenant des taxons référents et éventuellement des taxons synonymes. Lors de l'intégration dans la grille de saisie, cette liste est intégrée dans le champ "Taxon saisi" et l'application Quadrigé renseigne le champ "Taxon" avec uniquement des taxons référents.

Le champ "Taxon" de la grille de saisie = le champ "Taxon référent" du module d'extraction.

Lors des mises à jour du référentiel, les taxons référents seront mis à jour sans modifier le champ "Taxon saisi". Ainsi on gardera toujours en mémoire le taxon saisi initialement.

La série historique n'est pas encore mise à jour car elle nécessitera de prendre en compte le champ "Commentaire sur le résultat".

<sup>2</sup> WoRMS : World Register of Marine Species - <http://www.marinespecies.org/index.php>



## 12 CONSERVATION DES DOCUMENTS

Tous les documents d'enregistrement permettant la traçabilité du prélèvement aux résultats doivent être conservés. Il est fortement recommandé de scanner ces documents et de stocker les fichiers sur un disque réseau qui est sauvegardé quotidiennement afin d'alléger les stockages de papiers.

Ces documents seront indispensables à la procédure de qualification des données dans quadrigé. Et, de plus, ils peuvent contenir des informations complémentaires qui ne peuvent pas être bancarisées et qui peuvent servir à la valorisation de ces données.

Ceci concerne en particulier des fiches paillasse de dénombrement des flores. Si celles-ci contiennent toutes les informations permettant de remonter au prélèvement (lieu, date, heure, service préleveur, niveau, immersion, engin de prélèvement) il est possible de ne pas conserver les étiquettes de prélèvement ou autre document intermédiaire.

Les documents d'enregistrement des contrôles métrologiques doivent aussi être conservés sous forme de fichiers numériques

## ANNEXE I. DOCUMENTS ET OUTILS D'AIDE À L'IDENTIFICATION

Liste non exhaustive

### DOCUMENTS

**Bérard-Therriault L., Poulin M., Bossé L., 1999.** Guide d'identification du phytoplancton marin de l'estuaire et du Golfe du Saint-Laurent incluant également certains protozoaires, Publ. Spéc.can. halieut.aquat.128. 387p.

**Carmelo R. Tomas, 1997.** [Identifying Marine Phytoplankton. London: Academic Press.](#)

**Delgado M., Fortuño J.M., 1991.** Atlas de Fitoplancton del Mar Mediterráneo, 133 p.

**Drebes G. Marines Phytoplakton, 1974.** Ed : Georg Thieme Verlag Stuttgart. ISBN 3 13 503901 3

**Hoppenrath M., Murray S.H., Chomérat N., Horiguchi T., 2014.** Marine benthic dinoflagellates – unveiling their worldwilde biodiversity. ISBN 978-3-510-61402-8

**Hoppenrath M., Elbrächter M., Drebes G., 2009.** Marine phytoplankton – Selected micorphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. ISBN 978-3-510-61392-2

**Kraberg A., Baumann M., Dürselen C.D., 2010.** Coastal Phytoplankton – Photo Guide for Northern European Seas. ISBN 978-3-89937-113-0

**Lassus P., 1978.** Catalogue descriptif des principaux organismes responsables d'eaux rouges. 60 p.

**Lassus P., 1980.** Mise à jour des données sur les organismes responsables d'eaux colorées. Extension au phytoplancton produisant des toxines, 200 p.

**Lassus P., 1988.** Plancton toxique et plancton d'eaux rouges sur les côtes européennes, 111 p.

**Lassus P., Partensky F., 1991.** Le phytoplancton nuisible des côtes de France : de la biologie à la prévention, 154 p.

**Lassus.P., Chomérat N., Hess P., Nézan E., 2016.** [Toxic and Harmful Microalgae 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. \(Bilingual English/French\).](#)

**Moestrup, Ø. (ed.):** IOC Taxonomic Reference List of Toxic Algae, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 2004. <http://www.marinespecies.org/hab/>

**Nézan E., Piclet G., 1996.** Guide pratique à l'usage des analystes du phytoplancton. Ce guide comprend des fiches par taxon. ISBN 2-919373-21-5

**Nézan E., 1996.** Surveillance du phytoplancton marin, (les principales classes hormis les diatomophycées). Manuel illustré adapté à la formation des analystes. Document IFREMER.

**Paulmier G., 1992.** Catalogue illustré des microphytes planctoniques et benthiques des côtes normandes. Rapport IFREMER/DRV/RH/92.007, 107 pp.

**Paulmier G., 1997.** Atlas des diatomophycées des côtes françaises et des aires océaniques adjacentes. Rapport interne IFREMER/DRV/RH/97-014, 148 pp.

Sournia A. (ed.), 1986 – 1990. Atlas du phytoplancton marin (éditions du CNRS) :

- Sournia A., 1986, volume 1 : cyanophycées, dictyochophycées, dinophycées, raphidophycées. 219 pp, 46 pl.
- Ricard M. 1987, volume 2 : diatomophycées. 297 pp, 71 pl.
- Chrétiennot-Dinet M.J., 1990, volume 3 : chlorarachniophycées, chlorophycées, chrysophycées, cryptophycées, euglénophycées, eustigmatophycées, prasinophycées, prymnésiohycées, rhodophycées, tribophycées. 260 p, 49 pl.

Sournia A., Belin C., Berland B., Erard-Le Denn E., Gentien P., Grzebyk D., Marcaillou-Le Baut C., Lassus P., Partensky F., 1991. Le phytoplancton nuisible des côtes de France : de la biologie à la prévention, 154 p.

Takuo Omura, Mitsunori Iwataki, Valeriano M. Borja, Haruyoshi Takayama, Yasuwo Fukuyo 2012. Marine Phytoplankton of the Western Pacific. Kouseisha Kouseikaku, Tokyo, 160 pp.

Trégouboff G., Rose M., 1957. Manuel de planctonologie méditerranéenne, 2 vol.

#### Outils numériques

Nézan E., Rocher G., 2003. Les microalgues productrices de toxines. Guide illustré de présentation des micro-algues productrices de toxines à l'usage des analystes du REPHY, Document IFREMER Concarneau.  
<http://w3.ifremer.fr/surveillance/rephy/dia-taxinomie.htm>

Nézan E. & Rocher G., 2002. Diaporama didactique sur les diatomées.  
<http://w3.ifremer.fr/surveillance/rephy/dia-taxinomie.htm>

Animation interactive permettant la visualisation des caractères morphologiques du genre *Alexandrium* :  
[http://envlit.ifremer.fr/documents/documents\\_pedagogiques/alexandrium\\_minutum\\_plaques](http://envlit.ifremer.fr/documents/documents_pedagogiques/alexandrium_minutum_plaques)

Animation interactive permettant de visualiser les différences morphologiques entre les populations d'*Alexandrium minutum* :  
[http://envlit.ifremer.fr/documents/documents\\_pedagogiques/alexandrium\\_minutum\\_morphotypes](http://envlit.ifremer.fr/documents/documents_pedagogiques/alexandrium_minutum_morphotypes)

#### Site IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful MicroAlgae.

Moestrup, Ø.; Akselmann-Cardella, R.; Fraga, S.; Hoppenrath, M.; Iwataki, M.; Komárek, J.; Larsen, J.; Lundholm, N.; Zingone, A. (Eds) (2009 onwards). IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Accessed at <http://www.marinespecies.org/hab> on 2019-11-21. doi:10.14284/362  
<http://www.marinespecies.org/hab/>

#### Site du WoRMS.

WoRMS Editorial Board (2019). World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2019-11-21. doi:10.14284/170  
<http://www.marinespecies.org/index.php>

#### Site AlgaeBase.

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2019. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.  
<https://www.algaebase.org/>; searched on 21 November 2019.  
<https://www.algaebase.org/>

Site Nordic Microalgae and aquatic protozoa, développé et exploité par l'Institut suédois de météorologie et d'hydrologie (SMHI).

<http://nordicmicroalgae.org/>

#### Site PlanktonNet.

Plankton\*Net Data Provider at the Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research. hdl:10013/de.awi.planktonnet

<https://planktonnet.awi.de/>

#### Site 3i Interactive Key and Taxonomic Database Software.

Dmitry A. Dmitriev, Center for Biodiversity, Illinois Natural History Survey

3i (Internet-accessible Interactive Identification) est un ensemble d'outils logiciels permettant de créer des clés d'identification en ligne, des bases de données taxonomiques et des révisions taxonomiques virtuelles. On y trouve les 3 clés suivantes

Harmful algae (Plantae) (by Sing Tung Teng).

Species of Gambierdiscus (Goniodomataceae).

<http://dmitriev.speciesfile.org/key.asp?key=Bacillariales&lng=En&i=1&keyN=1>

Species of Pseudo-nitzschia (Bacillariaceae).

<http://dmitriev.speciesfile.org/key.asp?key=Bacillariales&lng=En&i=1&keyN=2>

Species of Alexandrium (Ostreopsidaceae).

<http://dmitriev.speciesfile.org/key.asp?key=Bacillariales&lng=En&i=1&keyN=3>

**SiteTree of Life Web pProject.** Maddison, D. R. and K.-S. Schulz (eds.) 2007. The Tree of Life Web Project. Internet address: <http://tolweb.org>

Hoppenrath, Mona and Juan F. Saldarriaga. 2012. Dinoflagellates. Version 15 December 2012 (under construction).

<http://tolweb.org/Dinoflagellates/2445/2012.12.15> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>

<http://tolweb.org/Dinoflagellates/2445>

## ANNEXE II. ÉTALONNAGES

- Mesurer au pied à coulisse le diamètre des cuves. En général et quasiment toujours, elles mesurent 24 mm de diamètre. Calculer la surface de la cuve. Pour un diamètre de 24 mm, la surface est de  $452\,389\,342\,\mu\text{m}^2$ . Le nombre de cellules comptées sur cette surface correspond donc au nombre de cellule présentes dans le volume de la cuve.
- Etalonner le micromètre oculaire pour chaque objectif et combinaison optique (dans le cas de bague de grandissement supplémentaire) à l'aide d'une lame micrométrique étalon, en superposant les graduations de l'oculaire à celles du micromètre étalon placé sur la platine.

Il existe des lames micrométriques de 1, 2 ou 50 mm. Sur la lame micrométrique, 100 graduations = 1 mm. Entre deux graduations il y a donc 10  $\mu\text{m}$ .

Aligner et orienter les deux graduations de manière à faire coïncider l'origine du micromètre étalon à une graduation de l'oculaire.

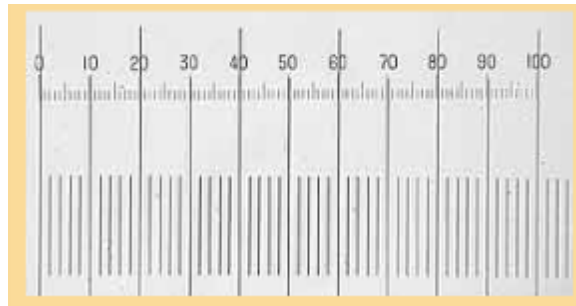


Figure 17 : image de correspondance entre le micromètre oculaire et le micromètre objet de la lame étalon

Noter le nombre de graduations de l'oculaire correspondant à 100 graduations de l'étalon (ou au nombre de graduations apparaissant dans le champ selon le grossissement utilisé) et en déduire la valeur d'une division de l'oculaire. Ces résultats permettront de mesurer avec précision les cellules observées.

- Mesurer le diamètre des champs pour chaque grossissement à l'aide de la lame micrométrique étalon. Avec l'objectif x 10, le micromètre étalon ne couvre pas tout le champ. Pour mesurer le diamètre du champ, utiliser le micromètre oculaire, maintenant étalonné, mesurer la distance entre deux objets repérés de part et d'autre du diamètre du champ (par exemple, en utiliser du papier calque millimétré ou des objets algaux ou particules du fond d'une cuve).
- Calculer les surfaces des champs pour chaque grossissement. Établir les facteurs à appliquer pour rapporter le nombre de cellule comptées dans le champ à la surface de la cuve puis rapporter au litre et ceci pour chaque grossissement.
- Calculer les surfaces des transects diamètre pour chaque grossissement.
- Établir les facteurs à appliquer pour calculer les concentrations en nombre de cellule par litre dans le cas d'un comptage par champ ou par transect, rapporté à la surface de la cuve et donc au volume de la cuve, puis au litre.

Etablir un tableau de correspondance entre le nombre de cellules comptées par sous échantillonnage (transect ou champ) et le nombre de cellule par litre et ceci pour chaque grossissement et chaque volume de cuve.

Consigner tous ces résultats dans une fiche. Cette fiche doit être à disposition des utilisateurs du microscope.

**NB : la lame micrométrique peut également servir à l'étalonnage des échelles générées par les logiciels de traitement des images numériques acquises.**

**Exemples de tableaux de correspondances résultant de l'étalonnage  
(microscope du LER/MPL site de Nantes Leica DMI 3000 B – N° 2007-5-224) :**

Références du microscope	OBJECTIF x bague	OCULAIRE (nb divisions)	Nb de div correspondant MICROMETRE Leica 11513106	VALEUR d'1 division du micromètre oculaire (µm)
<b>Microscope Leica DMI 3000 B – N° 2007-5-224</b>	<b>10 x1</b>	100	99	<b>9,9</b>
	<b>20 x1</b>	100	49	<b>4,9</b>
	<b>40 x1</b>	100	25	<b>2,5</b>

Table 1 : Etalonnage des micromètres oculaires

Références du microscope	OBJECTIF x bague	Valeur du diamètre mesuré (mm)	Surface calculée du champ (mm²)
<b>Microscope Leica DMI 3000 B – N° 2007-5-224</b>	<b>10 x1</b>	2.16	<b>3,66</b>
	<b>20 x1</b>	1.08	<b>0,91</b>
	<b>40 x1</b>	0.55	<b>0,24</b>

Table 2 : Mesures des diamètres et calculs des surfaces des champs

Références du microscope	OBJECTIF x bague	Valeur surface transect (mm²)
<b>Microscope Leica DMI 3000 B – N° 2007-5-224</b>	<b>10 x1</b>	2,16 x 24 = <b>51,84</b>
	<b>20 x1</b>	1,08 x 24 = <b>25,92</b>
	<b>40 x1</b>	0,55 x 24 = <b>13,2</b>

Table 3 : Calcul des surfaces des transects sur diamètre de la cuve (diamètre champ x diamètre cuve)

Le diamètre des cuves est de : 24 mm soit une surface de 452,39 mm²

Aire observée	Notation	Cuve de 10 ml	Cuve de 20 ml	Cuve de 25 ml
Demi surface de cuve	½ C	<b>200</b>	<b>100</b>	<b>80</b>
Surface totale de la cuve	1 C	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>40</b>

Table 4 : Facteurs à appliquer pour le calcul du nombre de cellule par litre

Nb de ☉	Cuve 10 mL			Cuve 20 mL			Cuve 25 mL		
	obj. X 10	obj. X 20	obj. X 40	obj. X 10	obj. X 20	obj. X 40	obj. X 10	obj. X 20	obj. X 40
1	873	1745	3427	436	873	1714	349	698	1371
2	436	873	1714	218	436	857	175	349	685
3	291	582	1142	145	291	571	116	233	457

Table 5 : Facteurs à appliquer pour le calcul du nombre de cellules par litre  
en fonction du nombre de transects-diamètres dénombrés

Exemple avec 1 diamètre et objectif 10 :

(Surface cuve / surface transect ) x 100 soit (51,84 / 452.39) x 100 = 873

## Microscope Leica DMI 3000 B – N° 2007-5-224

Nb de champs	Cuve 10 mL			Cuve 20 mL			Cuve 25 mL		
	obj. X 10	obj. X 20	obj. X 40	obj. X 10	obj. X 20	obj. X 40	obj. X 10	obj. X 20	obj. X 40
1	12346	49 383	190414	6173	24691	95207	4938	19753	76165
2	6 173	24 691	95 207	3 086	12 346	47 603	2 469	9 877	38 083
3	4 115	16 461	63 471	2 058	8 230	31 736	1 646	6 584	25 388
4	3 086	12 346	47 604	1 543	6 173	23 802	1 235	4 938	19 041
5	2 469	9 877	38 083	1 235	4 938	19 041	988	3 951	15 233
6	2 058	8 231	31 736	1 029	4 115	15 868	823	3 292	12 694
7	1 764	7 055	27 202	882	3 527	13 601	705	2 822	10 881
8	1 543	6 173	23 802	772	3 086	11 901	617	2 469	9 521
9	1 372	5 487	21 157	686	2 743	10 579	549	2 195	8 463
10	1 235	4 938	19 041	617	2 469	9 521	494	1 975	7 617
11	1 122	4 489	17 310	561	2 245	8 655	449	1 796	6 924
12	1 029	4 115	15 868	514	2 058	7 934	412	1 646	6 347
13	950	3 799	14 647	475	1 899	7 324	380	1 519	5 859
14	882	3 527	13 601	441	1 764	6 801	353	1 411	5 440
15	823	3 292	12 694	412	1 646	6 347	329	1 317	5 078
16	772	3 086	11 901	386	1 543	5 950	309	1 235	4 760
17	726	2 905	11 201	363	1 452	5 600	290	1 162	4 480
18	686	2 744	10 579	343	1 372	5 289	274	1 097	4 231
19	650	2 599	10 022	325	1 300	5 011	260	1 040	4 009
20	617	2 469	9 521	309	1 235	4 760	247	988	3 808

Table 6 : Facteurs à appliquer pour le calcul du nombre de cellules par litre  
en fonction du nombre de champs dénombrés

### ANNEXE III. MODÈLE EXEMPLE DE FICHE DE RÉSULTAT

A imprimer sur feuille A3 recto verso

N° enregistrement échantillon :

#### PASSAGE

Lieu de surveillance (libellé-Mnémon) :

Date passage : ☐  Heure passage : ☐

Autre information éventuelle :

#### OBSERVATIONS SUR LE VIVANT (Facultatif)

Date, heure :

Visa agent observateur :

Volume filtré	<input type="text"/>	Volume du concentrât	<input type="text"/>	Volume observé	<input type="text"/>
---------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------	----------------------

#### ESPECES TOXIQUES OU DOUTEUSES

#### AUTRES COMMENTAIRES



☐ case à cocher lors de la vérification des calculs de résultats. ☐ case à cocher lors du contrôle des saisies dans Quadriges<sup>2</sup>.



DIATOMEES (suite)				
Taxons	Comptage	Aire observée	Objectif et bague	Résultat (nb de cel/L)
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>

DINOFLAGELLES				
Taxons	Comptage	Aire observée	Objectif et bague	Résultat (nb de cel/L)
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>

AUTRES CLASSES				
Taxons	Comptage	Aire observée	Objectif et bague	Résultat (nb de cel/L)
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>

DIATOMEES (suite)				
Taxons	Comptage	Aire observée	Objectif et bague	Résultat (nb de cel/L)
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>

DINOFLAGELLES (suite)				
Taxons	Comptage	Aire observée	Objectif et bague	Résultat (nb de cel/L)
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>

AUTRES CLASSES (suite)				
Taxons	Comptage	Aire observée	Objectif et bague	Résultat (nb de cel/L)
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>
				<input type="radio"/> <input type="checkbox"/>

<b>VERIFICATION DES CALCULS DE RESULTATS</b>	Fait le	VISA
--	---------	------

**SAISIE DANS BANQUE DE DONNEES CENTRALISEE (QUADRIGE<sup>2</sup>)**

Date des saisies	VISA	Contrôle des saisies le	VISA

## ANNEXE IV. PRÉCISION DES COMPTAGES

Si l'on considère que les populations comptées respectent une distribution de Poisson dans la chambre de sédimentation, on peut évaluer la précision des comptages. L'intervalle de confiance (pour un niveau de signification de 95%) est calculé grâce au pourcentage de confiance suivant : **% confiance =  $\pm 200\% / \sqrt{n}$**  (où  $n$  est le nombre de cellules comptées).

Exemple : On travaille avec une chambre de sédimentation de 10 mL, 5 *Dinophysis* y ont été comptés, ce comptage donne 500 cell/L

le % de confiance =  $\pm 200\% / \sqrt{5} = 89,44\%$

les limites attendues du comptage sont : 89,44 % de 500 cell/L =  $(500/100) \times 89,44 = 447$

résultat final : nombre de cellules de *Dinophysis* par litre =  $500 \pm 447$  cell/L

Le tableau ci-dessous donne l'exemple de l'intervalle de confiance du comptage pour une lecture de cuves entières de 10 mL et de 25 mL. Cette méthode de calcul de précision peut être adaptée à tout dénombrement réalisé à partir d'une surface élémentaire de lecture (donc du volume correspondant), qu'elle soit un ou plusieurs champs oculaires, un ou plusieurs transects, une portion de cuve ou une cuve entière.

nb cell. lues	% confiance	Cuve de 10 ml			Cuve de 25 ml		
		cell/l	min cell/l	max cell/l	cell/l	min cell/l	max cell/l
1	200	100	1	300	40	1	120
2	141	200	2	483	80	2	193
3	115	300	3	646	120	3	259
4	100	400	4	800	160	4	320
5	89	500	53	947	200	21	379
6	82	600	110	1090	240	44	436
7	76	700	171	1229	280	68	492
8	71	800	234	1366	320	94	546
9	67	900	300	1500	360	120	600
10	63	1000	368	1632	400	147	653
11	60	1100	437	1763	440	175	705
12	58	1200	507	1893	480	203	757
13	55	1300	579	2021	520	232	808
14	53	1400	652	2148	560	261	859
15	52	1500	725	2275	600	290	910
16	50	1600	800	2400	640	320	960
17	49	1700	875	2525	680	350	1010
18	47	1800	951	2649	720	381	1059
19	46	1900	1028	2772	760	411	1109
20	45	2000	1106	2894	800	442	1158
25	40	2500	1500	3500	1000	600	1400
30	37	3000	1905	4095	1200	762	1638
35	34	3500	2317	4683	1400	927	1873
40	32	4000	2735	5265	1600	1094	2106
45	30	4500	3158	5842	1800	1263	2337
50	28	5000	3586	6414	2000	1434	2566
55	27	5500	4017	6983	2200	1607	2793
60	26	6000	4451	7549	2400	1780	3020
65	25	6500	4888	8112	2600	1955	3245
70	24	7000	5327	8673	2800	2131	3469
75	23	7500	5768	9232	3000	2307	3693
80	22	8000	6211	9789	3200	2484	3916
85	22	8500	6656	10344	3400	2662	4138
90	21	9000	7103	10897	3600	2841	4359
95	21	9500	7551	11449	3800	3020	4580
100	20	10000	8000	12000	4000	3200	4800
150	16	15000	12551	17449	6000	5020	6980
200	14	20000	17172	22828	8000	6869	9131
250	13	25000	21838	28162	10000	8735	11265
300	12	30000	26536	33464	12000	10614	13386
350	11	35000	31258	38742	14000	12503	15497
400	10	40000	36000	44000	16000	14400	17600
500	9	50000	45528	54472	20000	18211	21789
1000	6	100000	93675	106325	40000	37470	42530

## ANNEXE V. CONTRÔLES QUALITÉ ET VALIDATION DE LA MÉTHODE

Fréquence	Objectif	Méthode de contrôle
Annuelle	<b>Validation de l'homogénéisation</b> - Évaluer l'étape d'homogénéisation de l'échantillon en testant sa reproductibilité - Évaluer la variabilité associée à la préparation des cuves	à partir d'un même échantillon, trois cuves de 10 ml sont préparées à au moins 1 jour d'intervalle (ré-homogénéisation). Dans chaque cuve les 3 même taxons sont dénombrés (cuve entière ou ½ cuve): 1 taxon abondant de petite taille (15-25 µm et au moins 200 cellules comptées), 1 abondant de plus grande taille (>25 µm et au moins 100 cellules comptées) et 1 en faible abondance (au moins 10 cellules comptées).
	<b>Répétabilité et reproductibilité</b> - Tester la répétabilité et contrôler l'aptitude des opérateurs (maintien de l'habilitation)	A partir d'un même échantillon, trois répliques de 10 ml et trois de 25 ml sont testés simultanément par tous les opérateurs. Comparer la quantification des 3 mêmes taxons de chaque analyste pour chaque cuve.
Annuel et à chaque modification de procédure de nettoyage	<b>Validation de la procédure de nettoyage des chambres de sédimentation et du flaconnage (blanc d'essai)</b> - Assurer la non contamination des chambres de sédimentation, du flaconnage et l'absence de faux positifs.	1/un échantillon d'eau distillée est placé à sédimenter dans une chambre de sédimentation numérotée choisie au hasard puis analysé. 2/Un flacon d'échantillonnage est choisi au hasard, rempli au tiers par de l'eau distillée. L'eau est agitée vigoureusement dans le flacon puis analysée.

## Calculs d'évaluation de conformité

### Validation de l'homogénéisation

Par hypothèse l'opération du comptage phytoplanctonique n'est pas une source de variabilité. Ainsi les différences entre les comptages sont supposées être entièrement imputables à la préparation des sous échantillons, et en particulier à l'opération d'homogénéisation. Dans ce contexte, tester l'homogénéité des sous échantillon revient à tester l'indépendance des sous-échantillons est des résultats de comptage. Cela implique le calcul d'un écart des comptages observés à des comptages théoriques sous l'hypothèse d'indépendance :

Comptages observés				
	Tax 1	Tax 2	Tax 3	Total
S.E. 1	O <sub>11</sub>	O <sub>12</sub>	O <sub>13</sub>	O <sub>1.</sub>
S.E. 2	O <sub>21</sub>	O <sub>22</sub>	O <sub>23</sub>	O <sub>2.</sub>
S.E. 3	O <sub>31</sub>	O <sub>32</sub>	O <sub>33</sub>	O <sub>3.</sub>
Total	O <sub>.1</sub>	O <sub>.2</sub>	O <sub>.3</sub>	O <sub>..</sub>

Comptages théoriques				
	Tax 1	Tax 2	Tax 3	Total
S.E. 1	T <sub>11</sub>	T <sub>12</sub>	T <sub>13</sub>	O <sub>1.</sub>
S.E. 2	T <sub>21</sub>	T <sub>22</sub>	T <sub>23</sub>	O <sub>2.</sub>
S.E. 3	T <sub>31</sub>	T <sub>32</sub>	T <sub>33</sub>	O <sub>3.</sub>
Total	O <sub>.1</sub>	O <sub>.2</sub>	O <sub>.3</sub>	O <sub>..</sub>

Avec  $T_{ij} = (O_{i.} * O_{.j}) / O_{..}$ , soit l'effectif théorique de la cellule en ligne i et colonne j et le produit du total de la ligne i par le total de la colonne j divisé par le total général des lignes et des colonnes. Dans le cas de n=3 taxons et m=3 sous-échantillons la statistique du  $\chi^2$  à (n-1)\*(m-1)=4 degrés de liberté est

$$\chi^2_4 = \sum_{ij} \frac{(O_{ij} - T_{ij})^2}{T_{ij}}$$

Soit la somme des écarts, entre comptages observés et théoriques, au carré, divisés par les comptages théoriques. Dans le cas de 3 taxons et 3 sous échantillons, au risque de première espèce de 5 %, la valeur seuil pour laquelle l'hypothèse de résultats homogènes est rejetée est 9.49 : c'est-à-dire que si la statistique du  $\chi^2$  est supérieure à 9.49 alors on ne peut pas accepter l'hypothèse d'homogénéité des résultats. Le test est applicable lorsque tous les effectifs théoriques sont non nuls et que 80 % d'entre eux sont supérieurs à 5. Dans notre cas au regard du faible nombre d'effectifs théoriques, tous les effectifs théoriques doivent être supérieurs à 5. Cette condition devrait être remplie puisque l'on compte des taxons prépondérants. À noter également que l'annexe F.4 précise que le test peut être réalisé si environ 200 algues sont comptées dans chaque échantillon, c'est-à-dire  $O_{i.} \sim 200$ .

### Validation de la répétabilité

Ici l'approche est en miroir de la validation de l'homogénéisation. Cette fois-ci, par hypothèse les échantillons sont supposés homogènes et la seule source de variabilité réside dans l'opération de comptage. Comme précédemment, tester l'homogénéité des comptages se ramène au test de l'indépendance des sous échantillons et des comptages, soit les mêmes calculs et le même résultat.

### Validation de la reproductibilité

Ici, la question est celle de l'indépendance des comptages relativement à la taille des cuves et les multiples analystes. Comme précédemment, le test d'indépendance permet de tester cette hypothèse. La procédure est la même que précédemment, mais avec plus de cuves et d'analystes.

**Un tableau Excel est fourni par le service VIGIES et comprend les formules des calculs d'évaluation des conformités testées. Seuls les nombres de cellules comptées sont à reporter dans ce tableau (ne pas rapporter à 1 litre). Voir tableau ci dessous.**

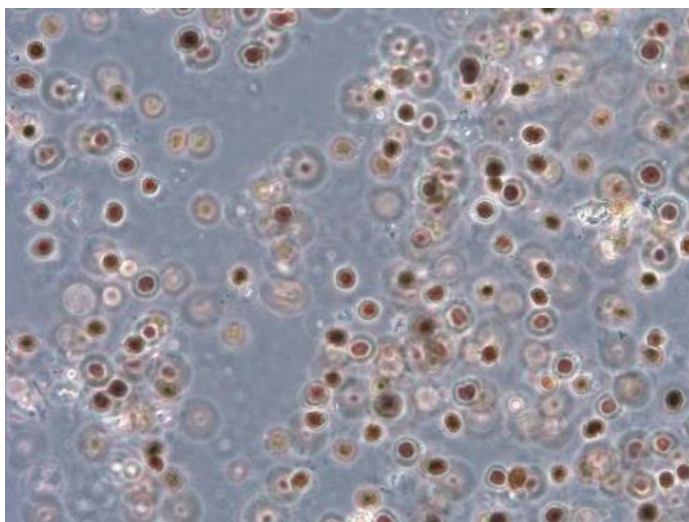
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W																																																																																																																											
1	<p><b>Contrôles qualité - Validation quantitative</b> <b>PLAN DU TEST A REALISER</b></p>																																																																																																																																																	
2																																																																																																																																																		
3																																																																																																																																																		
4	<p><b>Homogénéisation - Répétabilité - Reproductibilité</b></p>																																																																																																																																																	
5	<p><b>Jour 1 - Cuve 10 mL n°1</b></p>																																																																																																																																																	
6	<p><b>Jour 2 - Cuve 10 mL n°2</b></p>																																																																																																																																																	
7	<p><b>Jour 3 - Cuve 10 mL n°3</b></p>																																																																																																																																																	
8	<p><b>Jour 1 - Cuve 25 mL n°1</b></p>																																																																																																																																																	
9	<p><b>Jour 1 - Cuve 25 mL n°2</b></p>																																																																																																																																																	
10	<p><b>Jour 1 - Cuve 25 mL n°3</b></p>																																																																																																																																																	
11																																																																																																																																																		
12																																																																																																																																																		
13																																																																																																																																																		
14	<p><b>Contrôle - Homogénéisation</b></p>																																																																																																																																																	
15	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">Comptages inférieurs</th> </tr> <tr> <th>Tax 1</th> <th>Tax 2</th> <th>Tax 3</th> <th>Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>S.E. 1</td> <td>236</td> <td>105</td> <td>14</td> <td>355</td> </tr> <tr> <td>S.E. 2</td> <td>230</td> <td>122</td> <td>18</td> <td>370</td> </tr> <tr> <td>S.E. 3</td> <td>244</td> <td>118</td> <td>10</td> <td>372</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>710</td> <td>345</td> <td>42</td> <td>1097</td> </tr> </tbody> </table>																							Comptages inférieurs				Tax 1	Tax 2	Tax 3	Total	S.E. 1	236	105	14	355	S.E. 2	230	122	18	370	S.E. 3	244	118	10	372	Total	710	345	42	1097																																																																																															
Comptages inférieurs																																																																																																																																																		
Tax 1	Tax 2	Tax 3	Total																																																																																																																																															
S.E. 1	236	105	14	355																																																																																																																																														
S.E. 2	230	122	18	370																																																																																																																																														
S.E. 3	244	118	10	372																																																																																																																																														
Total	710	345	42	1097																																																																																																																																														
16																																																																																																																																																		
17																																																																																																																																																		
18																																																																																																																																																		
19																																																																																																																																																		
20																																																																																																																																																		
21	<p><b>Conclusion : CONFORME</b></p>																																																																																																																																																	
22																																																																																																																																																		
23																																																																																																																																																		
24	<p><b>Contrôle - Répétabilité</b></p>																																																																																																																																																	
25	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">Comptages inférieurs</th> </tr> <tr> <th>Tax 1</th> <th>Tax 2</th> <th>Tax 3</th> <th>Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>S.E. 1</td> <td>236</td> <td>105</td> <td>14</td> <td>355</td> </tr> <tr> <td>S.E. 2</td> <td>230</td> <td>122</td> <td>18</td> <td>370</td> </tr> <tr> <td>S.E. 3</td> <td>244</td> <td>118</td> <td>10</td> <td>372</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>710</td> <td>345</td> <td>42</td> <td>1097</td> </tr> </tbody> </table>																							Comptages inférieurs				Tax 1	Tax 2	Tax 3	Total	S.E. 1	236	105	14	355	S.E. 2	230	122	18	370	S.E. 3	244	118	10	372	Total	710	345	42	1097																																																																																															
Comptages inférieurs																																																																																																																																																		
Tax 1	Tax 2	Tax 3	Total																																																																																																																																															
S.E. 1	236	105	14	355																																																																																																																																														
S.E. 2	230	122	18	370																																																																																																																																														
S.E. 3	244	118	10	372																																																																																																																																														
Total	710	345	42	1097																																																																																																																																														
26																																																																																																																																																		
27																																																																																																																																																		
28																																																																																																																																																		
29																																																																																																																																																		
30																																																																																																																																																		
31	<p><b>Conclusion : CONFORME</b></p>																																																																																																																																																	
32																																																																																																																																																		
33																																																																																																																																																		
34	<p><b>Contrôle - Reproductibilité</b></p>																																																																																																																																																	
35	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="12">Comptages inférieurs</th> </tr> <tr> <th>Tax 1</th> <th>Tax 2</th> <th>Tax 3</th> <th>Tax 1</th> <th>Tax 2</th> <th>Tax 3</th> <th>Tax 1</th> <th>Tax 2</th> <th>Tax 3</th> <th>Tax 1</th> <th>Tax 2</th> <th>Tax 3</th> <th>Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>S.E. 1</td> <td>236</td> <td>105</td> <td>14</td> <td>230</td> <td>102</td> <td>18</td> <td>244</td> <td>118</td> <td>10</td> <td>236</td> <td>105</td> <td>14</td> <td>355</td> </tr> <tr> <td>S.E. 2</td> <td>230</td> <td>122</td> <td>18</td> <td>242</td> <td>115</td> <td>10</td> <td>238</td> <td>108</td> <td>20</td> <td>230</td> <td>122</td> <td>18</td> <td>370</td> </tr> <tr> <td>S.E. 3</td> <td>244</td> <td>118</td> <td>10</td> <td>238</td> <td>110</td> <td>10</td> <td>232</td> <td>110</td> <td>10</td> <td>244</td> <td>118</td> <td>10</td> <td>372</td> </tr> <tr> <td>S.E. 4</td> <td>560</td> <td>262</td> <td>26</td> <td>590</td> <td>255</td> <td>36</td> <td>620</td> <td>250</td> <td>42</td> <td>560</td> <td>262</td> <td>26</td> <td>848</td> </tr> <tr> <td>S.E. 5</td> <td>600</td> <td>305</td> <td>30</td> <td>590</td> <td>287</td> <td>44</td> <td>590</td> <td>270</td> <td>38</td> <td>600</td> <td>305</td> <td>30</td> <td>945</td> </tr> <tr> <td>S.E. 6</td> <td>610</td> <td>295</td> <td>40</td> <td>560</td> <td>275</td> <td>30</td> <td>560</td> <td>275</td> <td>30</td> <td>610</td> <td>295</td> <td>40</td> <td>945</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>2450</td> <td>1207</td> <td>138</td> <td>2450</td> <td>1144</td> <td>155</td> <td>2470</td> <td>1113</td> <td>195</td> <td>2450</td> <td>1207</td> <td>138</td> <td>3825</td> </tr> </tbody> </table>																							Comptages inférieurs												Tax 1	Tax 2	Tax 3	Tax 1	Tax 2	Tax 3	Tax 1	Tax 2	Tax 3	Tax 1	Tax 2	Tax 3	Total	S.E. 1	236	105	14	230	102	18	244	118	10	236	105	14	355	S.E. 2	230	122	18	242	115	10	238	108	20	230	122	18	370	S.E. 3	244	118	10	238	110	10	232	110	10	244	118	10	372	S.E. 4	560	262	26	590	255	36	620	250	42	560	262	26	848	S.E. 5	600	305	30	590	287	44	590	270	38	600	305	30	945	S.E. 6	610	295	40	560	275	30	560	275	30	610	295	40	945	Total	2450	1207	138	2450	1144	155	2470	1113	195	2450	1207	138	3825
Comptages inférieurs																																																																																																																																																		
Tax 1	Tax 2	Tax 3	Tax 1	Tax 2	Tax 3	Tax 1	Tax 2	Tax 3	Tax 1	Tax 2	Tax 3	Total																																																																																																																																						
S.E. 1	236	105	14	230	102	18	244	118	10	236	105	14	355																																																																																																																																					
S.E. 2	230	122	18	242	115	10	238	108	20	230	122	18	370																																																																																																																																					
S.E. 3	244	118	10	238	110	10	232	110	10	244	118	10	372																																																																																																																																					
S.E. 4	560	262	26	590	255	36	620	250	42	560	262	26	848																																																																																																																																					
S.E. 5	600	305	30	590	287	44	590	270	38	600	305	30	945																																																																																																																																					
S.E. 6	610	295	40	560	275	30	560	275	30	610	295	40	945																																																																																																																																					
Total	2450	1207	138	2450	1144	155	2470	1113	195	2450	1207	138	3825																																																																																																																																					
36																																																																																																																																																		
37																																																																																																																																																		
38																																																																																																																																																		
39																																																																																																																																																		
40																																																																																																																																																		
41																																																																																																																																																		
42																																																																																																																																																		
43	<p><b>Conclusion : CONFORME</b></p>																																																																																																																																																	
44	<p><b>HD (reproductibilité des comptages) ne peut être rejetée</b></p>																																																																																																																																																	



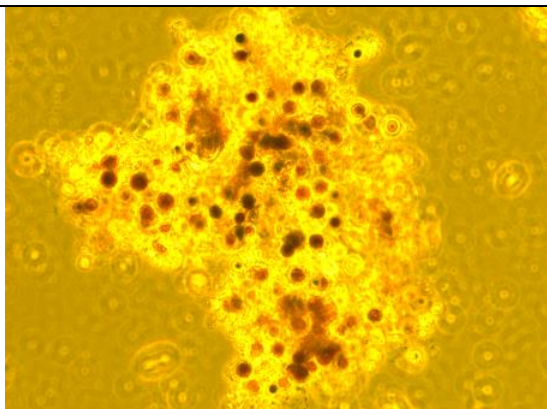
## ANNEXE VI. IDENTIFICATION, COMPTAGE ET SAISIE : CAS PARTICULIERS POSANT QUESTION

Photo : ©Ifremer – Auteur Nadine Neaud Masson

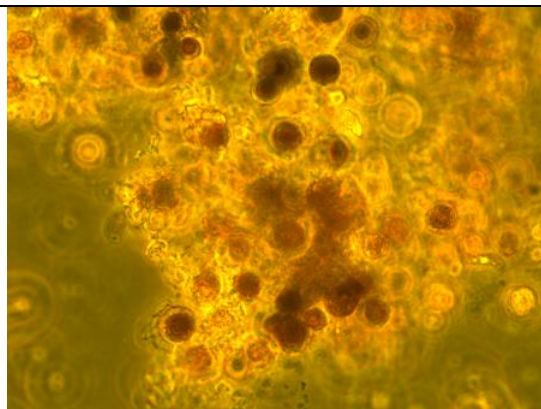
*Lepidodinium chlorophorum* (M.Elbrächter & E.Schnepf) Gert Hansen, L.Botes & M.de Salas, 2007



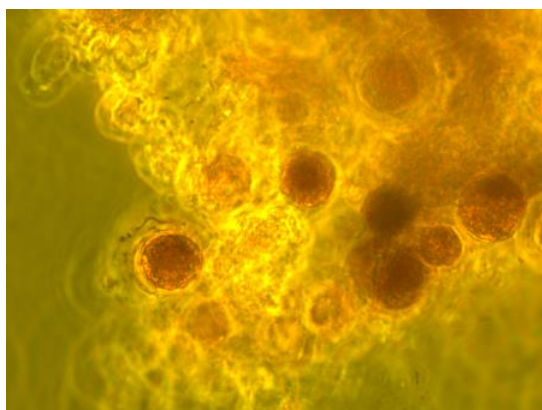
Bloom exceptionnel de *Lepidodinium chlorophorum* (cellules fixées au lugol), cas d'un échantillon nécessitant une dilution.



Agglomérat de cellules lugolées (photo prise à l'objectif x10)

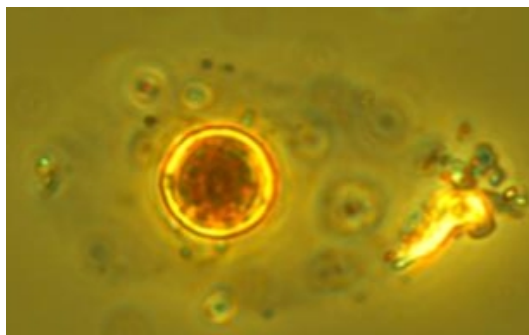


Le même agglomérat de cellules lugolées (photo prise à l'objectif x20)

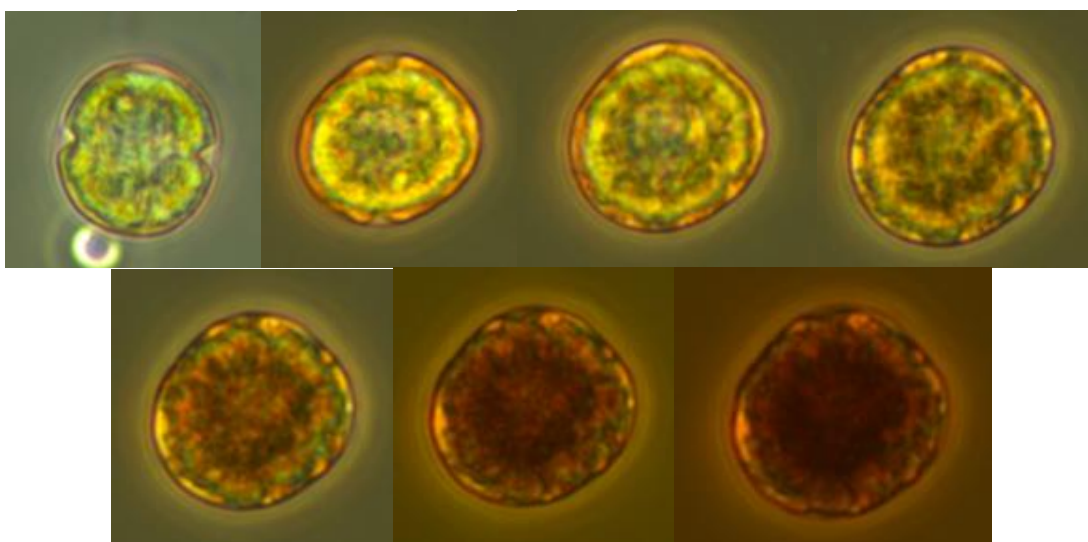


Zoom sur une partie du même agglomérat à l'objectif x40.

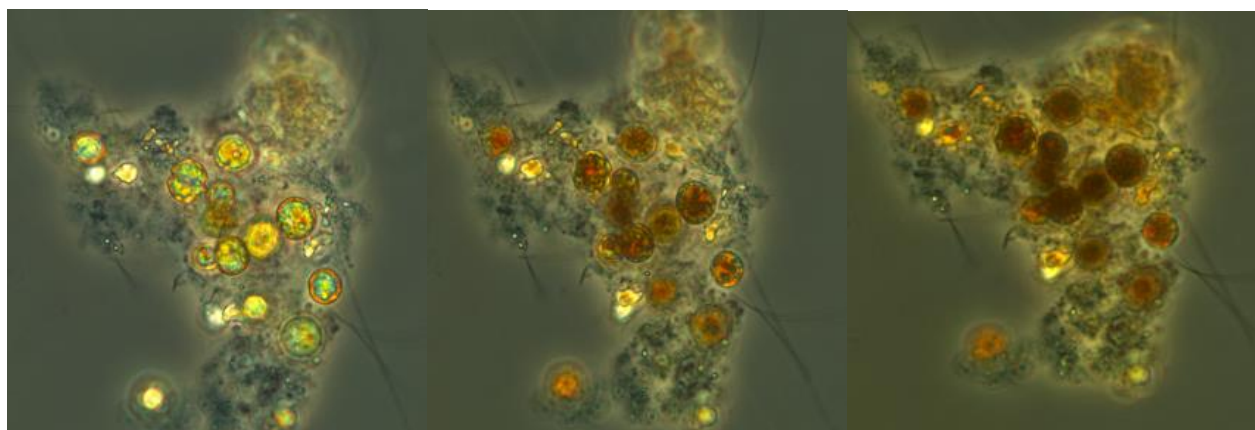




Gangue muqueuse autour d'une cellule isolée lugolée.



Effet du lugol sur une même cellule isolée.



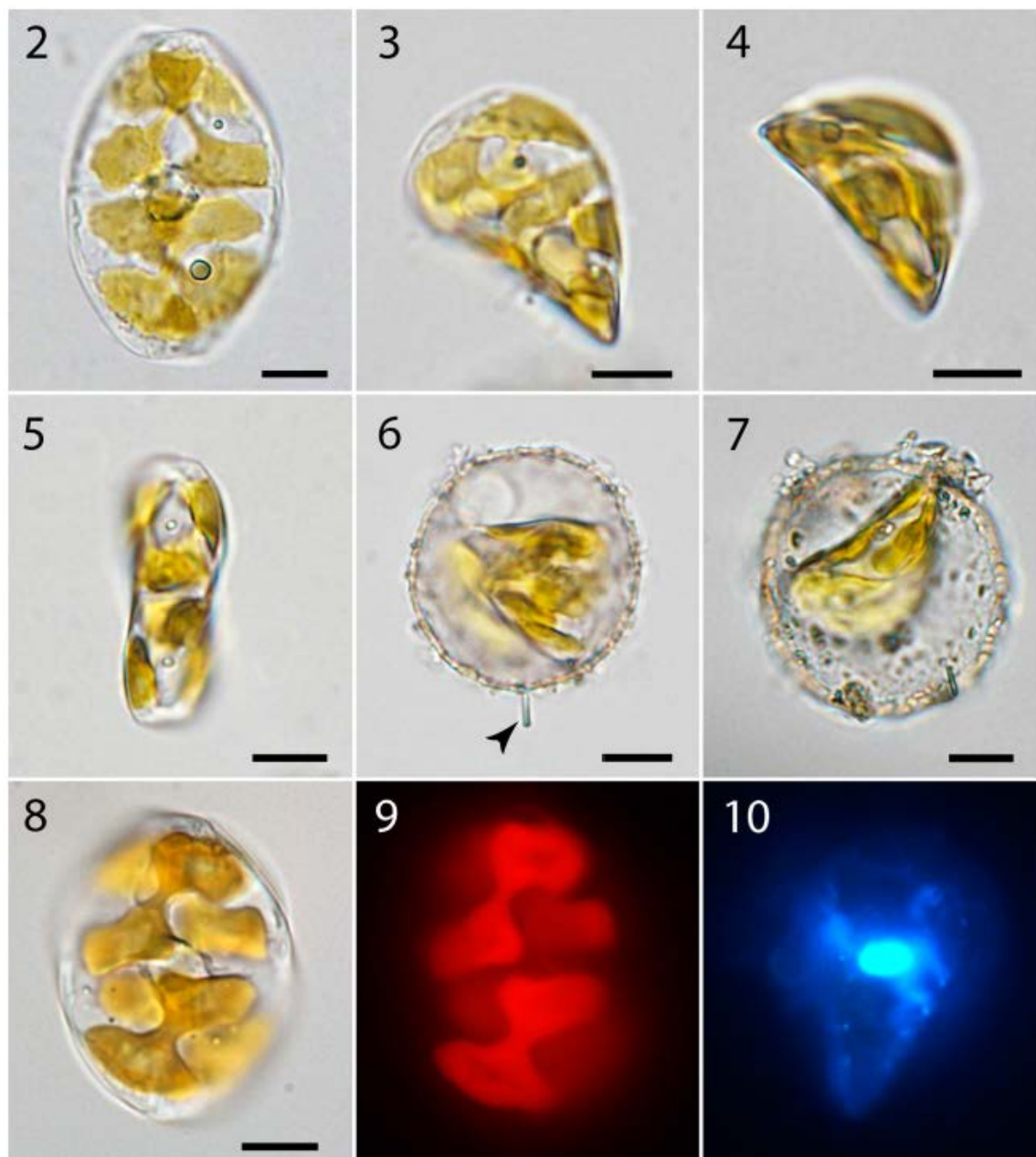
Effet du lugol sur un agglomérat de cellules.

*Plagiolemma distortum* Nézan in Nézan et al. 2018

Espèce nouvellement décrite et observée en Manche et nord Gascogne :

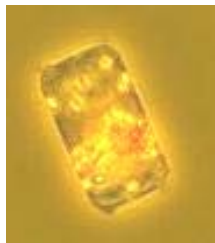
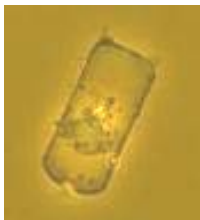
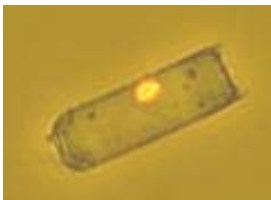
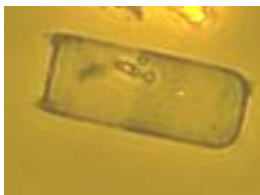
Nezan Elisabeth, Bilien Gwenael, Boulben Sylviane, Mertens Kenneth, Chomerat Nicolas (2018). Description and phylogenetic position of *Plagiolemma distortum* sp. nov., a new raphid diatom (Bacillariophyceae) from French coastal waters. *Diatom Research*, 33(1), 13-24. Publisher's official version : <https://doi.org/10.1080/0269249X.2018.1468359> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00441/55235/>

4 Nézan et al.


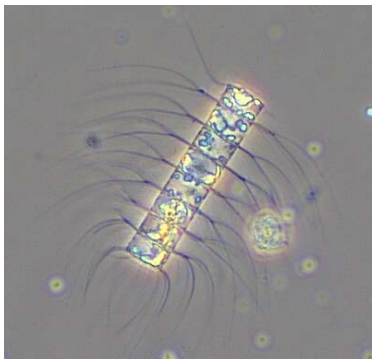
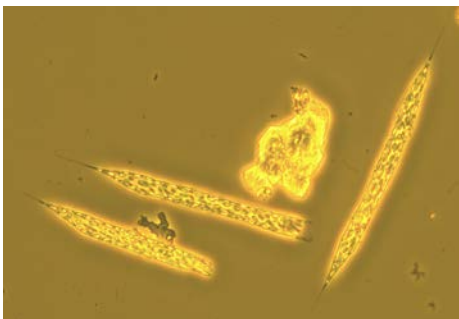


**Figs 2–10.** Light and epifluorescence micrographs of *Plagiolemma distortum* sp. nov. **Fig. 2.** Median focus of a cell in girdle view, showing plastids, nucleus and granules. **Fig. 3.** Cell in oblique girdle view. **Fig. 4.** Cell in oblique polar view. **Fig. 5.** Cell in oblique valve view. **Fig. 6.** Capsule with two cells inside and a stalk-like structure (arrowhead). **Fig. 7.** Surface focus of a capsule with trapped sediment particles. **Fig. 8.** Cell showing the yellow-brown colour of the plastids. **Fig. 9.** The same cell in epifluorescence microscopy showing the complexly lobed plastids (red). **Fig. 10.** DAPI-stained cells showing the autofluorescent nucleus (blue). Scale bars = 10  $\mu$ m.

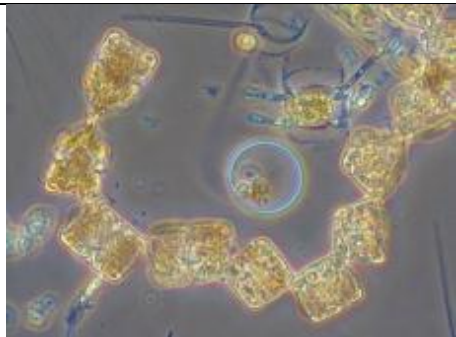
### Stades de dégénérescence des cellules

Cellules prises en compte	Cellules non comptées si la floraison de l'espèce a été détectée lors de l'échantillonnage précédent, si non il faut les compter car témoignant d'une fin de floraison.
	  

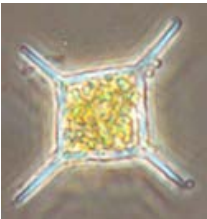
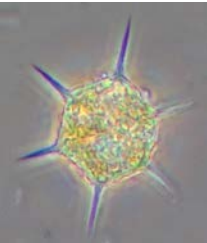

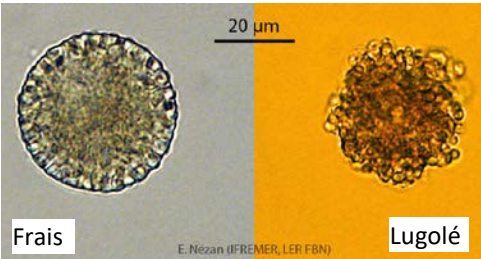
### Nombre de cellules comptées dans les exemples suivant :

	Cas de cellules déformées : ici 2 cellules de <i>Pseudo-nitzschia</i> présentent des caractères morphologiques inhabituels. Dans l'image, 3 cellules sont comptées
	6 cellules (8 dont 2 quasiment vides)
	2 demi + 1 entière = 2 cellules

Niveau d'identification, quelques exemples

Taxons douteux (tri alphabétique)	Difficultés pour l'identification	Choix à appliquer (saisie dans Q <sup>2</sup> )
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	Deux espèces référencées dans le WoRMS <i>A. glacialis</i> et <i>A. tropicalis</i> . Mais il semble en exister bien plus (7 dans Algaebase) non différenciables en microscopie optique	Saisir sur l'espèce <i>Asterionellopsis glacialis</i> . Qui sera considéré comme un complexe
<i>Biddulphia alternans</i> Ou <i>Biddulphia</i> sp.	<i>Biddulphia alternans</i> est l'ancien nom de <i>Trigonium alternans</i> ce n'est donc <b>surement pas à saisir dans <i>Biddulphia</i></b> et cette espèce forme des chaînes typiques	 Saisir sur <i>Trigonium alternans</i>
<i>Biddulphia</i> <i>Odontella</i> <i>Trieres</i>	Certaines espèces du genre <i>Biddulphia</i> ont été renommées d'abord dans le genre <i>Odontella</i> ( <i>O. aurita</i> , <i>O. mobiliensis</i> , <i>O. regia</i> , <i>O. sinensis</i> ...) Puis <i>Trieres mobiliensis</i> et <i>Trieres regia</i> . <i>O. sinensis</i> devrait devenir <i>T. sinensis</i> . (ce n'est pas encore à jour ni dans le WoRMS ni dans Q <sup>2</sup> )	Si l'observateur n'arrive pas à identifier l'une des espèces de <i>Trieres</i> , saisir sur <i>Trieres</i> (ordre des Triceraciales) et surtout pas sur <i>Biddulphia</i> (ordre des Biddulphiales) dont le genre répertorie des taxons encore réferents ( <i>B. biddulphiana</i> , <i>B. rhombus</i> ...)
<i>Cerataulina pelagica</i>	Cinq espèces référencées dans le WoRMS. <i>C. pelagica</i> est la seule identifiée dans nos eaux	Saisir sur espèce <i>Cerataulina pelagica</i> . Ultérieurement, s'il est considéré que des confusions étaient certaines, les données pourront être précisées dans la base
<i>Ceratium</i> , <i>Neoceratium</i> <i>Tripos</i>	De nombreuses espèces de <i>Ceratium</i> ont été renommées dans les genres <i>Neoceratium</i> ou <i>tripos</i>	Si doute, saisir sur la famille Ceratiaceae Nota : en eau de mer ce sont plutôt des <i>Tripos</i>



Taxons douteux (tri alphabétique)	Difficultés pour l'identification	Choix à appliquer (saisie dans Q <sup>2</sup> )
<p><i>Dictyocha fibula</i> (4 épines), <i>D. speculum</i> (6 épines) <i>Octactis octonaria</i> (8 épines)</p>	<p>La famille des Dictyochaceae renferme 16 genres, dont un grand nombre d'espèces sont fossiles. Le genre <i>Dictyocha</i> renferme 42 espèces et <i>Octactis</i> 4. Certaines espèces d'<i>Octactis</i> ont pour même nom d'origine que certaines espèces de <i>Dictyocha</i>.</p> <p>Il existe aussi des formes nues (sans squelette) il faut aussi dénombrer ces cellules.</p>	<p>Saisir sur :</p>  <p><i>Dictyocha fibula</i> (4 épines)</p>  <p><i>D. speculum</i> (6 épines)</p>  <p><i>Octactis octonaria</i> (8 épines)</p>  <p><i>Dictyocha</i> (forme nue à indiquer dans le commentaire du résultat)</p>
<p><i>Ditylum brightwellii</i></p>	<p>Trois espèces référencées dans le WoRMS <b>non différenciables en microscopie optique</b>. Il semble que <i>Ditylum brightwellii</i> soit la seule identifiée dans nos eaux</p>	<p><b>Continuer à Saisir</b> sur l'espèce <i>Ditylum brightwellii</i>. Ultérieurement, s'il est considéré que des confusions étaient certaines, les données pourront être <b>précisées</b> dans la base</p>
<p><i>Gonyaulax spinifera</i></p>	<p>Plusieurs espèces possèdent la même morphologie au niveau des cellules végétatives. Il s'agit donc d'un complexe d'espèces</p>	<p>Les données saisies dans Q<sup>2</sup> sur ce taxon sont considérées comme celles du complexe <i>G. spinifera</i>. Les nouvelles données sont à saisir sur le taxon virtuel qui a été créé : <i>Gonyaulax complexe spinifera</i> (<i>alaskensis</i> + <i>diegensis</i> + <i>digitale</i> + <i>spinifera</i>)</p>

Taxons douteux (tri alphabétique)	Difficultés pour l'identification	Choix à appliquer (saisie dans Q <sup>2</sup> )
<i>Gymnodiniaceae</i> <i>Kareniaceae</i>	Parmi ces deux familles de dinoflagellés nus, certaines espèces nanoplanctoniques sont extrêmement difficiles à différencier. Seule la forme du sillon apical (quasi invisible en microscopie optique) permet de classer les cellules dans l'une ou l'autre des familles. <b>Mais il n'est pas envisageable de créer un taxon virtuel regroupant ces deux familles.</b>	Si doute, saisir sur l'ordre des Gymnodiniales
<i>Gyrodinium spirale</i>	Plusieurs espèces possèdent la même morphologie. Il s'agit donc d'un complexe d'espèces	Les données saisies dans Q <sup>2</sup> sur ce taxon <b>sont à considérer comme celles du complexe <i>Gyrodinium spirale</i>.</b>
<i>Heterocapsa niei</i> ou <i>Heterocapsa</i> sp.	<i>H. triquetra</i> peut être distingué par sa pointe antapicale. De plus <i>H. triquetra</i> est de plus grande taille que les autres espèces de ce genre. Les autres espèces du genre sont difficiles à identifier et peuvent être confondues avec des espèces du genre <i>Azadinium</i>	Hormis <i>Heterocapsa triquetra</i> , saisir sur le genre <i>Heterocapsa</i> ou <i>Azadinium</i> selon votre hypothèse. Sachant qu'il peut y avoir confusion, les données seront précisées dans le commentaire
<i>Lauderia</i> <i>Schroederella</i> <i>Detonula</i>	Les taxons <i>Lauderia</i> ( <i>Thalassiosirales</i> ) et <i>Schroederella</i> devenu <i>Detonula</i> ( <i>Melosirale</i> ) ne sont pas distinguables	Saisir sur le taxon virtuel : <i>Lauderia</i> + <i>detonula</i>
<i>Leptocylindrus</i>	L'identification au niveau de l'espèce est douteuse	On peut distinguer les formes de type <i>L. minimus</i> des autres, qui sont à saisir sur les taxons virtuels : <i>Leptocylindrus</i> , complexe <i>danicus</i> groupe des larges ( <i>danicus</i> + <i>curvatus</i> + <i>mediterraneus</i> + <i>aporus</i> + <i>convexus</i> + <i>hargravesii</i> + <i>adriaticus</i> ) <i>Leptocylindrus</i> , complexe <i>minimus</i> groupe des fines ( <i>minimus</i> + <i>Tenuicylindrus belgicus</i> )
<i>Lithodesmium undulatum</i> ou <i>Lithodesmium</i> sp.	Trois espèces sont répertoriées dans le WoRMS	Saisir sur l'espèce <i>Lithodesmium undulatum</i> . Ultérieurement, s'il est considéré que des confusions étaient certaines, les données pourront être corrigées dans la base
<i>Nitzschia longissima</i> / <i>Ceratoneis closterium</i> redevenu <i>Cylindrotheca closterium</i> ) 	La distinction de ces espèces est délicate. Certain utilisent le critère arbitraire de la taille. Extrait du WoRMS: <i>Nitzschia longissima</i> a pour basionyme et synonyme <i>Ceratoneis longissima</i> Par ailleurs : Variety  <i>Nitzschia longissima</i> var. <i>closterium</i> (Ehrenberg) Van Heurck, 1885 accepted as  <i>Nitzschia closterium</i> (Ehrenberg) W.Smith, 1853 accepted as  <i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin, 1964 accepted as  <i>Ceratoneis closterium</i> Ehrenberg, 1839	Saisir sur taxon virtuel : <i>Cylindrotheca closterium</i> + <i>Nitzschia longissima</i>

Taxons douteux (tri alphabétique)	Difficultés pour l'identification	Choix à appliquer (saisie dans Q²)
<i>Paralia sulcata</i> ou <i>Paralia</i> sp.	Les chaînes typiques de <i>Paralia sulcata</i> sont facilement reconnaissables	Saisir sur l'espèce <i>Paralia sulcata</i> . Ultérieurement, s'il est considéré que des confusions étaient certaines, les données pourront être corrigées dans la base
<i>Protoperidinium</i> , <i>Peridinium</i>	Difficulté à différencier ces genres	Le taxon virtuel " <i>Protoperidinium</i> + <i>Peridinium</i> " ne doit plus être utilisé. Utiliser plutôt l'ordre des Peridinales. Une liste de nouveaux taxons virtuels est à créer correspondant aux groupes présentés à la formation de Concarneau 2017 (travail en cours)
<i>Protoperidinium steinii</i> , <i>P. pyriforme</i> <i>Protoperidinium</i> <i>diabolum</i> + <i>longipes</i> <i>Protoperidinium</i> <i>pentagonum</i> + <i>latissimum</i>	Difficulté à différencier ces espèces	Seront remplacés par de nouveaux taxons virtuels correspondant aux groupes présentés à la formation de Concarneau 2017 (en cours)
<i>Scrippsiella</i>	Nombreuses confusions possibles (entre espèces et avec les genres voisins <i>Enciculifera</i> et <i>Pentapharsodinium</i> ...	Saisir sur le taxon virtuel <i>Scrippsiella</i> + <i>Enciculifera</i> + <i>Pentapharsodinium</i>
<i>Skeletonema costatum</i> ou <i>Skeletonema</i> sp.	Plusieurs espèces possibles non distinguables facilement	Saisir sur le genre <i>Skeletonema</i>
<i>Thalassionema</i> <i>nitzschoides</i> ou <i>Thalassionema</i> sp.	Plusieurs espèces possibles non distinguables facilement	Saisir sur le genre <i>Thalassionema</i> Si doute entre <i>Thalassionema</i> , <i>Thalassiothrix</i> et <i>Lioloma</i> , il faut remonter à <i>Thalassionemataceae</i>

## ANNEXE VII. TAXON VIRTUELS DANS LE RÉFÉRENTIEL DE QUADRIGE

### MISES À JOUR FAITES EN 2013 DANS LE RÉFÉRENTIEL DES TAXON DE QUADRIGE

Cas des taxons Protoctista, Pennales et Centrales

Protoctista ne doit plus être utilisé

Pennales a été remplacé par Pennées (taxon virtuel)

Centrales a été remplacé par Centriques (taxon virtuel)

#### ARGUMENTAIRE :

Pour ce qui est des Protoctista, selon Nicolas Chomérat <sup>3</sup>, on peut simplifier en disant Protoctista = Chromista + Protozoa + Plantae. Donc en aucun cas les Chromista seuls ne peuvent se substituer aux Protoctista. Par exemple, les Euglenophytes sont bien des Protoctista (ou protistes) mais n'appartiennent en aucun cas aux Chromista. Protoctista ne doit donc plus être utilisé, il faut essayer d'avoir une information taxinomique plus pertinente.

Pour ce qui est des diatomées, la nouvelle classification est plus complexe qu'auparavant, et pour un observateur habitué à la distinction Centrales/Pennales, il n'y a pas de moyen simple de garder cette distinction car Bacillariophytina = Bacillariophyceae + Fragilariophyceae + Mediophyceae, et Coscinodiscophytina = Coscinodiscophyceae. Les "centrales" étant Mediophyceae + Coscinodiscophyceae. Le problème majeur c'est que les formes typiques (Thalassiosirales et Coscinodisciales) deviennent très éloignées : on ne pourrait donc les regrouper que virtuellement par un taxon qui n'existe pas. De l'avis de N. Chomérat, il est donc utile de conserver la possibilité de distinguer entre Centrales et Pennales, car ce sera plus simple à renseigner pour un observateur. Mais par contre il ne faut plus utiliser la désinence en -ales qui laisse croire qu'il s'agit d'un ordre alors qu'il n'en est rien. Centriques et Pennées sont deux termes beaucoup plus neutres et judicieux, car indépendants de toute notion de taxinomie. Ce sont des taxons virtuels qui regroupent des organismes évolutivement éloignés mais pour lesquels la morphologie est si proche qu'on ne peut les distinguer facilement. Cependant, de nombreux genres de diatomées sont assez facilement identifiables : les taxons virtuels Centriques et Pennées devraient donc se restreindre à une liste de quelques genres de forme centrique, et n'être utilisés qu'en dernier recours.

---

<sup>3</sup> Expert en taxinomie du phytoplancton au laboratoire Ifremer / LER Concarneau



## REVUE ET MISES À JOUR FAITES EN 2018 DANS LE RÉFÉRENTIEL DES TAXONS DE QUADRIGE

Liste des taxons virtuels disponibles dans le référentiel des taxons dans Quadriga

Libellé taxon virtuel	Commentaires dans le référentiel Q <sup>2</sup>	Commentaires experts phyto
<i>Alexandrium tamarense</i> + <i>catenella</i> + <i>tamutum</i>	/	Selon les experts il faut identifier l'espèce car ce regroupement n'a pas de sens écologique. Si non saisir au genre.
<i>Amphidinium</i> + <i>Katodinium</i>	Créé à la demande de la coordination REPHY (30/09/2015)	Certaines espèces de ces deux genres ne peuvent être discriminées que par la nage sur cellules vivantes.
<i>Amylax triacantha</i> + <i>buxus</i>	/	Ok pour son utilisation
Centriques	Ancienne classification : centrales, encore représentée dans le WoRMS. Nom mis à jour le 04/04/2013 sur avis de Nicolas Chomérat pour le distinguer du niveau "Ordre" dans la taxinomie (suppression de la désinence en -ales).	Ok pour son utilisation
<i>Chaetoceros curvisetus</i> + <i>debilis</i> + <i>pseudocurvisetus</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Chaetoceros decipiens</i> + <i>lorenzianus</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Chaetoceros densus</i> + <i>eibonii</i> + <i>borealis</i> + <i>castracanei</i>	Nom mis à jour le 28/02/2018 (ancien nom : <i>Chaetoceros densus</i> + <i>castracanei</i> ) : ajout de nouvelles espèces pouvant être confondues entre elles	Ok pour la mise à jour faite en 2018
<i>Chaetoceros didymus</i> + <i>protuberans</i>	Nom mis à jour le 04/04/2013 en conformité avec le WoRMS (ancien nom : <i>Chaetoceros didymus</i> + <i>didymus</i> var. <i>protuberans</i> )	Ok pour son utilisation
<i>Chaetoceros fragilis</i> + <i>wighamii</i> + <i>diversus</i>	Mis à jour à la demande de la coordination REPHY et du LER/BO pour ajouter une espèce qui peut être confondue avec les autres (ancien libellé : <i>Chaetoceros fragilis</i> + <i>wighamii</i> ) (01/03/2018)	Ok pour la mise à jour faite en 2018
<i>Chaetoceros socialis</i> + <i>socialis f. radians</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Coscinodiscus</i> + <i>Stellarima</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Coscinodiscus asteromphalus</i> + <i>oculus-iridis</i> + <i>perforatus</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Coscinodiscus radiatus</i> + <i>marginatus</i>	/	Ok pour son utilisation

Libellé taxon virtuel	Commentaires dans le référentiel Q <sup>2</sup>	Commentaires experts phyto
<i>Cylindrotheca closterium</i> + <i>Nitzschia longissima</i>	Créé pour l'intégration des données phytoplancton Océan Indien (REPHY - RHLR). (16/01/2017)	A noter que le genre <i>Ceratoneis</i> n'est plus accepté dans le WoRMS ni dans AlgaeBase ni dans ITIS
<i>Dinophysis</i> + <i>phalacroma</i>	Ajouté à la demande de la coordination REPHY (28/02/2018)	nouveau taxon virtuel créé pour héberger les données saisies sur "Tous <i>Dinophysis</i> ronds avec épithèque bien visible"
<i>Dinophysis hastata</i> + <i>odiosa</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Diplopsalis</i> + <i>Diplopelta</i> + <i>Diplopsalopsis</i> + <i>Preperi dinium</i> + <i>Oblea</i>	Classification mise à jour suite à synonymie de Peridiniida avec Peridinales (16/01/2017)	
<i>Goniodoma sphaericum</i> + <i>orientale</i>	/	Permet de distinguer ce groupe de <i>Triadinium polyedricum</i> .
<i>Gonyaulax</i> complexe <i>spinifera</i> ( <i>alaskensis</i> + <i>diegensis</i> + <i>digitale</i> + <i>spinifera</i> )	Ajouté à la demande de la coordination REPHY (28/02/2018)	Ok pour ce nouveau taxon virtuel
<i>Gymnodinium</i> + <i>Gyrodinium</i>	/	Ok pour l'utilisation de ce groupe de genre. Mais pas OK pour créer un taxon virtuel Gymnodiniaceae + Kareniaceae
<i>Karenia brevis</i> + <i>papilionacea</i>	/	Il y a des données sur <i>K. brevis</i> , sur <i>K. papilionacea</i> et sur <i>K. brevis</i> + <i>papilionacea</i> . Vu que l'identification de <i>K. brevis</i> est douteuse pour les données de métropole et qu'il s'agit en réalité de <i>K. papilionacea</i> les données devront être corrigées en base et ce taxon virtuel deviendra obsolète (Travail à faire)
<i>Lauderia</i> + <i>Detonula</i>	Taxon mis à jour à la demande de la coordination REPHY et du LER/BO : ancien nom : " <i>Lauderia</i> + <i>Schroederella</i> ", modifié car il n'y a plus d'espèce de <i>Schroederella</i> acceptée, elles sont toutes synonymes de <i>Detonula pumila</i> . NB : <i>Schroederella</i> est bien synonyme de <i>Detonula</i> dans Algaebase mais pas encore dans Worms.	Ok

Libellé taxon virtuel	Commentaires dans le référentiel Q <sup>2</sup>	Commentaires experts phyto
<i>Leptocylindrus</i> , complexe <i>danicus</i> groupe des larges ( <i>danicus</i> + <i>curvatus</i> + <i>mediterraneus</i> + <i>aporus</i> + <i>convexus</i> + <i>hargravesii</i> + <i>adriaticus</i> )	Libellé mis à jour à la demande de la coordination REPHY et du LER/BO : ancien nom : " <i>Leptocylindrus danicus</i> + <i>curvatus</i> ". En réalité il s'agit d'un complexe d'espèces qui peuvent être confondues avec l'espèce <i>Leptocylindrus danicus</i> (01/03/2018)	Ok
<i>Leptocylindrus</i> , complexe <i>minimus</i> groupe des fines ( <i>L. minimus</i> + <i>Tenuicylindrus belgicus</i> )	Ajouté à la demande de la coordination REPHY (28/02/2018). <i>Tenuicylindrus belgicus</i> n'existe pas dans le WoRMS mais dans Algaebase. Complexe = toutes les espèces qui ressemblent à l'espèce <i>L. minimus</i> .	Ok
Nanoflagellés	Groupe hétérogène du nanoplancton flagellé principalement représenté par les Prymnesiophyceae, Chrysophyceae, Raphidophyceae, Cryptophyceae, Chlorophyceae et Prasinophyceae et qui sont impossibles à identifier par microscopie optique (16/01/2017)	Ok
<i>Navicula</i> + <i>Fallacia</i> + <i>Haslea</i> + <i>Lyrella</i> + <i>Petroneis</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Navicula gregaria</i> + <i>cryptocephala</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Nitzschia</i> + <i>Hantzschia</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Oxytoxum</i> + <i>Corythodinium</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Pachysphaera</i> + <i>Pterosperma</i>	/	Ok pour son utilisation
Pennées	Ancienne classification : Pennales, encore représentée dans le WoRMS. Nom mis à jour le 04/04/2013 sur avis de Nicolas Chomérat pour le distinguer du niveau "Ordre" dans la taxinomie (suppression de la désinence en -ales).	Ok pour son utilisation
<i>Phalacroma mitra</i> + <i>rapa</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Pleurosigma</i> + <i>Gyrosigma</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Prorocentrum balticum</i> + <i>cordatum</i>	Nom mis à jour le 04/04/2013 en conformité avec le WoRMS (ancien nom : <i>Prorocentrum minimum</i> + <i>balticum</i> + <i>cordatum</i> )	Se rappeler que <i>P. minimum</i> est devenu synonyme de <i>P. cordatum</i>
<i>Prorocentrum mexicanum</i> + <i>rhathymum</i>	/	Bien que <i>P. rhathymum</i> soit devenu synonyme de <i>P. mexicanum</i> , cette synonymie est disputée on conserve donc ce taxon virtuel

Libellé taxon virtuel	Commentaires dans le référentiel Q <sup>2</sup>	Commentaires experts phyto
<i>Prorocentrum micans</i> + <i>arcuatum</i> + <i>gibbosum</i> + <i>scutellum</i>	Libellé mis à jour à la demande de la coordination REPHY et du LER/BO (ancien libellé : <i>Prorocentrum micans</i> + <i>arcuatum</i> + <i>gibbosum</i> ) : ajout de l'espèce <i>P. scutellum</i> qui peut aussi être confondue avec les autres.	Ok
<b><i>Protoperidinium</i> + <i>Peridinium</i></b>	Taxon père mis à jour le 05/08/2013 en conformité avec le WoRMS (ancien père : Peridiniales) - Classification mise à jour suite à synonymie de Peridiniida avec Peridiniales	<b>A revoir et remplacer pas les groupements proposés à la formation à Concarneau en 2017 (en cours)</b>
<b><i>Protoperidinium diabolium</i> + <i>longipes</i></b>	Nom mis à jour le 26/04/2013 en conformité avec le WoRMS (ancien nom : <i>Protoperidinium diabolus</i> + <i>longipes</i> )	
<b><i>Protoperidinium pentagonum</i> + <i>latissimum</i></b>		
<b><i>Protoperidinium steinii</i> + <i>pyriforme</i></b>		
<i>Pseudo-nitzschia</i> , complexe <i>americana</i> ( <i>americana</i> + <i>brasiliensis</i> )	Mise à jour du libellé du taxon virtuel le 10/01/2013 (ancien nom : <i>Pseudo-nitzschia</i> , complexe <i>americana</i> ( <i>americana</i> ))	Ok pour son utilisation
<i>Pseudo-nitzschia</i> , complexe <i>delicatissima</i> , groupe des fines ( <i>calliantha</i> + <i>delicatissima</i> + <i>pseudodelicatissima</i> + <i>subcurvata</i> )	Mise à jour du libellé du taxon virtuel le 10/01/2013 (ancien nom : <i>Pseudo-nitzschia</i> , groupe des fines, complexe <i>delicatissima</i> ( <i>calliantha</i> + <i>delicatissima</i> + <i>pseudodelicatissima</i> ))	Ok pour son utilisation
<i>Pseudo-nitzschia</i> , complexe <i>seriata</i> , groupe des effilées ( <i>multiseries</i> + <i>pungens</i> )	Mise à jour du libellé du taxon virtuel le 10/01/2013 (ancien nom : <i>Pseudo-nitzschia</i> , groupe des effilées, complexe <i>seriata</i> ( <i>multiseries</i> + <i>pungens</i> ))	Ok pour son utilisation
<i>Pseudo-nitzschia</i> , complexe <i>seriata</i> , groupe des larges ( <i>australis</i> + <i>fraudulenta</i> + <i>seriata</i> + <i>subpacificica</i> )	Mise à jour du libellé du taxon virtuel le 10/01/2013 (ancien nom : <i>Pseudo-nitzschia</i> , groupe des larges, complexe <i>seriata</i> ( <i>australis</i> + <i>fraudulenta</i> + <i>seriata</i> + <i>subpacificica</i> ))	Ok pour son utilisation
<i>Pseudo-nitzschia</i> , groupe des larges asymétriques ( <i>australis</i> + <i>seriata</i> + <i>subpacificica</i> )	/	Ok pour son utilisation
<i>Pseudo-nitzschia</i> , groupe des larges symétriques ( <i>fraudulenta</i> )	/	Ok pour son utilisation
<i>Pseudo-nitzschia</i> , groupe des sigmoïdes ( <i>multistriata</i> )	/	Ok pour son utilisation

Libellé taxon virtuel	Commentaires dans le référentiel Q <sup>2</sup>	Commentaires experts phyto
<i>Rhaphoneis</i> + <i>Delphineis</i>	/	Remonter plutôt à Raphoneidaceae
<i>Rhizosolenia imbricata</i> + <i>styliformis</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Rhizosolenia setigera</i> + <i>setigera f. pungens</i>	Nom mis à jour le 04/04/2013 (ancien nom : <i>Rhizosolenia setigera</i> + <i>pungens</i> )	Ok pour son utilisation
<i>Scrippsiella</i> + <i>Enciculifera</i> + <i>Pentapharsodinium</i>	Libellé mis à jour à la demande de la coordination REPHY et du LER/BO : ancien nom : <i>Scrippsiella</i> + <i>Enciculifera</i> + <i>Pentapharsodinium</i> + <i>Bysmatrum</i> . Le genre <i>Bysmatrum</i> a été enlevé car en réalité les espèces de ce genre ne sont pas confondues avec les espèces de ce groupe.	Ok
<i>Synedra</i> + <i>Toxarium</i>	/	Ce taxon virtuel est composé de deux genres qui ne font pas partie de la même famille ce qui est gênant. Il est préférable d'éviter de l'utiliser
<i>Thalassiosira</i> + <i>Porosira</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Thalassiosira levanderi</i> + <i>minima</i>	/	Ok pour son utilisation
<i>Tripos lineatus</i> + <i>minutus</i>	Nom mis à jour le 01/03/2018 (ancien nom : <i>Neoceratium lineatum</i> + <i>minutum</i> )	Ok
<i>Warnowia</i> + <i>Nematodinium</i> + <i>Nematopsides</i>	/	Ok pour son utilisation

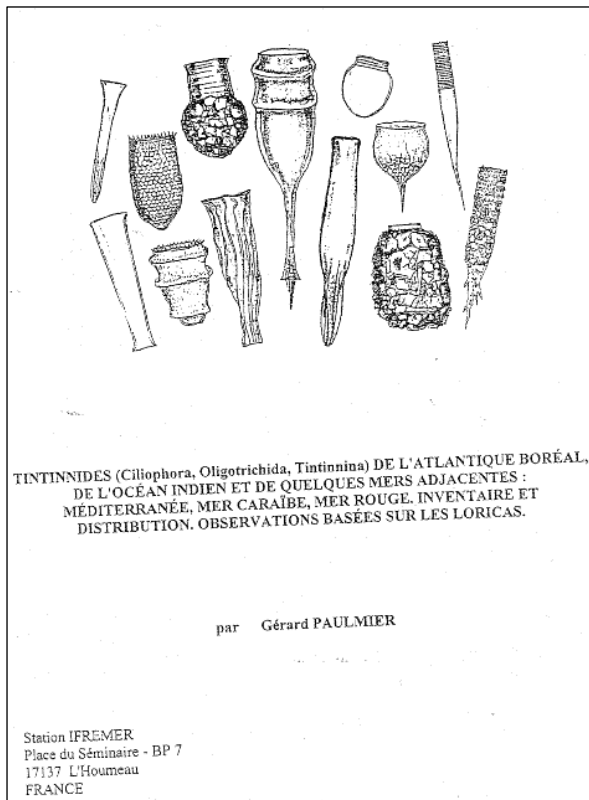
Liste des taxons virtuels qui ont été rendus obsolètes

Libellé taxon virtuel rendu obsolète	Commentaires
<i>Asterionella</i> + <i>Asterionellopsis</i> + <i>Asteroplanus</i>	Rendu obsolète à la demande de la coordination REPHY sur expertise LER/BO (28/02/2018). La distinction morphologique entre ces trois genres est possible. Ce groupe de taxon n'est plus trop utilisé depuis 2016. Pour les données existantes (980 enregistrements), on les a laissées sur ce taxon obsolète
<i>Ceratium tripos</i> + <i>Ceratium</i> à cornes recourbées	Ce taxon est obsolète depuis 2008. Pour les données existantes (437 enregistrements), on les a laissées sur ce taxon obsolète
<i>Eucampia</i> + <i>Climacodium</i>	Les 2 genres ont une distribution géographique différente : ils ne sont pas observés simultanément : Ce taxon virtuel n'est pas justifié. Pour les données existantes (1264 enregistrements), on les a laissées sur ce taxon obsolète.
<i>Eunotogramma</i> + <i>Anaulus</i> + <i>Terpsinoë</i>	Inutile et il n'y a pas de données saisies sur ce taxon. Le taxon à utiliser est la famille des Anaulaceae.

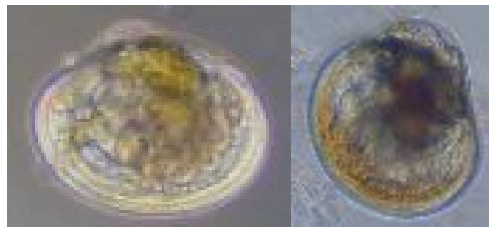
Liste des taxons virtuels qui ont été supprimés

libellé taxon virtuel supprimé	a été remplacé dans les données par :
<i>Actinoptychus senarius</i> + <i>campanulifer</i>	le genre <i>Actinoptychus</i>
<i>Dissodinium</i> + <i>Pyrocystis</i>	la famille des Pyrocystaceae
<i>Gomphonema</i> + <i>Gomphoneis</i>	la famille des Gomphonemataceae
<i>Podosira</i> + <i>Hyalodiscus</i>	la famille des Hyalodiscaceae
<i>Thalassionema</i> + <i>Thalassiothrix</i> + <i>Lioloma</i>	la famille des Thalassionemataceae
<i>Thalassiosira rotula</i> + <i>gravidia</i>	l'espèce <i>T. gravidia</i>
Tous <i>Dinophysis</i> ronds avec épithèque bien visible	le taxon virtuel <i>Dinophysis</i> + <i>Phalacroma</i>

*A ne pas dénombrer :*



Tintinnides



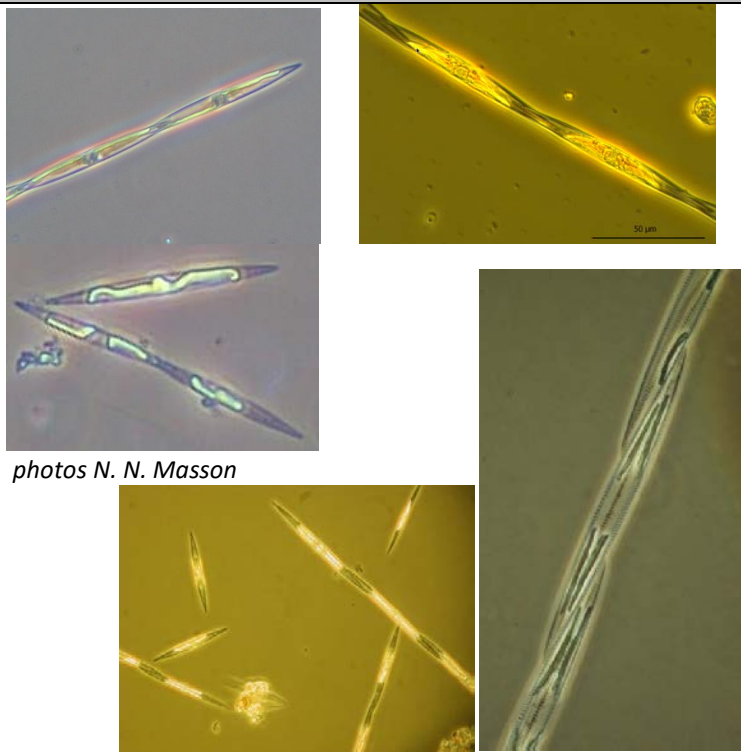
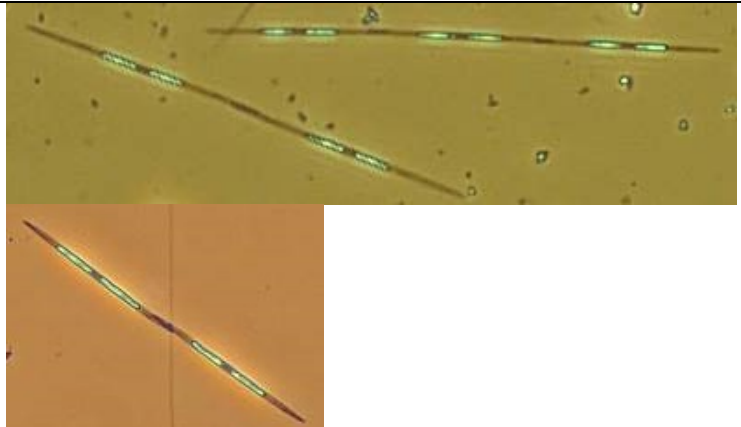
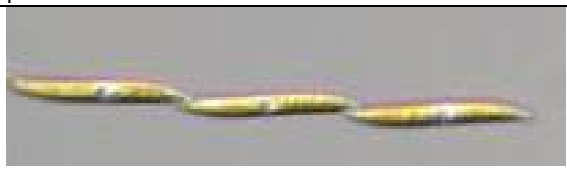
Larves de bivalves  
(ici non lugolées)




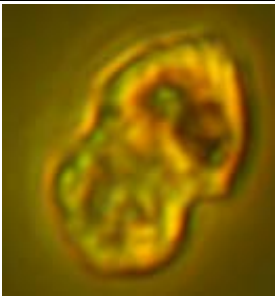

Grains de pollen de  
Gymnosperme.

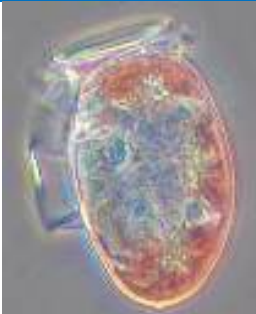
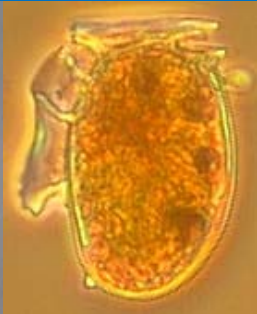
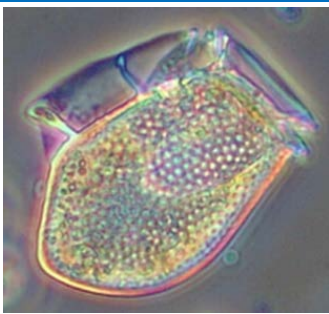

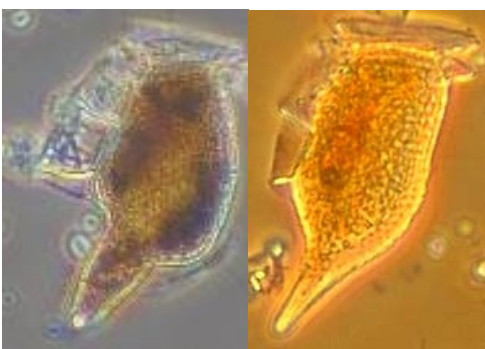



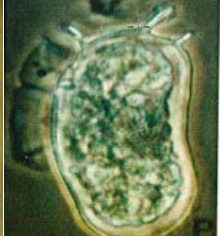






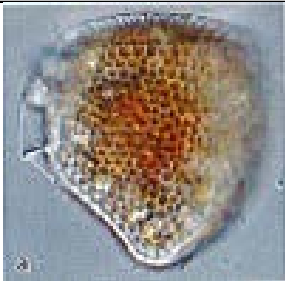
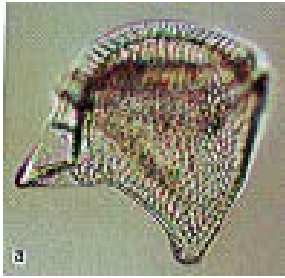
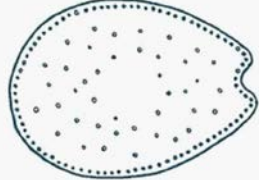
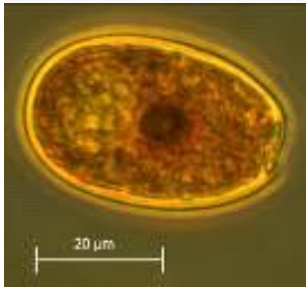
# ANNEXE VIII. LES MICROALGUES "CIBLES" EN FRANCE (TOXIQUES – NUISIBLES) E. NEZAN 2017


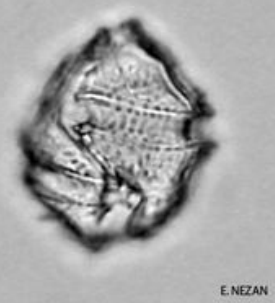
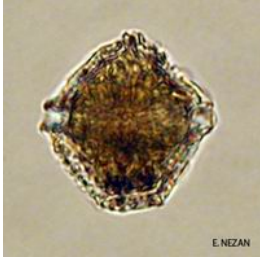
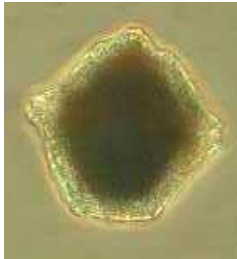

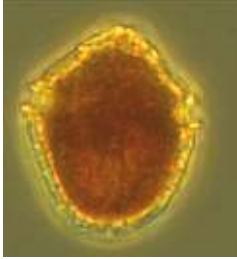
A.S.P Acide domoïque		
 <p>photos N. N. Masson</p> <p>photos E. Nézan</p>	<i>australis</i>	+
	<i>fraudulenta</i>	+/-
	<i>multiseries</i>	+
	<i>pungens</i>	+/-
 <p>photos N. N. Masson</p>	<i>calliantha</i>	+
	<i>delicatissima</i>	+/-
	<i>plurisecta</i>	+
	<i>pseudodelicatissima</i>	+
 <p>anonyme</p>	<i>Pseudo-nitzschia sigmoïdes multistriata</i>	+/-



D.S.P Azaspiracide (AZA)		
		
Author Urbann Tillmann <b><i>Azadinium poporum</i></b>	Photos : N. N. Masson – A. Lejolviet <b><i>Azadinium spinosum</i></b>	

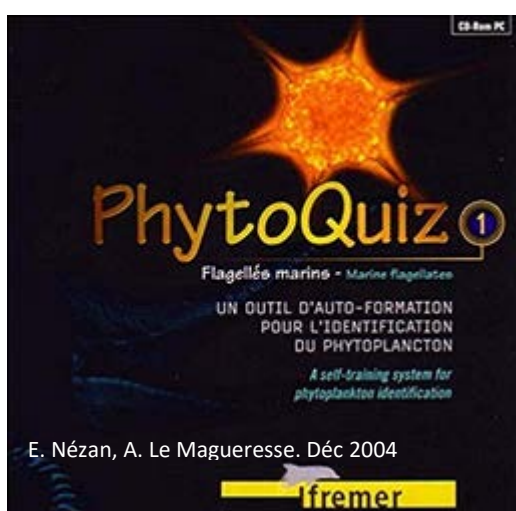
<b>Dinophysis</b>		<b>DSP</b> Acide okadaïque (AO), Dinophysis toxine (DTX), Pectenotoxine (PTX)
		
<b><i>D. acuminata</i></b> (photos N. N. Masson)		<b><i>D. acuta</i></b> (photo N. N. Masson)
		
<b><i>D. fortii</i></b> (photo N. N. Masson)	<b><i>D. caudata</i></b> (photos N. N. Masson)	<b><i>D. tripos</i></b> (Photo E. Nézan)
		
		
<b><i>D. sacculus</i></b> (Photos E. Nézan)		

<b>DSP</b> Acide okadaïque (AO) Dinophysis toxine (DTX)		
 <p><b><i>Phalacroma rotundatum</i></b> (photos N. N. Masson)</p>	 <p><b><i>Phalacroma mitra</i></b> (photo M. Iwataki)</p>  <p><b><i>Phalacroma rapa</i></b> (photo V. Borja)</p>	  <p><b><i>Prorocentrum lima</i></b> (photo N. N. Masson)</p>

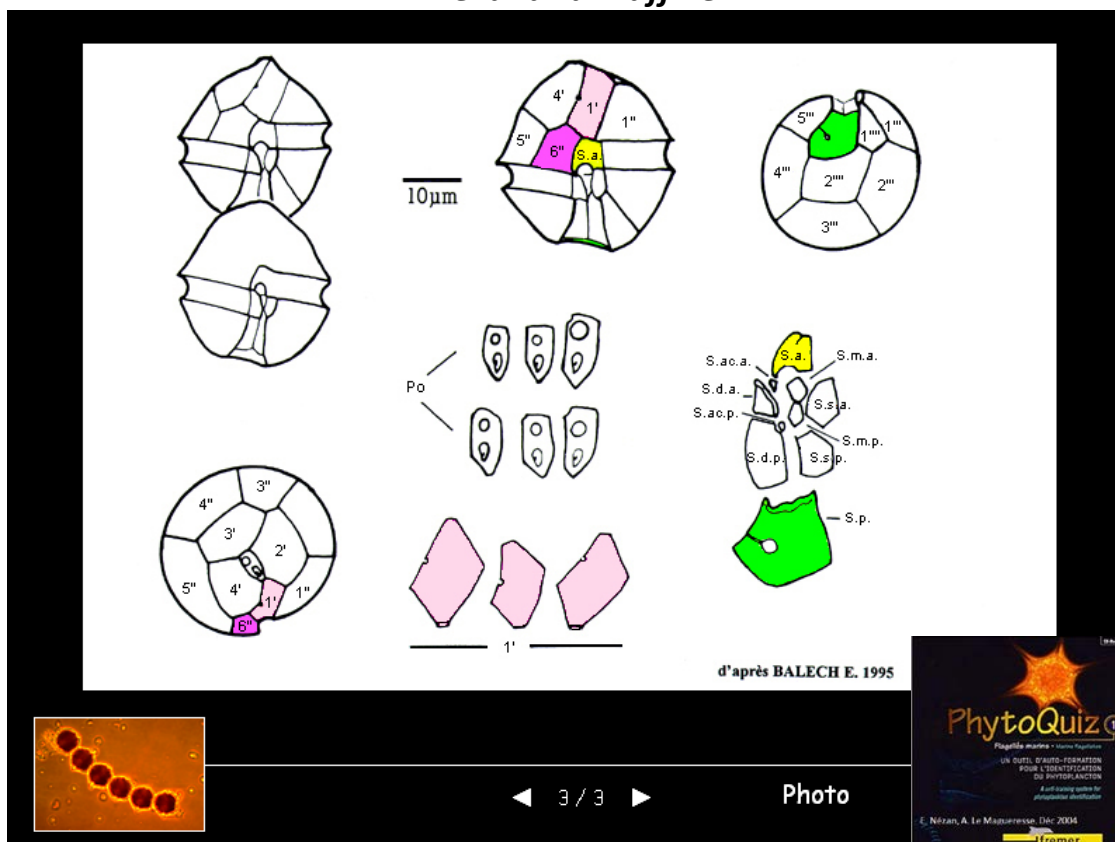
<b>DSP</b> Yessotoxines (YTX)			
 <p>Photos E. Nézan photos</p>		 <p>Photos N. N. Masson</p>	
<b><i>Gonyaulax spinifera</i></b>			
 <p>Photos E. Nézan photos</p>		 <p>Photos N. N. Masson</p>	
<b><i>Lingulodinium polyedra</i></b>		 <p>Photos E. Nézan photos</p>	
		 <p>Photos N. N. Masson</p>	
		<b><i>Protoceratium reticulatum</i></b>	

TAXONS		PSP
Alexandrium	affine	Saxitoxine (STX)
	andersonii	STX
	leei	STX + Ichtyotoxine ?
	minutum	STX + Gonyautoxine (GTX)
	catenella/tamarense	STX + GTX
	ostenfeldii	STX + GTX + Spirolide (SPX)
	pseudogonyaulax	Goniodomine Ichtyotoxique

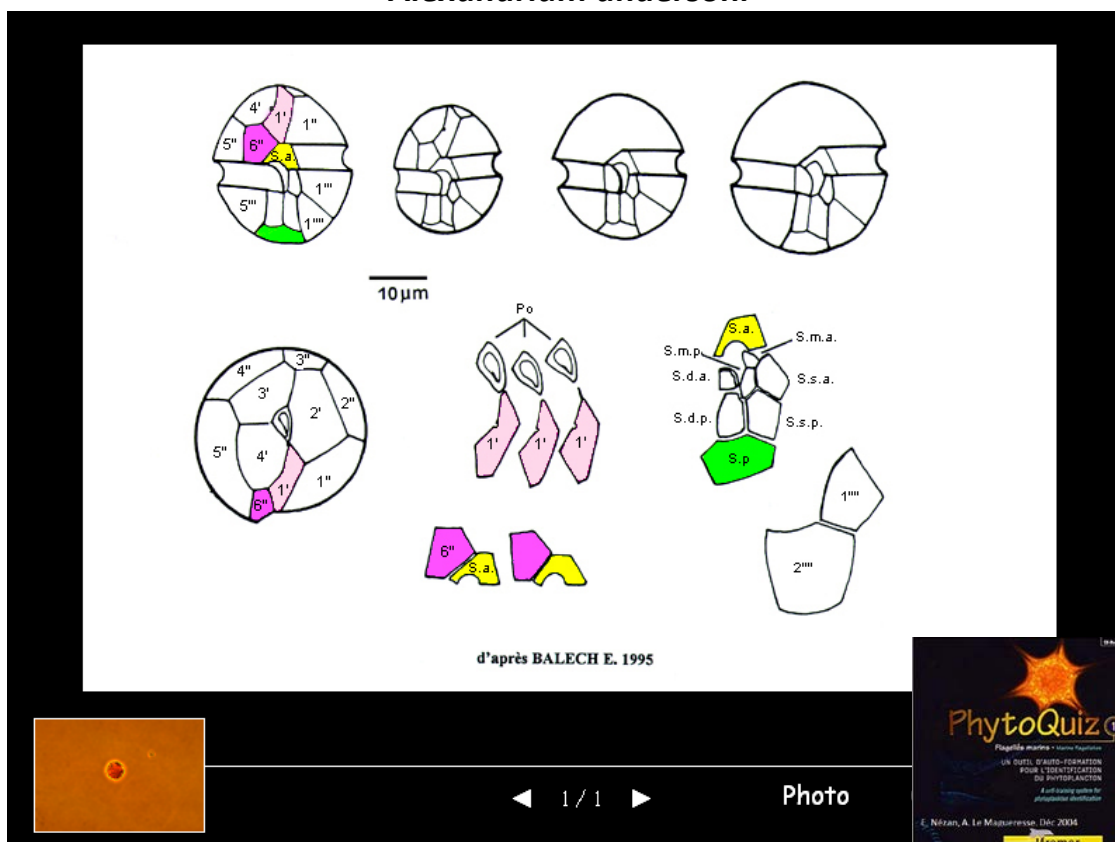
Planches à suivre extraites de : *PhytoQuiz 1. Flagellés marins. Un outil d'auto-formation pour l'identification du phytoplancton* E. Nézan, A. Le Magueresse décembre 2004.



## Alexandrium affine

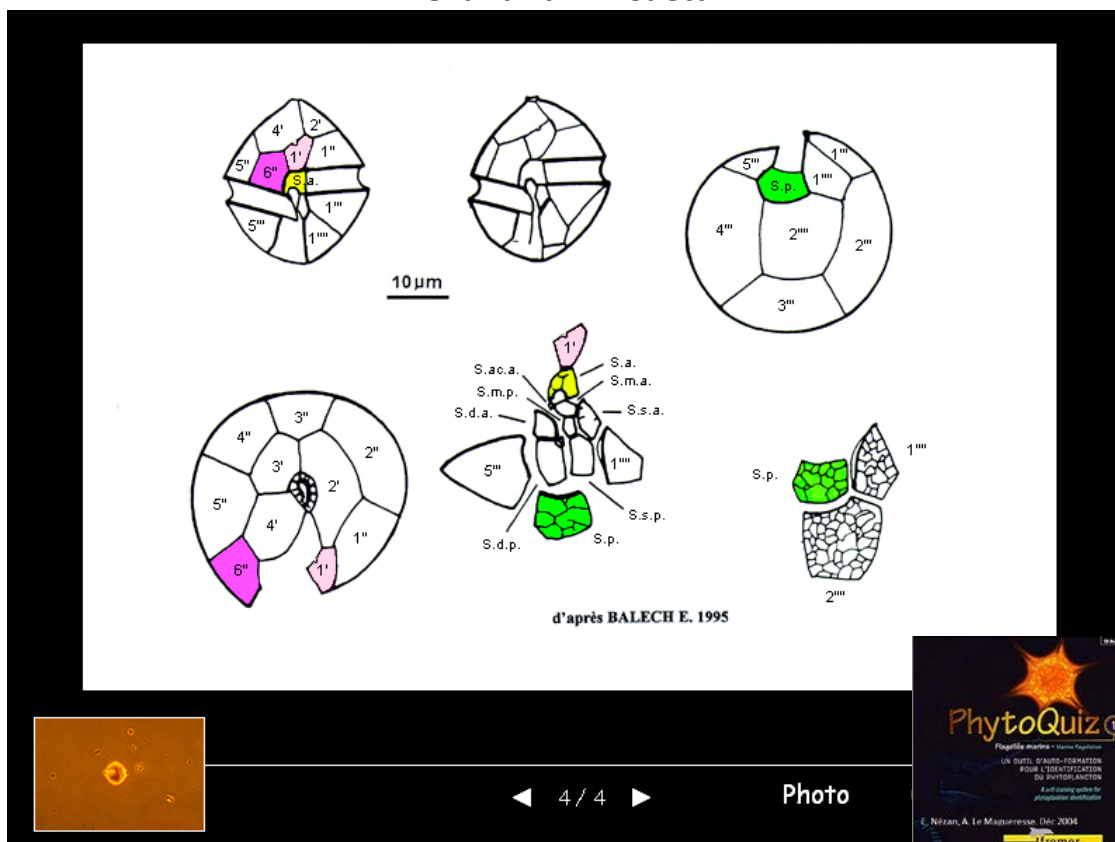


## Alexandrium andersoni

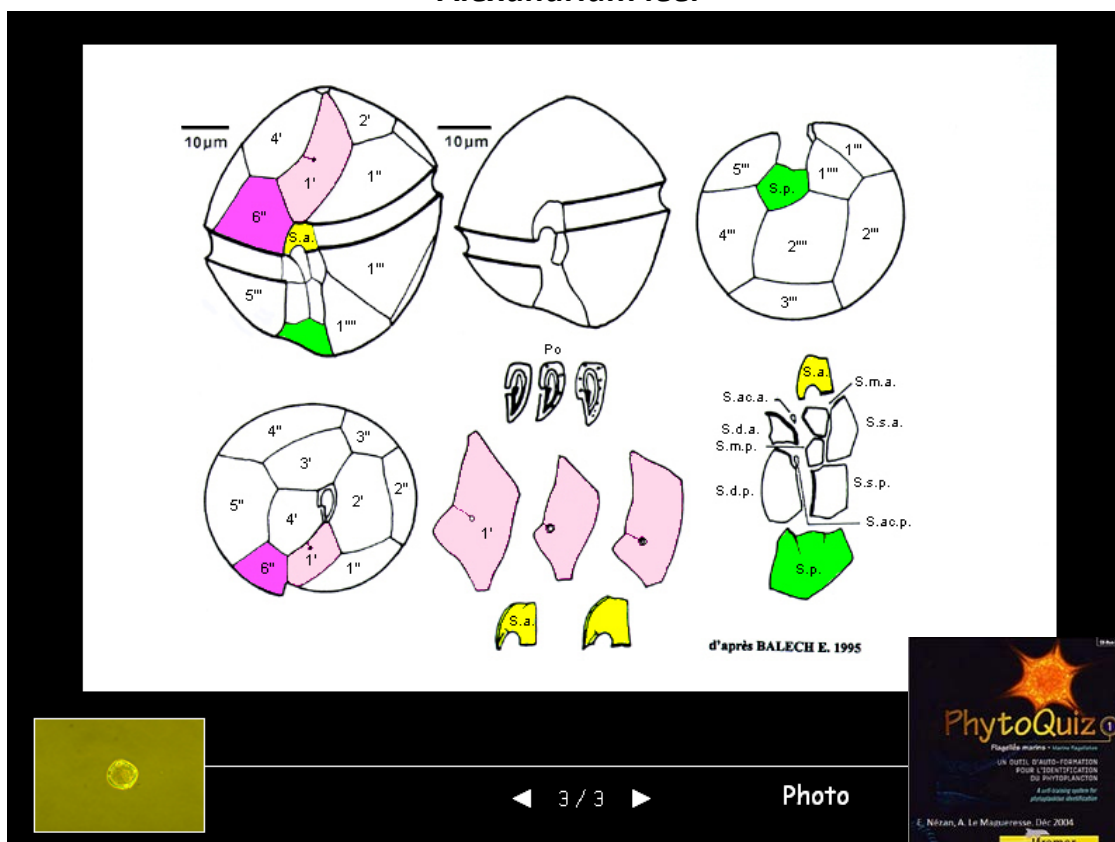




## Alexandrium insuetum

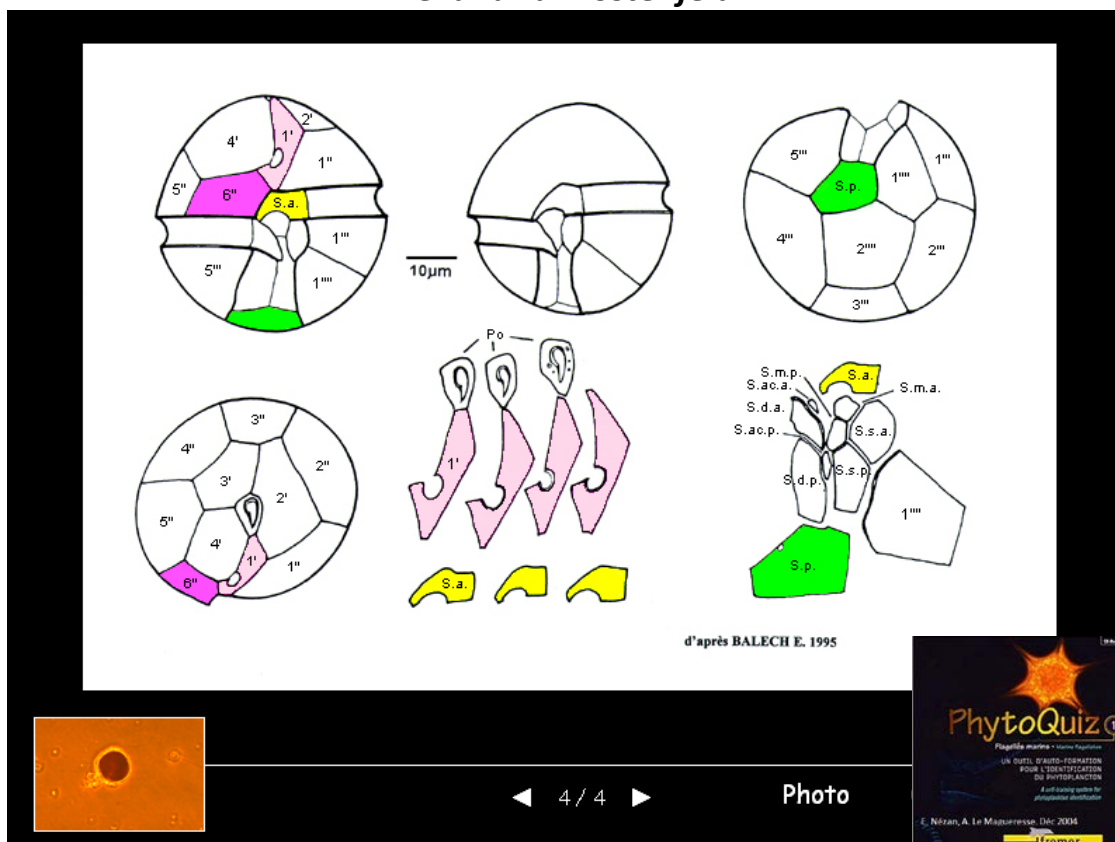


## Alexandrium leei

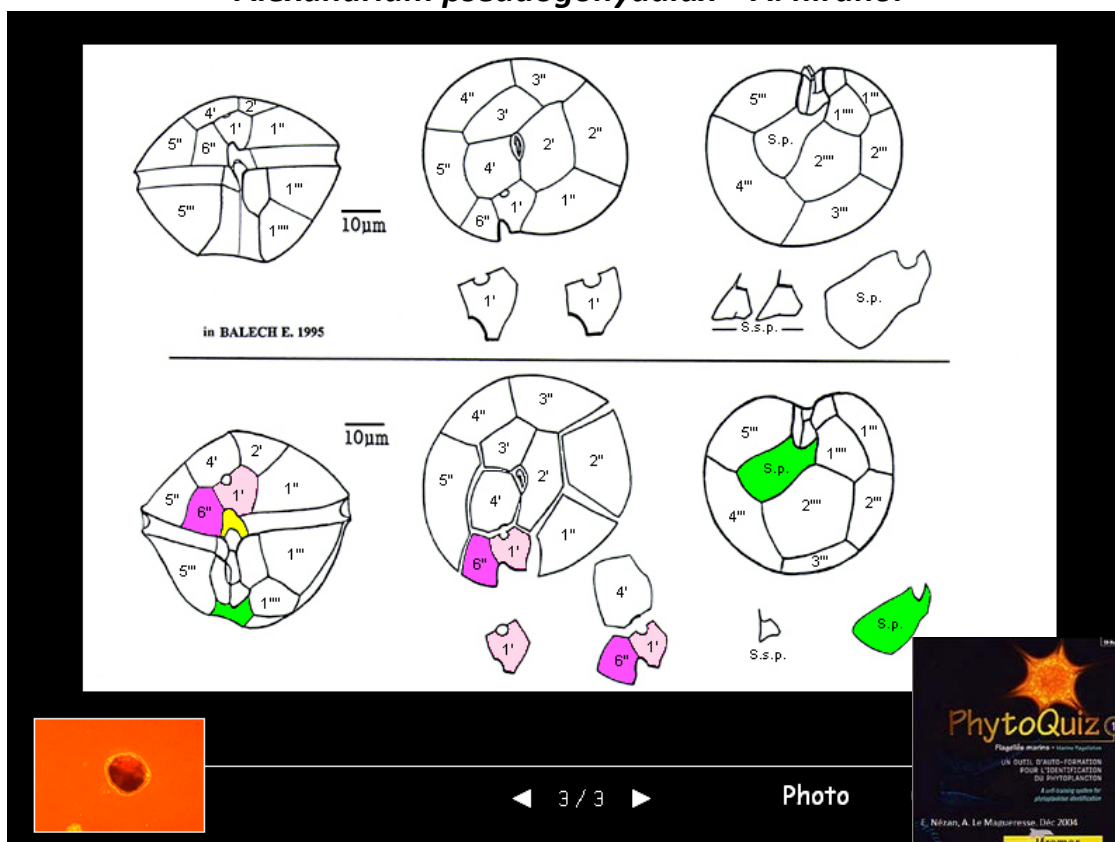




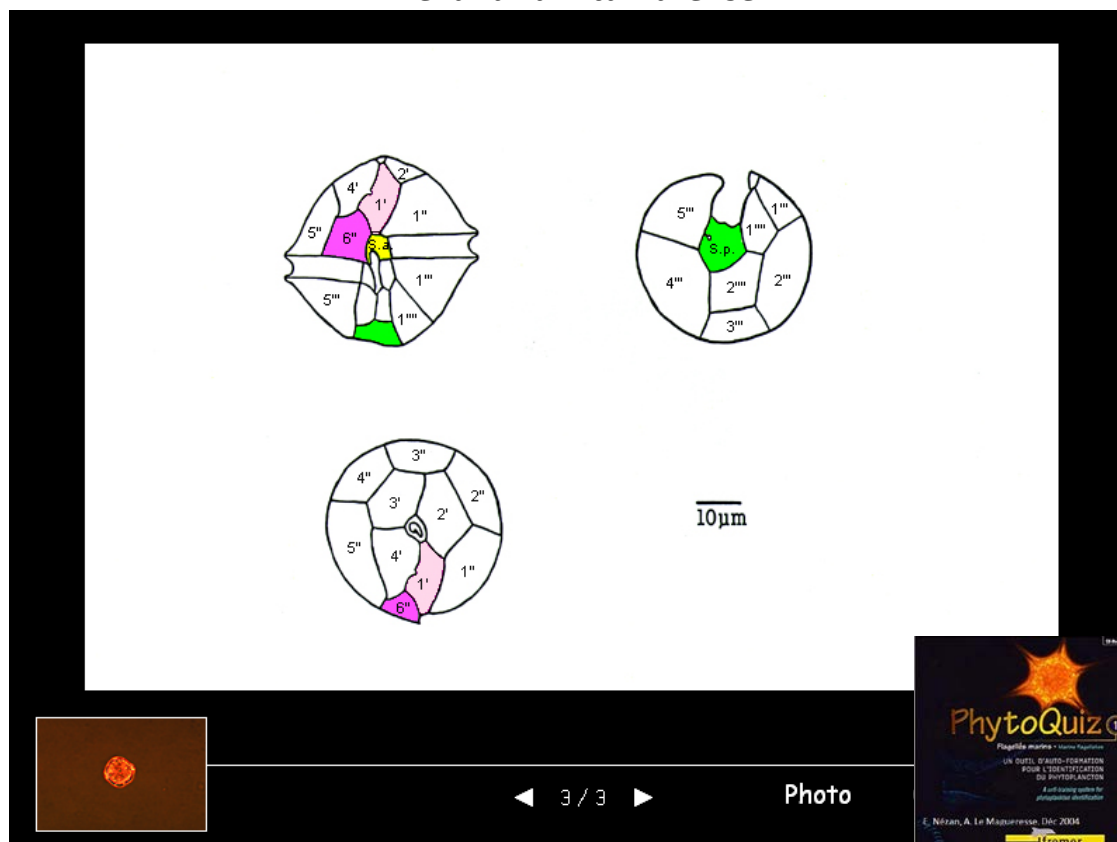
## Alexandrium ostenfeldii



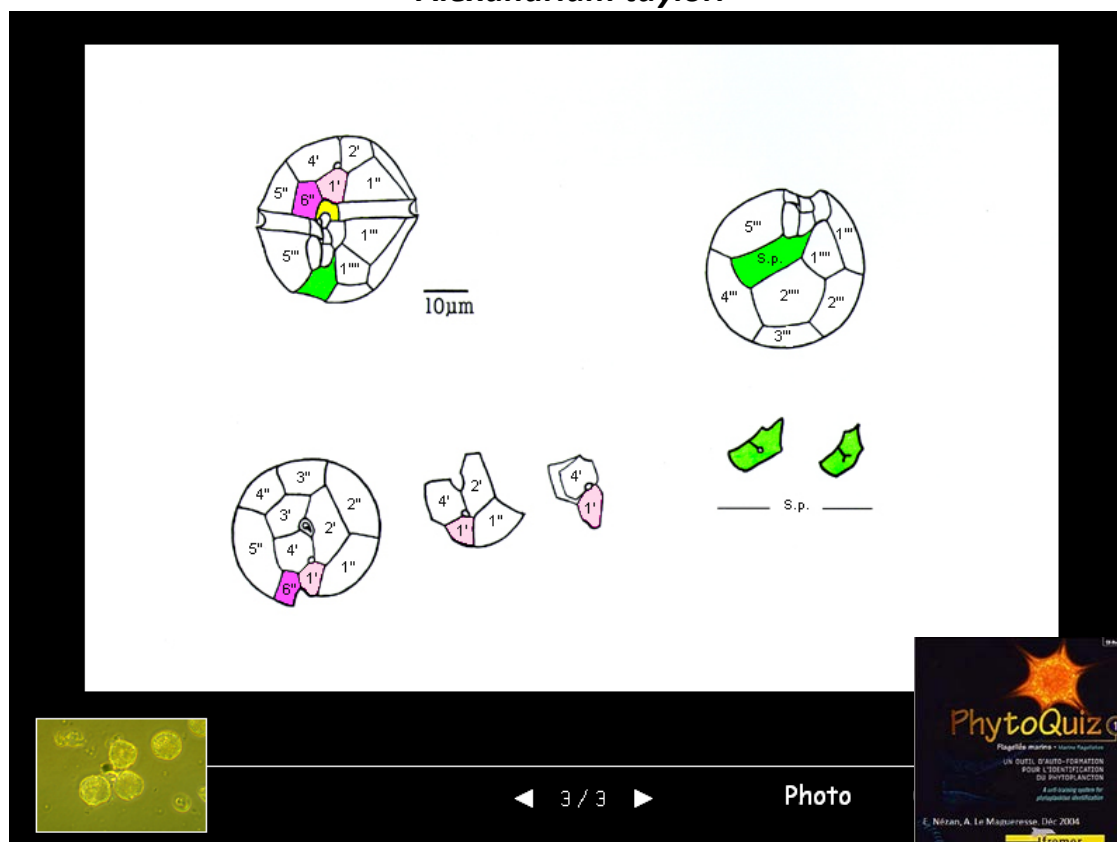
## Alexandrium pseudogonyaulax + A. hiranoi




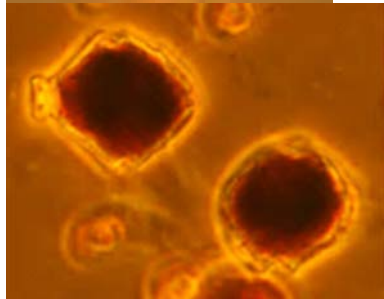
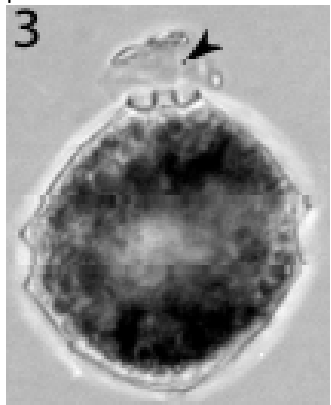
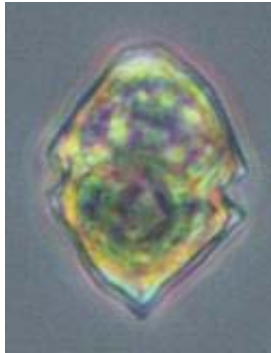


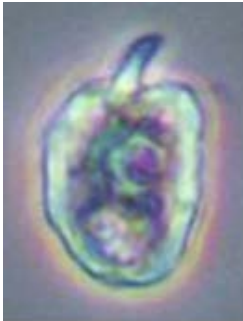
## Alexandrium tamarense



## Alexandrium taylori

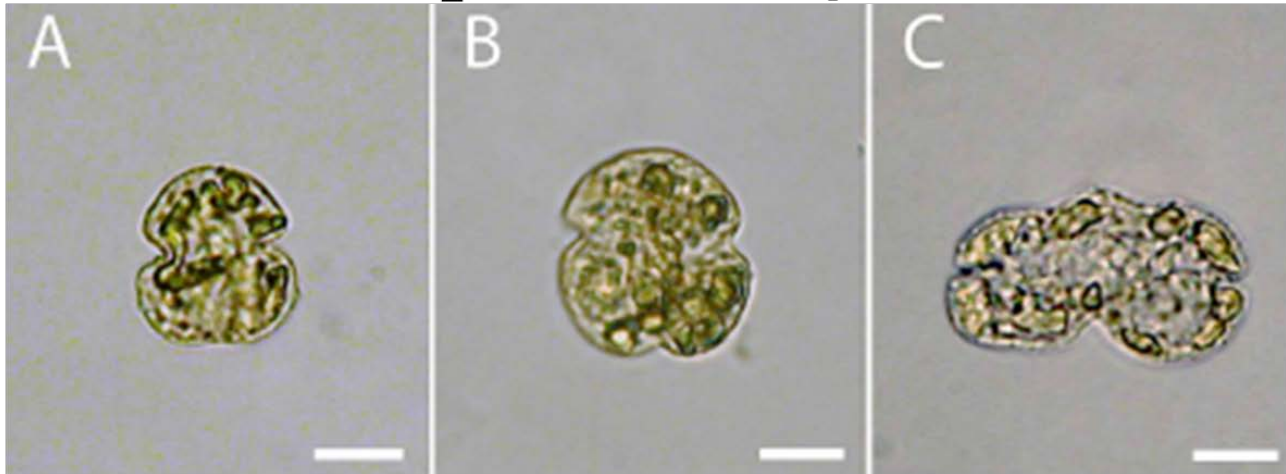




<i>Vulcanodinium rugosum</i> Pinnatoxine (PnTX)	<i>Heterocapsa triquetra</i> B-méthyl-amino alanine (BMAA)	<i>Amphidinium carterae</i> Hémolysines
  photos N. N. Masson  Photo E. Nézan, N. Chomérat	 photos A. Lejolviet  photo A. Piraud	 Photo N. N. Masson  photo A. Lejolviet

Espèces Ichtyotoxiques	
Cf. Fiches CHRU, FRIBJAP et HETGCAR du classeur : Guide pratique à l'usage des analystes du phytoplancton E. Nezan, G. Piclet et H. Grossel (1997)	<i>Chrysochromulina sensu lato species</i>
	<i>Chrysocampanula spinifera</i>
	<i>Haptolina hirta</i>
	<i>Haptolina ericina</i>
	<i>Fibrocapsa japonica</i>
	<i>Heterosigma akashiwo</i>

In Nézan et al. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2014.10.006>  
1568-9883/ \_ 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.



*K. brevisulcata*

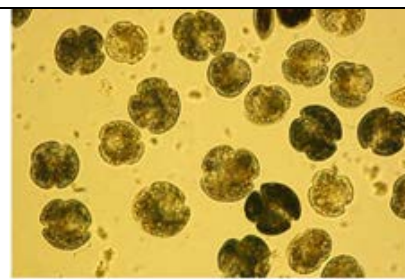
Ichtyotoxines  
+ irritations respiratoires  
par inhalation d'embruns

*K. mikimotoi*

Ichtyotoxines  
+ Brevetoxine

*K. papilionacea*

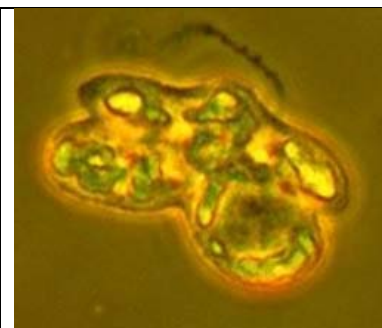
Brevetoxine



Differences between K. mikimotoi and K. brevisulcata  
Brevet & Ichtyotoxines - Quantification des toxines - Ichtyotoxines (10) - 15 mai 2014  
Photographie : E. Nézan

***K. mikimotoi***

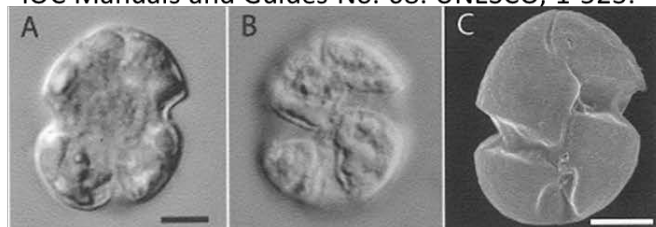
Photos E. Nézan



***K. papilionacea***

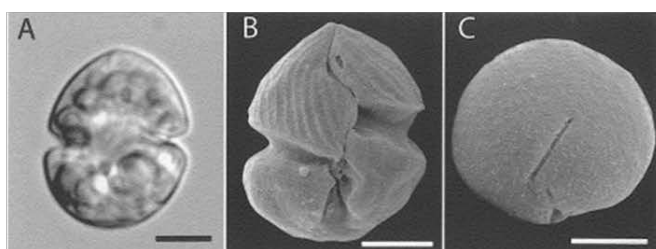
## Autres espèces ichtyotoxiques

In Lassus, P; Chomérat, N ; Hess, P ; Nézan, E. 2016. Toxic and harmful microalgae of the world ocean. IOC Manuals and Guides No. 68. UNESCO, 1-523.



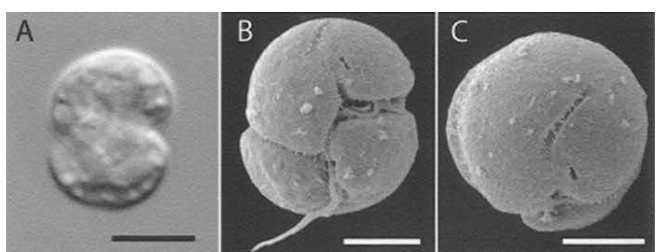
*Karlodinium corsicum*

A-B. Microphotographies photoniques de cellules fixées au Lugol. A. Cellule avec un focus sur la position centrale du noyau. B. Focus sur la gouttière apicale. C. Microphotographie en MEB montrant le pore ventral. Barres d'échelle: 5 µm.



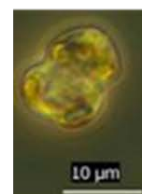
*Karlodinium gentienii*

A. Microphotographies photoniques d'une cellule non fixée. B-C. Microphotographies en MEB. B. Cellule en vue ventrale montrant le pore ventral et les sillons parallèles sur l'épicone. C. Cellule en vue apicale montrant la gouttière apicale. Barres d'échelle: 5 µm.

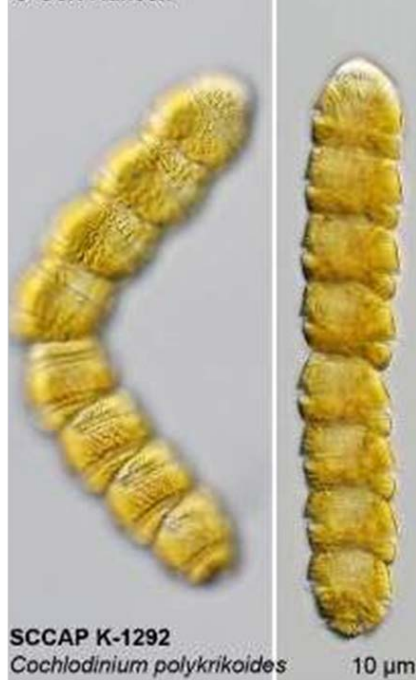


*Karlodinium veneficum*

A. Microphotographie photonique d'une cellule non fixée. B-C. Microphotographies en MEB. B. Cellule en vue ventrale montrant le pore ventral. C. Cellule en vue apicale montrant la gouttière apicale. Barres d'échelle: 5 µm.

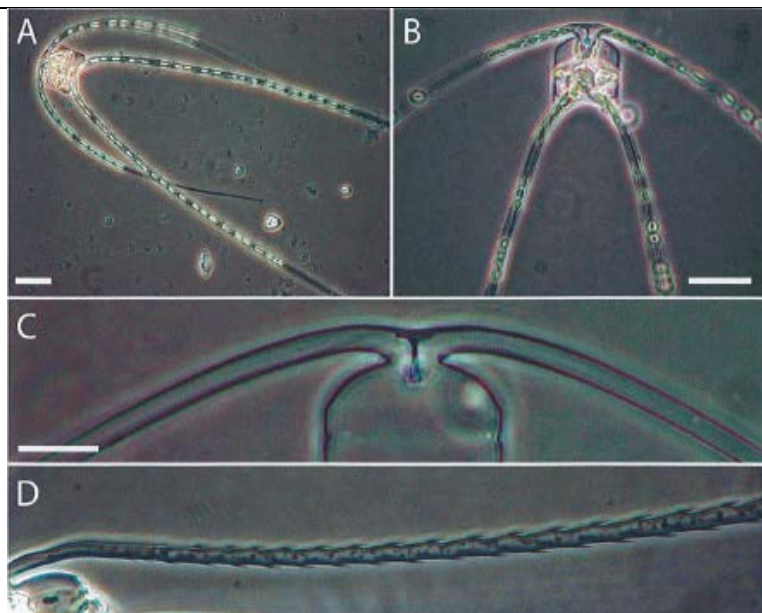


© Gert Hansen



SCCAP K-1292  
*Cochlodinium polykrikoides*

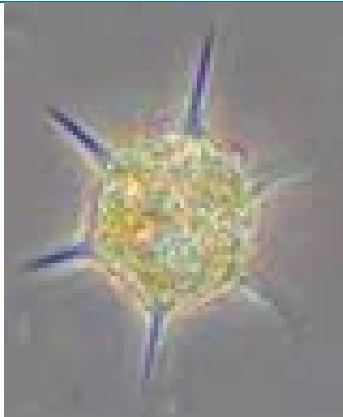
*Margalefidinium polykrikoides*



***Chaetoceros peruvianus*** ichtyo-nuisible par irritation /colmatage des branchies chez les poissons

In Lassus, P; Chomérat, N ; Hess, P ; Nézan, E. 2016. Toxic and harmful microalgae of the world ocean. IOC Manuals and Guides No. 68. UNESCO, 1-523. Voir aussi *C. concavicornis*, *C. convolutus*, *C. debilis* et *C. wighamii*

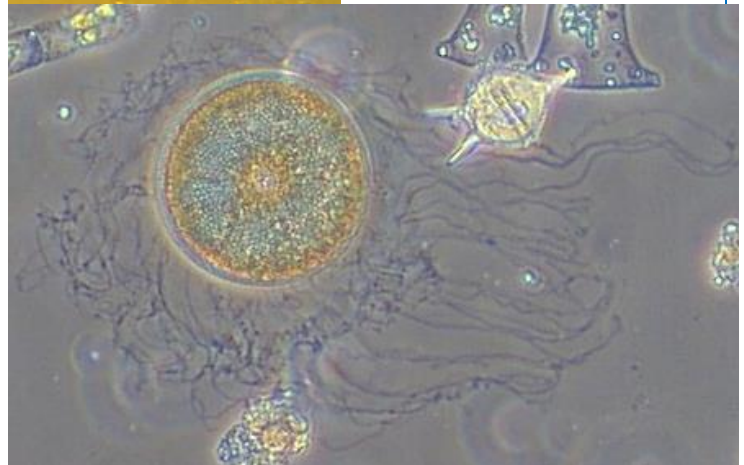
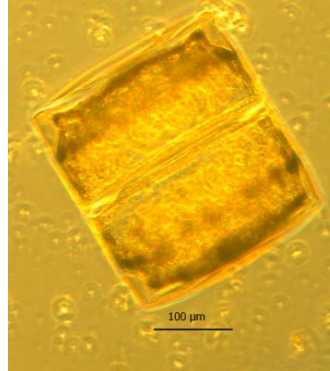




***Dictyocha speculum***

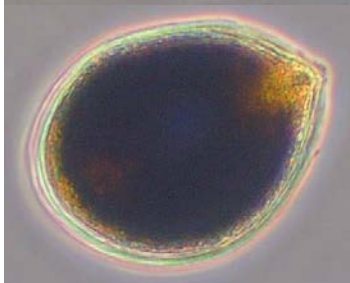
(photo N. N. Masson)

ichtyo-nuisible par irritation /colmatage des branchies des poissons



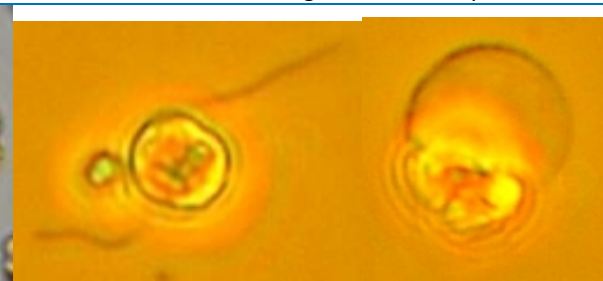
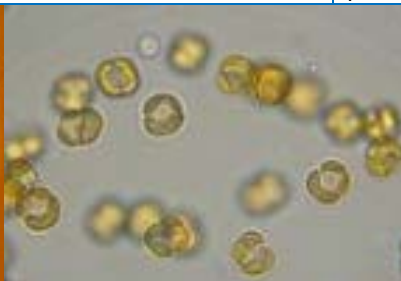
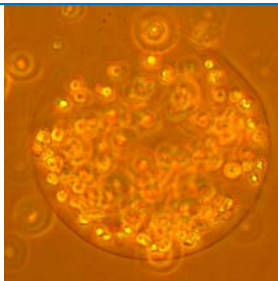
***Coscinodiscus wailesii*** (photo N. N. Masson)

En cas de prolifération dense avec production de mucus, nuisible pour le benthos, anoxie, colmatage des filets de pêche



***Ostreopsis* spp.** (photo N. N. Masson)

irritations respiratoires par inhalation d'embruns, dermatite du nageur  
Palytoxines-like, Ovatoxine (PLTX, OvTx)



***Phaeocystis globosa/pouchetii*** (photo N. N. Masson)

colmatage (filets, canalisations), irritation de la peau, ichtyo-nuisible par anoxie

**Pour en savoir plus:** Lassus, P; Chomérat, N ; Hess, P ; Nézan, E. 2016. Toxic and harmful microalgae of the world ocean. IOC Manuals and Guides No. 68. UNESCO, 1-523.

<https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000247767>