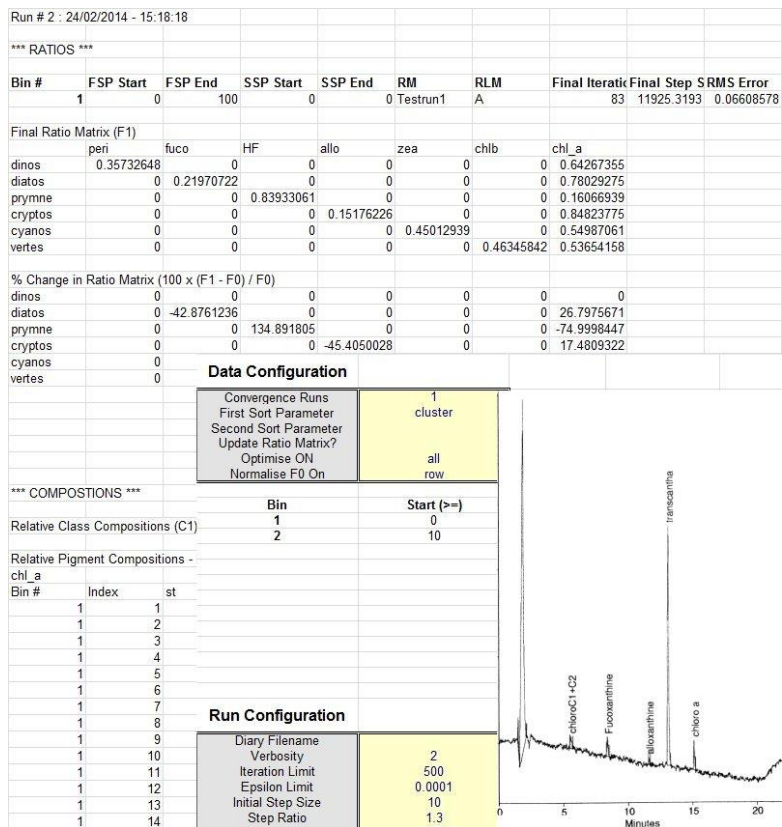


CHEMOTAXONOMIE PIGMENTAIRE

Initiation aux calculs appliqués au phytoplancton



Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : RST.DYNECO n° 2014-02 Diffusion : libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte: <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> Validé par : Adresse électronique : - chemin UNIX : - adresse WWW :	date de publication mars 2014 nombre de pages : 50 bibliographie : oui illustration(s) : oui langue du rapport : français	
Titre et sous-titre du rapport : Chémotaxonomie pigmentaire – Initiation aux calculs appliqués au phytoplancton		
Contrat n° _____ Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input type="checkbox"/> N° _____		
Auteur(s) principal(aux) : LAMPERT Luis Coordination - composition- édition:	Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER Département « DYNamiques de l'Environnement CÔtier"	
Collaborateur(s) : nom, prénom Coordination - secrétariat:	Organisme / Direction / Service, laboratoire	
Cadre de la recherche : Programme : _____ Convention : _____ Projet : DIAPSYE (A090208A) Autres (préciser) _____		
Résumé : Ce travail recueille l'ensemble de procédures pour une approche chémotaxonomique des analyses pigmentaires par HPLC. Il décrit plus particulièrement les méthodes « Diagnostic Pigments » (DP), les régressions linéaires multiples (RLM) et l'utilisation du logiciel [®] CHEMTAX 1.95 (CSIRO, Australie)		
Abstract :		
Mots-clés : CHEMTAX, Chémotaxonomie, HPLC, pigments phytoplanctoniques		
Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom : Lampert Luis Date : mars 2014 Visa	Nom : Anne Daniel Anne-Laure Levelly	

SOMMAIRE

1.- Introduction.....	1
2.- Etude de la matrice pigmentaire.....	3
3.- Exploration de données.....	4
4.- Diagnostic Pigments (DP).....	13
5.- Régressions Linéaires Multiples (RLM)	15
6.- © CHEMTAX 1.95	17
6.1.- Calcul de base de distribution de classes algales	17
6.1.1.- MISE EN PLACE DES DONNEES ET FICHIERS NECESSAIRES AU FONCTIONNEMENT .17	
6.1.2.- PROCEDURE DE LANCEMENT DE CHEMTAX .EXE	20
6.1.3.- ANALYSE DES RESULTATS.....	20
6.2.- Procédure d'optimisation des résultats	23
7.- Bibliographie cité.....	25
ANNEXES	27
I.- Cover letter de Simon Wright au sujet de la version CHEMATX 1.95	28
II.- Quelques notes et échanges par email sur les problèmes d'utilisation	29
III.- Document original de Simon Wright pour l'utilisation de CHEMTAX 1.95	35
IV.- Script « cours CHEMOTX2014.r »	37
V.- Script « hcoplot.R ».....	42
VI.- Bibliographie chémotaxonomique de base	43

INITIATION A LA CHEMOTAXONOMIE

1.- Introduction

Définition de chémotaxonomie phytoplanctonique : est la tentative de classer et identifier les organismes phytoplanctoniques, en fonction de ses différences et ses similitudes, par leur composition biochimique. Les composés étudiés dans la plupart des cas sont des pigments (chlorophylles, caroténoïdes et xanthophylles), mais on pourrait envisager également d'autres marqueurs biochimiques.

L'étude de la dynamique phytoplanctonique ainsi que sa diversité ont été fort longtemps étudiées par le biais de l'identification et des dénombrements réalisés au microscope optique. Cette procédure, qui permet d'approcher le niveau de l'espèce présente cependant quelques inconvénients : a) de résultats différents selon l'opérateur, b) une bonne résolution pour la fraction microphytoplanctonique, mais mauvaise, voire nulle pour les fractions nano et picophytoplanctonique, c) très consommatrice en temps personnel et d) une faible représentativité de la masse d'eau (échantillon de 1 à 50 mL).

L'amélioration des techniques de chromatographie par HPLC a permis d'augmenter considérablement le nombre de pigments extraits d'un échantillon d'eau de mer filtré (Zapata, Rodríguez, et Garrido 2000 ; Van Heukelem et Thomas 2001). Grâce aux analyses pigmentaires effectuées sur des souches de laboratoire et lors des blooms en mer, nous disposons aujourd'hui d'un nombre considérable de données permettant d'aborder la dynamique et la biodiversité fonctionnelle du phytoplancton par leurs pigments.

Le classement du phytoplancton est abordé par des **classes** plus ou moins homogènes d'un point de vue pigmentaire, mais qui restent proches des grands groupes phytoplanctoniques tels que diatomées, dinoflagellés, haptophytes, cryptophytes, prasinophycées, chlorophycées et bien d'autres dans les domaines marin et d'eau douce (Jeffrey et al. 1997; Roy 2011).

Les nombreuses publications scientifiques abordant depuis 30 ans l'approche chémotaxonomique fournissent une base de connaissance suffisante pour effectuer sereinement des études sur une zone sur laquelle il y a peu ou pas de données environnementales et de dénombrements phytoplanctoniques. La « bibliographie chémotaxonomique de base » regroupe les publications les plus marquantes à ce sujet (voir annexes). Cette bibliographie n'est pas exhaustive, mais permet d'aborder pleinement l'inférence chémotaxonomique.

Diverses méthodes ont été décrites depuis le développement de la chémotaxonomie phytoplanctonique (Higgins, Wright, et Schlüter 2011), mais seules trois d'entre elles seront décrites dans ce document :

- a) la méthode DP (Diagnostic Pigments),
- b) la méthode de Régressions Linéaires Multiples (RLM) et
- c) CHEMTAX.

Ces trois méthodes permettent d'obtenir la distribution des classes algales à partir d'une matrice pigmentaire obtenue par HPLC.

2.- Etude de la matrice pigmentaire

Avant de commencer les analyses chémotaxonomiques, il est essentiel de :

- corriger des erreurs d'analyse HPLC s'il y en a,
- faire la bibliographie sur les peuplements phytoplanctoniques de la zone étudiée,
- obtenir les dénombrements phytoplanctoniques observés au microscope et les données des paramètres environnementaux associés,
- analyser la structure de la matrice pigmentaire et faire des sous-groupes si nécessaire,
- déterminer quelles sont les classes algales que l'on retiendra pour les analyses chémotaxonomiques.

Les résultats pigmentaires peuvent être entachés d'erreurs dues à divers problèmes d'échantillonnage ou d'analyse : il est donc préférable de comparer les valeurs de chl_a obtenues par HPLC avec d'autres méthodes utilisées lors de la campagne (fluorimétrie, spectrométrie, etc.). Une autre méthode consiste à réaliser une régression de la somme de tous les pigments contre les valeurs en chl_a pour voir s'il n'y a pas une valeur ou deux qui échappent au nuage de points.

Si la zone échantillonnée a déjà fait l'objet d'analyses pigmentaires, l'historique permettra d'aborder les classes algales par les rapports pigmentaires publiés. Il n'est toujours pas possible de les réutiliser si la période d'échantillonnage ou si les conditions sont différentes, mais c'est une base solide pour commencer les analyses chémotaxonomiques. Toute information bibliographique sur les successions et la dynamique des peuplements phytoplanctoniques de la région étudiée nous permettra de mieux déterminer les classes algales présentes et le profil pigmentaire à retenir.

Dans la même philosophie, toutes les données environnementales enregistrées lors de la campagne permettront de mieux cerner le cadre dans lequel les peuplements phytoplanctoniques ont évolué. Mais le plus intéressant est de disposer d'échantillons pour l'identification microscopique des espèces. Ce point est la clef d'une bonne inférence chémotaxonomique. Une rapide vision des espèces présentes dans les échantillons nous guidera sur le choix des classes et profils pigmentaires à retenir.

Si la zone d'échantillonnage ou les conditions du milieu sont hétérogènes, il est possible de sectoriser les échantillons. Le plus courant est de le faire selon la profondeur, car les espèces présentes en surface ne sont pas toujours les mêmes qu'au fond et bien souvent leur profil pigmentaire n'est pas le même. Ceci est également vrai pour les échantillons très côtiers et ceux du large. La matrice pigmentaire elle-même pourra aussi être sectorisée par l'analyse en groupements hiérarchiques (clusters) pour avoir des pools homogènes. Ceci est particulièrement souhaitable pour l'utilisation de Chemtax.

Aucun logiciel ni table ne permet de choisir les classes algales à retenir pour une étude chémotaxonomique en fonction des pigments présents (pigments biomarqueurs). C'est à l'opérateur

de décider en fonction des réponses obtenues sur les points précédents. Si l'on se trompe dans le choix des classes à retenir ou dans les rapports pigmentaires qui leur correspondent, les résultats ne seront pas représentatifs des assemblages phytoplanctoniques. Il ne faut donc pas négliger cette phase de l'analyse de la matrice pigmentaire qui est la clef de la réussite de l'analyse chémotaxonomique.

3.- Exploration de données

L'exploration des données, ainsi que leur sectorisation en clusters ou les régressions multiples peuvent se faire aisément avec un script en langage « R ». Nous décrivons ci-dessous les différentes procédures pas à pas. Nous conseillons l'utilisation de logiciel libre de droits « R » (cran.r-project.org/) et l'éditeur de texte « Tinn-R » (sourceforge.net/projects/tinn-r/). Si vous utilisez un ordinateur sous Linux, Tinn-R devra être remplacé par « R-Studio » (www.rstudio.com) qui est équivalent. L'ensemble du code du script « **cours CHEMOTX2014.r** » est transcrit dans les annexes. Il suffit de faire un copier-coller de celui-ci sur une page Tinn-R pour qu'il soit opérationnel.

Nous utiliserons une matrice de données extraite des analyses HPLC échantillonnées sur le plateau continental atlantique et enregistré au format « texte » (pcaf2000.txt). Les concentrations des pigments sont en ng/l (figure 1).

st	lat	lon	zfond	z	c3	c1c2	peri	BF	fuco	HF	prasi	diadino	allo	zea	chl_b	bcarot	bpcarot	chlallo	chl_a
1	-2.75	45.92	113	5	90	82	0	0	80	60	0	23	27	0	104	0	0	0	469
2	-2.38	46.12	58	4	0	34	0	0	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	194
3	-2.1	46.38	41	5	0	43	0	0	19	0	0	0	22	0	34	0	0	0	305
4	-2.44	46.62	56	4.5	0	51	0	0	47	0	0	0	25	0	63	0	0	0	325
5	-2.76	46.37	92	4	92	242	42	0	144	51	21	19	63	30	124	17	24	73	1134
6	-3.08	46.13	125	8	101	125	0	0	66	54	0	19	32	0	100	0	0	0	625
7	-3.67	46.17	145	7	34	64	0	0	42	38	18	14	12	0	88	0	0	0	298
8	-3.43	46.35	123	4	23	58	0	0	68	29	0	0	0	22	76	0	0	0	238
9	-3.12	46.6	110	4	48	114	36	0	57	21	0	13	33	21	47	0	0	71	549
10	-2.8	46.83	67	5	71	139	22	0	76	10	8	12	17	0	70	40	38	0	682
11	-2.55	46.98	35	3	0	171	0	0	116	0	0	45	58	0	155	0	0	0	820
12	-2.79	47.28	46	4	24	106	28	0	61	0	18	18	20	14	63	0	0	26	494
13	-3.12	47.03	74	8	78	183	33	0	213	45	0	28	16	0	42	11	0	41	668
14	-3.42	46.79	115	3	86	209	43	0	137	69	15	28	32	0	85	0	0	0	733
15	-3.74	46.55	135	5	63	41	0	0	39	0	0	0	0	0	57	0	0	0	284
16	-4.08	46.78	135	4	32	45	0	0	54	20	0	0	0	0	75	0	0	0	323
17	-3.76	47.02	118	5	97	211	44	0	180	41	18	29	32	0	62	14	21	0	907
18	-3.45	47.25	86	5	106	275	30	0	343	41	0	40	26	0	36	16	0	85	1194
19	-3.24	47.46	33	5	0	83	0	0	60	0	0	7	20	0	46	0	0	0	466
20	-3.6	47.62	63	3	116	216	30	0	142	69	29	38	23	0	105	10	0	54	777
26	-2	43.83	147	5	45	128	0	0	53	42	41	22	41	35	186	23	47	0	670
27	-1.44	43.83	30	3.5	26	145	0	0	41	31	21	11	46	25	123	0	0	0	624
28	-1.42	44.17	38	2.5	56	97	47	0	53	40	29	20	18	27	159	19	0	0	553
29	-2.01	44.11	154	3	52	79	0	0	53	44	25	0	25	0	163	25	0	0	408
30	-2	44.42	145	3.5	98	88	0	24	68	77	25	17	24	24	159	24	0	0	481
31	-1.37	44.42	40	6	63	155	32	0	88	48	35	19	35	22	182	19	28	0	760
32	-1.37	44.75	32	4	0	62	19	0	15	0	0	0	33	12	36	9	0	0	404
33	-2.01	44.75	143	6	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	59
34	-1.37	45	37	5	57	159	0	0	48	0	0	0	88	0	94	37	0	105	783
35	-2.11	45	120	7	56	56	0	0	35	28	25	0	12	0	109	22	0	0	304
36	-1.79	45.25	75	5.5	60	112	0	0	48	43	31	10	21	0	107	0	0	0	564
37	-1.39	45.55	30	3.5	27	64	0	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	342
38	-1.5	45.12	24	2.5	0	51	0	0	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	273
39	-1.78	45.67	62	4	65	73	0	0	51	37	0	15	0	0	71	0	0	0	341
40	-2.1	45.45	91	6	0	51	0	0	50	24	0	15	0	0	76	0	0	0	275
41	-2.42	45.22	125	5	63	66	0	0	42	45	19	15	0	0	85	0	0	0	312
42	-2.75	45.42	133	4	54	73	0	0	65	41	0	12	0	12	122	0	0	0	363
43	-2.41	45.64	113	5	74	81	0	15	90	58	18	18	15	7	89	0	0	0	474
44	-2.1	45.9	76	5.5	114	102	0	0	100	50	0	18	19	0	126	0	0	0	526
45	-1.75	46.17	35	4	47	98	0	0	89	0	0	13	13	14	111	0	0	41	540
46	-3.04	45.65	132	8	52	61	0	0	66	26	26	29	19	16	85	30	22	0	375
47	-3.33	45.9	142	5	25	39	0	0	34	12	0	0	0	0	40	0	0	0	243

Figure 1 : Matrice de données pigmentaires [S]

Les cartographies sont réalisées avec un fichier en mode « texte » (carteAtlantique.txt) où sont portés les points du trait de côte de la façade atlantique ; ils sont suffisamment serrés pour présenter des cartes au petit format très lisibles.

```
#####
#
#           COURS INITIATION A LA CHEMOTAXONOMIE
#
#####

# Creation : Luis Lampert
# Data : 19/02/2014
# Dernière modification :

# Ci dessous une serie de commandes en relation avec le cours d'initiation a la chemotaxonomie

#####
# 1.- INITIALISATIONS
#####

      fich1="pcaf2000.txt"      # fichier avec pigments et positions stations
      fich2="carteAtlantique.txt" # fichier avec fond de carte

# Librairies a charger et sources
library(gclus)
source("hcoplot.R")
```

Dans cette première partie du script, nous définissons les fichiers de données et de la carte, puis chargeons la librairie « gclus » nécessaire pour réaliser les clusters. Le script « hcoplot.R » est chargé également en mémoire vive (Borcard, Guillet, et Legendre 2011).

```
#####
# 2.- IMPORTATION DE DONNEES
#####

data0= read.table(fich1, header=T)
head(data0)
dim(data0)

# On prend la matrice de pigments complete
pig=data0[,4:18]
row.names(pig)=data0[,1]
head(pig)

# On prend la matrice de pigments reduite
spe=pig[,c(3,5,6,9,10,11,15)]
head(spe)

# On charge la matrice avec les positions geo des stations
spa=data0[,2:3]
head(spa)

# On charge le fond de carte de l'Atlantique
fra=read.table(fich2)
head(fra)
```

Nous importons toute la table de pigments dans l'objet data0. Nous créons l'objet « pig » avec les données pigmentaires uniquement, puis « spe » avec les pigments qui nous intéressent particulièrement. Ceux qui n'ont pas un message taxonomique particulier dans notre étude sont écartés. Dans « spa » sont chargés les positions en latitude et longitude des stations échantillonnées et finalement dans « fra » la carte de la France Atlantique.

```

#-----
# 3.- EXPLORATION DE DONNEES
#-----

#-----
# 3.1. Carte de position des stations
#-----
windows(title="Position stations")
# Carte des stations
plot(spa, asp=1, type="p", xlim=c(-5,-1), ylim=c(43,48), main="Stations PCAF2000", cex=0.6,
pch=16, xlab="Longitude", ylab="Latitude")
# Ajoute le nom des stations
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.7, col="red")
# Ajoute la carte de la facade Atlantique
lines(fra, col="blue")

```

L'exploration de données commence par la confection d'une carte avec le positionnement des stations échantillonnées (figure 2).

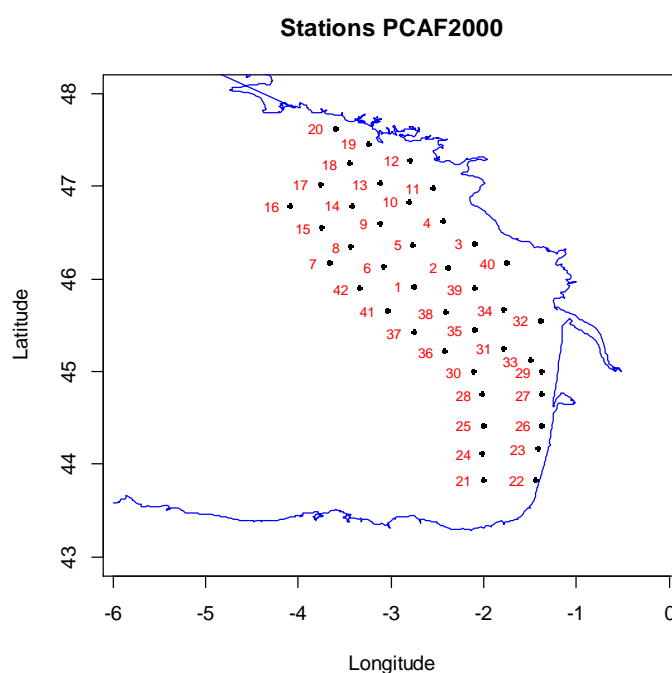


Figure 2 : Carte avec la position et le nom des stations échantillonnées

```

#-----
# 3.2. Compare sites : richesse pigmentaire
#-----
# Calcule le nombre de pigments par station
# Somme par ligne, le 2eme argument de apply(), MARGIN, doit = 1
sit.pres = apply(pig > 0, 1, sum)
# Tri incrementiel
sort(sit.pres)
windows(title="Richesse pigmentaire",10, 5)
par(mfrow=c(1,2)) # Divise la fenetre horizontalement
# Plot richesse pigmts vs. position des stations
plot(sit.pres,type="s", las=1, col="gray",
main="Richesse pigmentaire vs. \n N° station",
xlab="N° station", ylab="Richesse pigmentaire")
text(sit.pres, row.names(pig), cex=.8, col="red")
# Utilise les coordonnées geo pour faire un "bubble map"
plot(spa, asp=1.5, main="Carte de richesse pigmentaire", pch=21, col="white",
bg="grey", cex=5*sit.pres/max(sit.pres), xlab="Longitude",
ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")

```

Cette partie du script permet d'avoir des informations sur la richesse pigmentaire. Combien de pigments nous trouvons par station ? Y a-t-il des stations avec peu de pigments (bloom ?). Sont-ils sectorisés ? (figure 3). Il est à remarquer que dans cette procédure nous utilisons tous les pigments de l'analyse, donc l'objet « pig ».

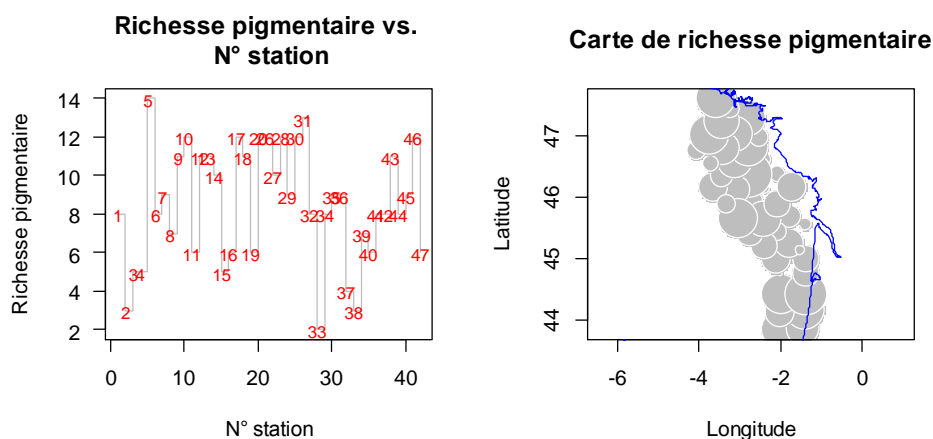


Figure 3 : Figure et carte avec la distribution de la richesse pigmentaire par station

```

#-----
# 3.3. Carte des pigments biomarqueurs
#-----
# initialisations
dataC1=spe[,1]
dataC2=spe[,2]
dataC3=spe[,3]
dataC4=spe[,4]
dataC5=spe[,5]
dataC6=spe[,6]
dataC7=spe[,7]
dataC8=spe[,8]
dataC9=spe[,9]

windows(title="Distribution pigments biomarqueur", 9, 9) # Nouvelle fenetre (taille 9x9
inches)
par(mfrow=c(3,3)) # Divise la fenetre en 3x3

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC1/range(dataC1)[2], main=colnames(spe)[[1]],
      xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=10*dataC2/range(dataC2)[2], main=colnames(spe)[[2]],
      xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC3/range(dataC3)[2], main=colnames(spe)[[3]],
      xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC4/range(dataC4)[2], main=colnames(spe)[[4]],
      xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC5/range(dataC5)[2], main=colnames(spe)[[5]],
      xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

```

```

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC6/range(dataC6)[2], main=colnames(spe)[[6]],
     xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC7/range(dataC7)[2], main=colnames(spe)[[7]],
     xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

#plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC8/range(dataC8)[2], main=colnames(spe)[[8]],
#     xlab="Longitude", ylab="Latitude")
#lines(fra, col="blue")
#text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

#plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC9/range(dataC9)[2], main=colnames(spe)[[9]],
#     xlab="Longitude", ylab="Latitude")
#lines(fra, col="blue")
#text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

```

Ici nous ferons une cartographie de la concentration (relative) de chaque pigment biomarqueur par station. Nous utilisons donc l'objet « spe ». La taille de cercles est proportionnelle à la concentration dans la même figure, mais elles ne sont pas comparables entre figures (figure 4).

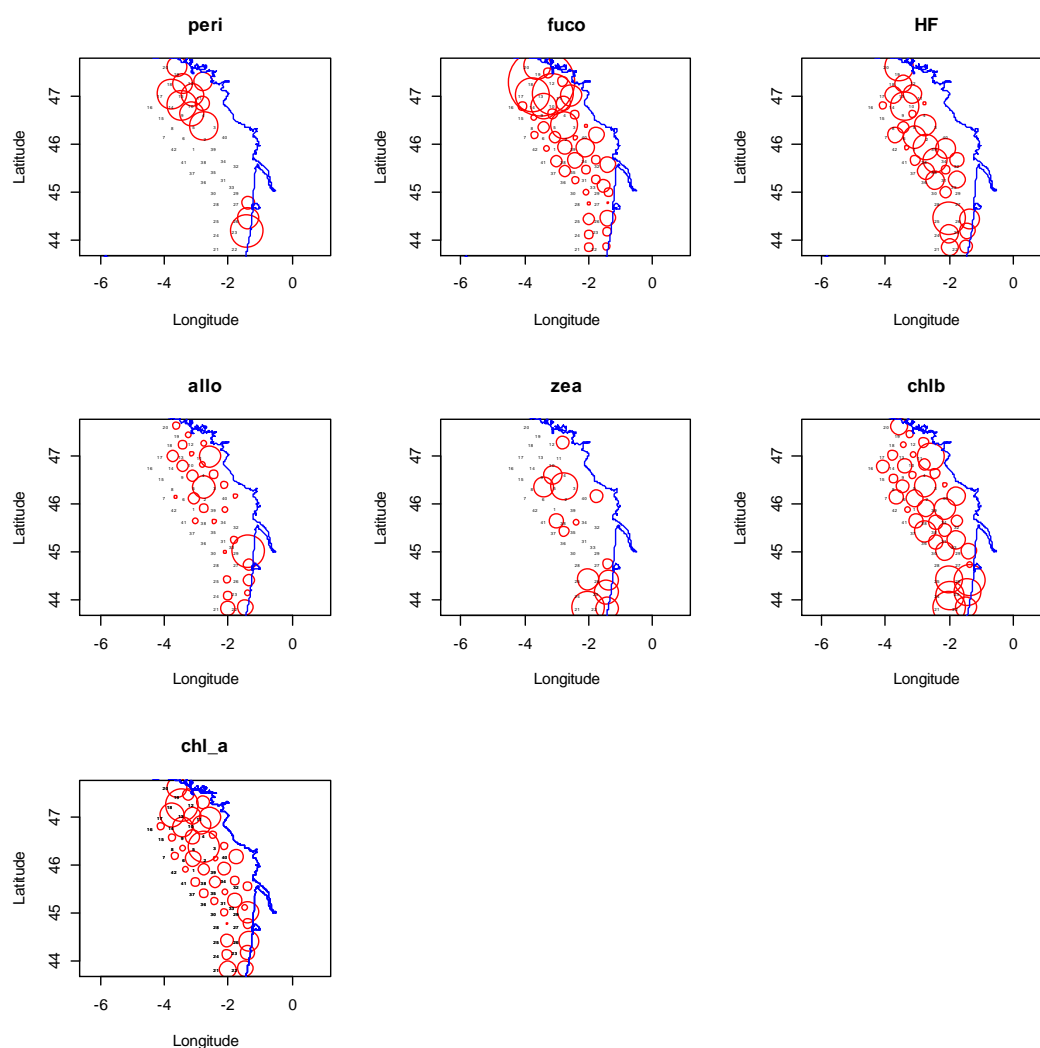


Figure 4 : Distribution des concentrations des pigments biomarqueurs par station. Pour chaque figure la taille de cercles est proportionnelle à leur concentration, mais pas entre les figures

```

#-----
# 3.4 Coef de corrélation (r) entre pigments
#-----

# OBJET : Permet de voir quels sont les pigments qui ont de bonnes corrélations entre eux
dans une matrice pigmentaire (pigments en colonne et stations en ligne). On utilise une
matrice de corrélation (r de pearson en "mode R").

# Matrice de corrélations
data1=round(cor(spe),2)
data1
# pour mieux visualiser la matrice de corrélations
data1.D=as.dist(data1)
data1.D

```

Une autre information utile est la mesure de la corrélation entre la chla et les autres pigments, ainsi qu'entre les principaux pigments eux-mêmes. Afin de mieux visualiser les corrélations, nous éditons la matrice triangulaire inférieure uniquement (figure 5).

	peri	fuco	HF	allo	zea	chlb
fuco	0.54					
HF	0.29	0.36				
allo	0.30	0.20	0.12			
zea	0.27	-0.08	0.21	0.30		
chlb	0.06	-0.02	0.55	0.43	0.51	
chl_a	0.63	0.74	0.38	0.71	0.23	0.37

Figure 5 : Matrice triangulaire avec les coefficients 'r' de Pearson

Nous pouvons déjà mettre en évidence que la chla est fortement corrélé avec la fucoxanthine, la péridinine et l'alloxanthine. Les deux premières classes étant celles du microphytoplancton. Puis la chlb avec la 19'-hexanoyloxyfucoxanthine et la zéaxanthine qui représentent les communautés de toute petite taille.

```

#-----
# 4.2. Discrimination des stations en fonction des pigments
#-----

# Clusters en utilisant une distance euclidienne D1
#-----
data2.D=dist(spe, method="eucl")
data2.cl=hclust(data2.D, method="complete")
plot(data2.cl, main="Cluster avec distance euclidienne D1")
hcoplot(data2.cl, data2.D, k=2)

```

Dans le point 5. du script nous réalisons une analyse par groupement hiérarchique (clusters) avec la distance euclidienne 'D1' (Legendre et Legendre 1998). Nous avons divisé les stations en deux groupes en fonction du pool pigmentaire de « spe » (Figure 6).

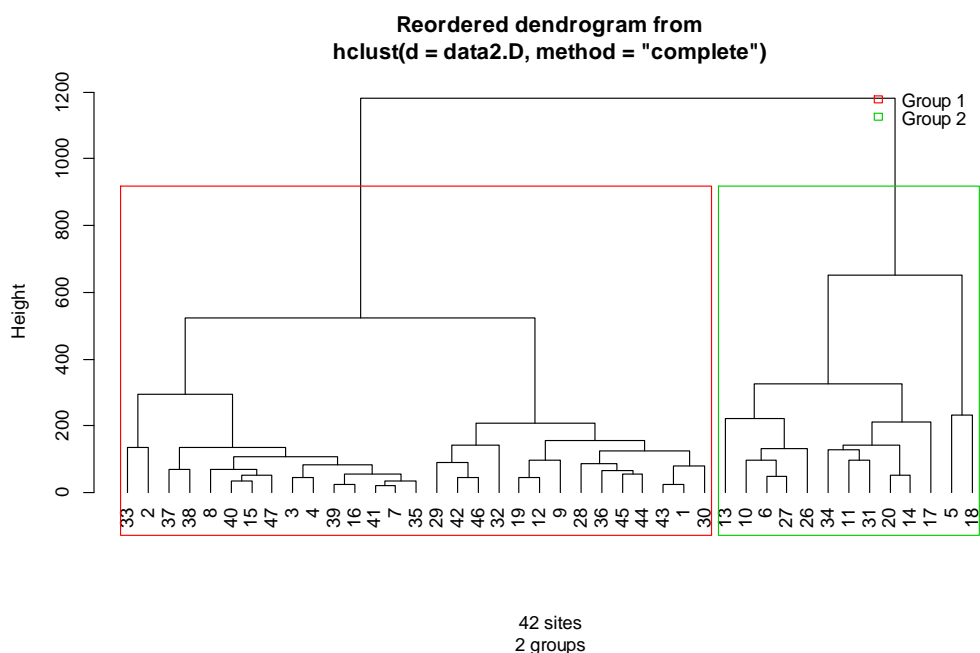


Figure 6 : Clusters des stations sur les données pigmentaires divisés en deux groupes

```

*****
# 5.- CLUSTER ANALYSIS
*****
# Groupements hierarchiques (en francais).
# Voir documents :
# => Numerical Ecology (Legendre et Legendre, 1998)
# => Numerical Ecology with R (Borcard et al, 2011)

#-----
# 5.1. Discrimination des stations en fonction des pigments
#-----

# Clusters en utilisant une distance euclidienne D1
#-----
data2.D=dist(spe, method="eucl")
data2.cl=hclust(data2.D, method="complete")
plot(data2.cl, main="Cluster avec distance euclidienne D1")
hcoplot(data2.cl, data2.D, k=2)

# Carte geo avec les groupes obtenus par clusters
#-----
# Plot des clusters sur la carte en fonction du partage des branches
data2.g=cutree(data2.cl,2) # choix du nombre de branches a garder

# Coordonnes geo x et y de la matrice spa
plot(spa, asp=1, type="n", xlim=c(-5,-1), ylim=c(43,48), main="Selon clusters dist=D1",
      xlab="Longitude", ylab="Latitude")
# Ajoute labels
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.7, col="red")
# Ajoute carte ouest France
lines(fra, col="blue")
# Ajouter les groupes
grw=data2.g
k=length(levels(factor(grw)))
for (i in 1:k) {
  points(spa[grw==i,1], spa[grw==i, 2], pch=i+20,cex=2,col=i+1,bg=i+1)
}
#text(spa, row.names(spa), cex=0.4, col="black", font=2)
legend("bottomleft", paste("Group",1:k), pch=(1:k)+20, col=2:(k+1), pt.bg=2:(k+1), pt.cex=2,
      bty="n")

```


Pour mieux visualiser la distribution spatiale de ces deux groupes, nous réalisons une carte avec la différenciation de station par groupe (Figure 7).

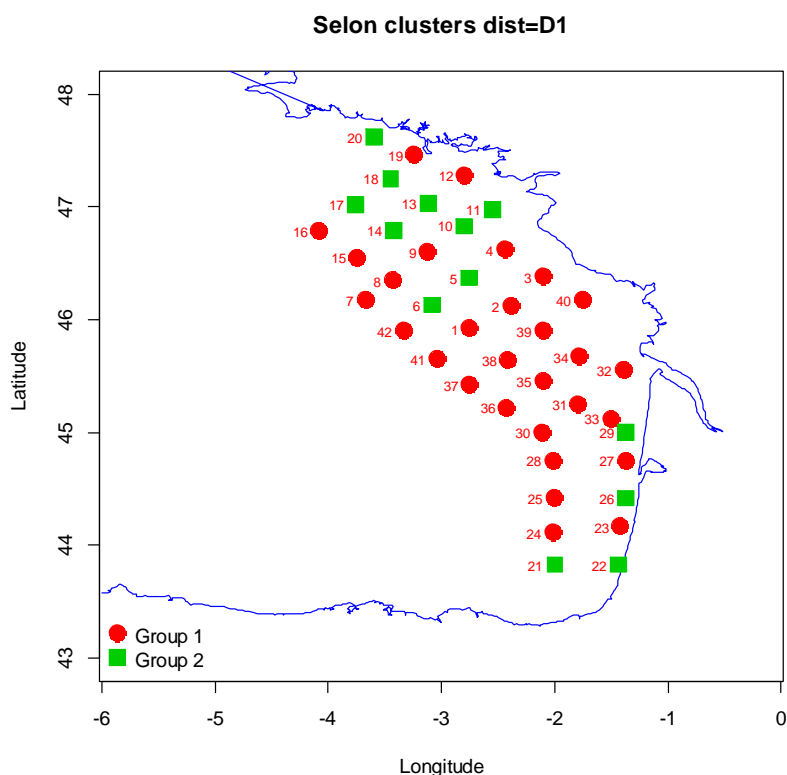


Figure 7 : Carte avec les clusters obtenus dans le point précédent

Si l'on veut récupérer les données des pigments en fonction des clusters, nous récupérons les informations qui sont stockés dans « grw » ou « data2.g » au moyen des commandes suivantes :

```
# Pour recuperer les matrices de donnees separees par les clusters
#-----
spe.cl1=subset (spe,grw==1)
spe.cl2=subset (spe,grw==2)
```

Nous aurons alors deux objets distincts pour les traiter séparément (figure 8).

Mais la distance euclidienne D1 n'est pas la seule pour séparer la matrice pigmentaire. Vous trouverez une abondante information dans les livres dédiés (Borcard, Guillet, et Legendre 2011; Legendre et Legendre 1998) ainsi que dans les publications scientifiques. Dans le script « cours CHEMOTX2014.r » vous trouverez une autre option de classement hiérarchique. Mais quelle est la bonne ? Malheureusement, il n'y en a pas. C'est à vous de décider en fonction des informations dont vous disposez.

> spe.cl1								> spe.cl2							
	peri	fuco	HF	allo	zea	chl_b	chl_a		peri	fuco	HF	allo	zea	chl_b	chl_a
1	0	80	60	27	0	104	469	5	42	144	51	63	30	124	1134
2	0	32	0	0	0	0	194	6	0	66	54	32	0	100	625
3	0	19	0	22	0	34	305	10	22	76	10	17	0	70	682
4	0	47	0	25	0	63	325	11	0	116	0	58	0	155	820
7	0	42	38	12	0	88	298	13	33	213	45	16	0	42	668
8	0	68	29	0	22	76	238	14	43	137	69	32	0	85	733
9	36	57	21	33	21	47	549	17	44	180	41	32	0	62	907
12	28	61	0	20	14	63	494	18	30	343	41	26	0	36	1194
15	0	39	0	0	0	57	284	20	30	142	69	23	0	105	777
16	0	54	20	0	0	75	323	26	0	53	42	41	35	186	670
19	0	60	0	20	0	46	466	27	0	41	31	46	25	123	624
28	47	53	40	18	27	159	553	31	32	88	48	35	22	182	760
29	0	53	44	25	0	163	408	34	0	48	0	88	0	94	783
30	0	68	77	24	24	159	481								
32	19	15	0	33	12	36	404								
33	0	21	0	0	0	0	59								
35	0	35	28	12	0	109	304								
36	0	48	43	21	0	107	564								
37	0	85	0	0	0	0	342								
38	0	73	0	0	0	0	273								
39	0	51	37	0	0	71	341								
40	0	50	24	0	0	76	275								
41	0	42	45	0	0	85	312								
42	0	65	41	0	12	122	363								
43	0	90	58	15	7	89	474								
44	0	100	50	19	0	126	526								
45	0	89	0	13	14	111	540								
46	0	66	26	19	16	85	375								
47	0	34	12	0	0	40	243								

Figure 8 : Matrices pigmentaires séparées en fonction des 2 groupes de clusters

4.- Diagnostic Pigments (DP)

C'est la méthode la plus simple. Elle permet de réaliser une première approche rapide de la distribution des classes algales de la matrice pigmentaire. Cette méthode est basée sur la connaissance des rapports pigmentaires des classes algales et des successions phytoplanctoniques dans la zone d'étude (Higgins, Wright, et Schlüter 2011).

A partir de la matrice de données pigmentaires, nous devons définir les classes algales à retenir pour l'analyse chémotaxonomique. Ceci est fait au regard de la distribution des pigments et la connaissance des peuplements phytoplanctoniques sur la zone d'étude. Pour cette analyse, nous avons retenu : peri = dinoflagellés ; fuco = diatomées ; HF = prymnésiophytes ; allo = cryptophycées ; zea = cyanophycées ; chlb = algues vertes.

Pour obtenir une matrice de résultats avec la part de la biomasse (chla) prise par chaque classe algale (matrice [C]), l'on doit appliquer la matrice des rapports pigmentaires (matrice [F]) à la matrice des données échantillonnées (matrice [S]). Les rapports pigmentaires chla/pigment peuvent être obtenus dans la bibliographie (Higgins, Wright, et Schlüter 2011).

$$[\text{chla}]_{\text{tot}} = \cancel{\text{Fuco}} * \frac{\text{diatoms}}{\cancel{\text{Fuco}}} * \text{chla} + \cancel{19\text{HF}} * \frac{\text{prymnesiophytes}}{\cancel{19\text{HF}}} * \text{chla} + \dots$$

Ceci peut se faire sur une feuille de calcul Excel ou Open Office (figure 9).

Matrice de données [S]							Valeurs de [chla] classe en ng/L [C]							% de chaque classe algale [C]						
peri	fuco	19HF	allo	zea	chl b	chla	coef [F]=>													
							1.6	3.1	1.3	3.3	2	1.5			dino	diato	prym	cryp	cyan	verte
0	80	60	27	0	104	469	0	248	78	89	0	156	571	122	0	53	17	19	0	33
0	32	0	0	0	0	194	0	99	0	0	0	0	99	51	0	51	0	0	0	0
0	19	0	22	0	34	305	0	59	0	73	0	51	183	60	0	19	0	24	0	17
0	47	0	25	0	63	325	0	146	0	83	0	95	323	99	0	45	0	25	0	29
42	144	51	63	30	124	1134	67	446	66	208	60	186	1034	91	6	39	6	18	5	16
0	66	54	32	0	100	625	0	205	70	106	0	150	530	85	0	33	11	17	0	24
0	42	38	12	0	88	298	0	130	49	40	0	132	351	118	0	44	17	13	0	44
0	68	29	0	22	76	238	0	211	38	0	44	114	407	171	0	89	16	0	18	48
36	57	21	33	21	47	549	58	177	27	109	42	71	483	88	10	32	5	20	8	13
22	76	10	17	0	70	682	35	236	13	56	0	105	445	65	5	35	2	8	0	15
0	116	0	58	0	155	820	0	361	0	192	0	232	785	96	0	44	0	23	0	28
28	61	0	20	14	63	494	45	189	0	66	28	95	422	86	9	38	0	13	6	19
33	213	45	16	0	42	668	53	660	59	53	0	63	887	133	8	99	9	8	0	9
43	137	69	32	0	85	733	69	425	90	106	0	128	816	111	9	58	12	14	0	17
0	39	0	0	0	57	284	0	121	0	0	0	86	206	73	0	43	0	0	0	30
0	54	20	0	0	75	323	0	167	26	0	0	113	306	95	0	52	8	0	0	35
44	180	41	32	0	62	907	70	558	53	106	0	93	880	97	8	62	6	12	0	10
30	343	41	26	0	36	1194	48	1063	53	86	0	54	1304	109	4	89	4	7	0	5
0	60	0	20	0	46	466	0	187	0	66	0	68	322	69	0	40	0	14	0	15
30	142	69	23	0	105	777	48	440	90	76	0	158	811	104	6	57	12	10	0	20
0	53	42	41	35	186	670	0	164	55	135	70	279	703	105	0	25	8	20	10	42
0	41	31	46	25	123	624	0	127	40	152	50	185	554	89	0	20	6	24	8	30
47	53	40	18	27	159	553	76	163	52	60	54	239	644	116	14	30	9	11	10	43
0	53	44	25	0	163	408	0	164	57	83	0	245	549	134	0	40	14	20	0	60
0	68	77	24	24	159	481	0	211	100	79	48	239	677	141	0	44	21	16	10	50
32	88	48	35	22	182	760	51	273	62	116	44	273	819	108	7	36	8	15	6	36
19	15	0	33	12	36	404	30	47	0	109	24	54	264	65	8	12	0	27	6	13
0	21	0	0	0	0	59	0	65	0	0	0	0	65	110	0	110	0	0	0	0
0	48	0	88	0	94	783	0	149	0	290	0	141	580	74	0	19	0	37	0	18
0	35	28	12	0	109	304	0	109	36	40	0	164	348	114	0	36	12	13	0	54
0	48	43	21	0	107	564	0	149	56	69	0	161	435	77	0	26	10	12	0	28
0	85	0	0	0	0	342	0	263	0	0	0	0	263	77	0	77	0	0	0	0
0	73	0	0	0	0	273	0	227	0	0	0	0	227	83	0	83	0	0	0	0
0	51	37	0	0	71	341	0	158	48	0	0	107	313	92	0	46	14	0	0	31
0	50	24	0	0	76	275	0	155	31	0	0	114	300	109	0	56	11	0	0	41
0	42	45	0	0	85	312	0	130	59	0	0	128	316	101	0	42	19	0	0	41
0	65	41	0	12	122	363	0	202	53	0	24	183	462	127	0	56	15	0	7	50
0	90	58	15	7	89	474	0	279	75	50	14	134	551	116	0	59	16	10	3	28
0	100	50	19	0	126	526	0	310	65	62	0	188	626	119	0	59	12	12	0	36
0	89	0	13	14	111	540	0	276	0	43	28	167	513	95	0	51	0	8	5	31
0	66	26	19	16	85	375	0	205	34	63	32	128	461	123	0	55	9	17	9	34
0	34	12	0	0	40	243	0	105	16	0	0	60	181	74	0	43	6	0	0	25

Figure 9 : Feuille de calcul avec les données initiales [S], les rapports pigmentaires [F] et les résultats [C]

Attention : dans cette méthode, les rapports pigmentaires sont → chla/pigment

Il suffit de multiplier par colonne, les coefficients [F] par chacune des valeurs de la matrice [S]. Ce calcul donne directement la contribution de chaque classe algale à la biomasse totale (chla) pour chaque échantillon.

Un aperçu de l'ajustement de la méthode est donné par la régression entre la colonne de la chla mesurée de la matrice [S] et la somme des biomasses calculées de la matrice [C] (colonne en bleue dans la figure 9) (figure 10).

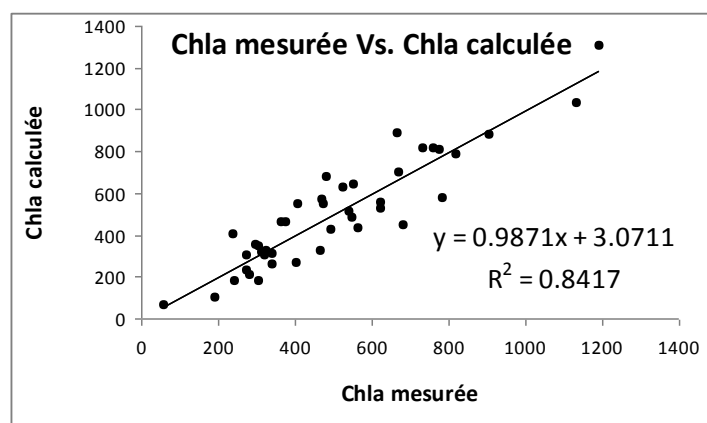


Figure 10 : Régression entre la biomasse chlorophyllienne mesurée et la somme des chla calculées pour chaque classe algale

La colonne en rouge présente le pourcentage d'écart entre la biomasse calculée et la biomasse chlorophyllienne mesurée (figure 11).

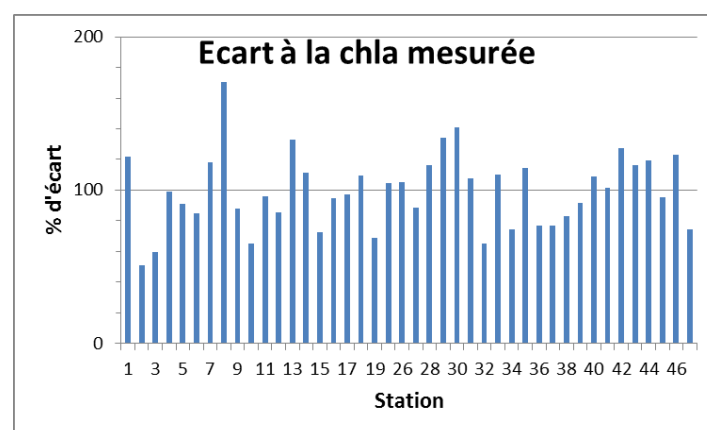


Figure 11 : Ecarts entre la biomasse calculée (somme classes algales) et la biomasse mesurée (chla)

Cette méthode est d'une mise en œuvre rapide, car une table des rapports pigmentaires et une feuille Excel suffisent. Elle présente l'avantage également de résoudre toutes les classes algales choisies, mais ses résultats s'avèrent parfois très éloignés de la réalité si l'on n'a pas une bonne connaissance des peuplements phytoplanctoniques locaux et de leur évolution temporelle. Un autre désavantage de taille est qu'on ne peut utiliser que des rapports uni-pigmentaires, c'est-à-dire, un pigment par classe algale.

5.- Régressions Linéaires Multiples (RLM)

Cette méthode est similaire à la précédente dans la mise en application de la feuille de calcul, mis à part le fait que les rapports pigmentaires à utiliser sont obtenus par à une régression multiple afin d'obtenir le meilleur ajustement.

La régression est effectuée à partir de la matrice pigmentaire [S] en ajoutant ou pas l'ordonnée à l'origine (constante). Cette constante regroupe théoriquement toutes les classes algales qui n'ont pas pu être définies par le modèle de régression. Il ne reste qu'à évaluer graphiquement sur la feuille de calcul l'ajustement du modèle.

L'avantage des régressions multiples est d'obtenir le meilleur ajustement de la matrice pigmentaire, mais malheureusement, sans être sûrs que le modèle retienne tous les pigments introduits dans la formule, ni que les coefficients soient positifs ou réalistes.

Une fois ces rapports pigmentaires calculés, ils sont introduits dans la feuille de calcul (idem méthode DP) ; les rapports négatifs peuvent être ajustés manuellement, ce qui améliore parfois l'approche DP.

Les figures d'ajustement peuvent aider à estimer la pertinence des résultats, mais pour que cette méthode soit envisageable, il doit y avoir une bonne relation linéaire entre la chla mesurée et la somme des pigments retenus (figure 12).

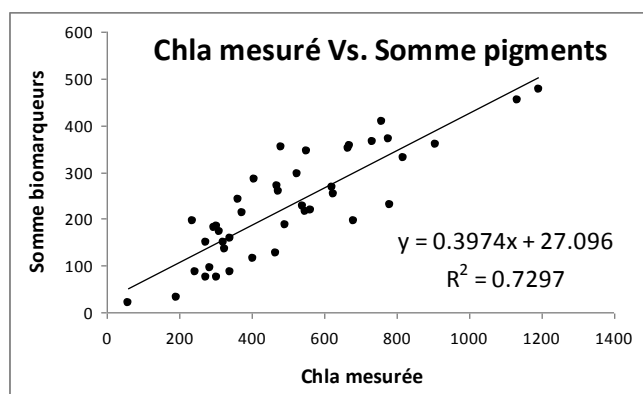


Figure 12 : Ajustement entre la chla mesurée et la somme des pigments biomarqueurs

La mise en pratique de ce calcul par régression linéaire multiple peut être réalisé avec un logiciel de statistiques ou avec un simple script « R » tel que :

```
#####
# 4.- REGRESSIONS MULTIPLES (RLM)
#####
# Realisation de la regression
reg=lm(chl a ~ peri+fuco+HF+allo+zea+chlb, data=spe)
#reg=lm(chl_a ~ -1+peri+fuco+HF+allo+zea+chlb, data=spe) # sans Cte
summary(reg)
```

A quelques différences près, la feuille de calcul Excel des régressions multiples est similaire à celle de la méthode DP (figure 13).

Matrice de données [S]							Valeurs de [chla] classe en ng/L [C]										% de chaque classe algale [C]					
peri	fuco	19HF	allo	zea	chlb	chla	coef [F]=>							verif	diff	dino	diato	prym	cnyp	cyan	verte	
							2.87	2.34	1	5.9	0.6	1										
0	80	60	27	0	104	469	271	104.92	0	187	60	159	0	104	511	109	0	40	13	34	0	22
0	32	0	0	0	0	194	32	104.92	0	75	0	0	0	0	75	39	0	39	0	0	0	0
0	19	0	22	0	34	305	75	104.92	0	44	0	130	0	34	208	68	0	15	0	43	0	11
0	47	0	25	0	63	325	135	104.92	0	110	0	148	0	63	320	99	0	34	0	45	0	19
42	144	51	63	30	124	1134	454	104.92	121	337	51	372	18	124	1022	90	11	30	4	33	2	11
0	66	54	32	0	100	625	252	104.92	0	154	54	189	0	100	497	80	0	25	9	30	0	16
0	42	38	12	0	88	298	180	104.92	0	98	38	71	0	88	295	99	0	33	13	24	0	30
0	68	29	0	22	76	238	195	104.92	0	159	29	0	13	76	277	117	0	67	12	0	6	32
36	57	21	33	21	47	549	215	104.92	103	133	21	195	13	47	512	93	19	24	4	35	2	9
22	76	10	17	0	70	682	195	104.92	63	178	10	100	0	70	421	62	9	26	1	15	0	10
0	116	0	58	0	155	820	329	104.92	0	272	0	343	0	155	770	94	0	33	0	42	0	19
28	61	0	20	14	63	494	186	104.92	80	143	0	118	8	63	413	84	16	29	0	24	2	13
33	213	45	16	0	42	668	349	104.92	95	498	45	94	0	42	775	116	14	75	7	14	0	6
43	137	69	32	0	85	733	366	104.92	123	321	69	189	0	85	787	107	17	44	9	26	0	12
0	39	0	0	0	57	284	96	104.92	0	91	0	0	0	57	148	52	0	32	0	0	0	20
0	54	20	0	0	75	323	149	104.92	0	126	20	0	0	75	221	69	0	39	6	0	0	23
44	180	41	32	0	62	907	359	104.92	126	421	41	189	0	62	839	93	14	46	5	21	0	7
30	343	41	26	0	36	1194	476	104.92	86	803	41	153	0	36	1119	94	7	67	3	13	0	3
0	60	0	20	0	46	466	126	104.92	0	141	0	119	0	46	305	66	0	30	0	25	0	10
30	142	69	23	0	105	777	369	104.92	86	332	69	136	0	105	728	94	11	43	9	17	0	14
0	53	42	41	35	186	670	357	104.92	0	124	42	242	21	186	615	92	0	19	6	36	3	28
0	41	31	46	25	123	624	266	104.92	0	96	31	271	15	123	536	86	0	15	5	43	2	20
47	53	40	18	27	159	553	344	104.92	136	123	40	108	16	159	582	105	25	22	7	20	3	29
0	53	44	25	0	163	408	285	104.92	0	124	44	148	0	163	479	117	0	30	11	36	0	40
0	68	77	24	24	159	481	352	104.92	0	159	77	142	14	159	551	115	0	33	16	29	3	33
32	88	48	35	22	182	760	407	104.92	92	206	48	207	13	182	747	98	12	27	6	27	2	24
19	15	0	33	12	36	404	115	104.92	55	35	0	195	7	36	328	81	13	9	0	48	2	9
0	21	0	0	0	0	59	21	104.92	0	49	0	0	0	0	49	83	0	83	0	0	0	0
0	48	0	88	0	94	783	230	104.92	0	112	0	519	0	94	726	93	0	14	0	66	0	12
0	35	28	12	0	109	304	184	104.92	0	82	28	71	0	109	290	95	0	27	9	23	0	36
0	48	43	21	0	107	564	219	104.92	0	112	43	124	0	107	386	68	0	20	8	22	0	19
0	85	0	0	0	0	342	85	104.92	0	199	0	0	0	0	199	58	0	58	0	0	0	0
0	73	0	0	0	0	273	73	104.92	0	172	0	0	0	0	172	63	0	63	0	0	0	0
0	51	37	0	0	71	341	159	104.92	0	119	37	0	0	71	227	67	0	35	11	0	0	21
0	50	24	0	0	76	275	150	104.92	0	117	24	0	0	76	217	79	0	43	9	0	0	28
0	42	45	0	0	85	312	172	104.92	0	98	45	0	0	85	228	73	0	32	14	0	0	27
0	65	41	0	12	122	363	240	104.92	0	152	41	0	7	122	322	89	0	42	11	0	2	34
0	90	58	15	7	89	474	259	104.92	0	211	58	89	4	89	450	95	0	44	12	19	1	19
0	100	50	19	0	126	526	294	104.92	0	234	50	111	0	126	521	99	0	45	10	21	0	24
0	89	0	13	14	111	540	227	104.92	0	208	0	77	8	111	404	75	0	39	0	14	2	21
0	66	26	19	16	85	375	212	104.92	0	154	26	112	10	85	387	103	0	41	7	30	3	23
0	34	12	0	0	40	243	86	104.92	0	80	12	0	0	40	132	54	0	33	5	0	0	16

Figure 13 : Feuille de calcul avec les données initiales [S], les rapports pigmentaires [F] et les résultats [C] après une régression multiple

Attention : dans cette méthode, les rapports pigmentaires sont → chla/pigment

6.- CHEMTAX 1.95

Voici quelques conseils et procédures pour utiliser CHEMTAX 1.95. Attention, ils permettent de bien faire tourner le programme, mais en aucun cas d'obtenir de bons résultats. CHEMTAX n'est pas une boîte noire où l'on rentre des données pigmentaires aveuglement et qui fournit des résultats cohérents (Irigoien et al. 2004). Chemtax permet « au mieux » d'avoir une matrice présentant les meilleurs ajustements, mais la validité des résultats dépend entièrement des valeurs des rapports pigmentaires saisis (matrice Fo) et des paramètres utilisés pour le run, ainsi que de leur interprétation.

Le CSIRO demande de ne pas distribuer CHEMTAX autour de soi et appelle les possibles utilisateurs à les contacter pour en faire une demande du logiciel (gratuit) à Simon.Wright@aad.gov.au.

Avant l'utilisation de Chemtax 1.95 et pour le choix des paramètres de configuration, se référer au document de Chemtax V1 (Mackey et al. 1997).

6.1. Calcul simple de distribution de classes algales

Dans ce premier paragraphe, nous verrons comment réaliser les mêmes calculs que Chemtax V1 (avec Matlab) avec chemtax.exe (Chemtax 1.95 sous Excel). Les nouvelles procédures d'optimisation seront présentées dans le #6.2. J'ai essayé Chemtax 1.95 avec les versions Excel 2000 à Excel 2010 sans problèmes. Ceci n'est pas vrai pour la partie d'optimisation.

6.1.1. MISE EN PLACE DES DONNEES ET FICHIERS NECESSAIRES AU FONCTIONNEMENT

Créer un répertoire pour mettre tous les fichiers nécessaires à l'utilisation de CHEMTAX. Utiliser le nom du projet ou de la campagne par exemple. Copier dans ce répertoire les fichiers de base CHEMTAX, à savoir :

- Chemtax.exe
- CHEMTAX2.dll
- CHEMTAXHelper4 for V195.xlm (ou helper5 si nécessaire)
- PicoDataWorkup.xls (exemple pour l'optimisation)
- TESTRUNV195.xls (exemple de base)

Prendre le fichier d'exemple TESTRUNV195.xls pour le modifier et ajouter les données de votre campagne. Ceci est essentiel, car cette feuille contient tous les noms, formules et formatages nécessaires pour que tout fonctionne correctement avec chemtax.exe. Puis renommer TESTRUNV195.xls par un nom en accord avec la campagne (pcaf2000.xls par exemple).

Différents classeurs sont nécessaires au bon fonctionnement de CHEMTAX :

- Data
- Ratios
- Ratio Limits
- Configuration

Data : On doit mettre ici toutes les données pigmentaires de la même façon que dans TESTRUN195.xls. Ne pas supprimer les lignes 1 et 2. On doit juste supprimer les données du tableau et en ajouter les nouvelles. Ne pas oublier de rentrer les paramètres qui pourraient servir pour créer des groupes homogènes (en fonction de la profondeur, la position, clusters, etc...) dans une colonne. Veiller également à que la colonne de la chl a soit nommée exactement → **chl_a**. Ceci est particulièrement important pour la procédure d'optimisation. On peut mettre tous les pigments, même ceux qui ne seront pas utilisés dans les calculs (Figure 14). Ce classeur c'est l'équivalent des fichiers .dat de chemtax V1.

Data																
st	cluster	c3	c1c2	peri	BF	fuco	HF	prasi	diadino	allo	zea	chlb	bcarot	bpcarot	chlallo	chl_a
1	1	90	82	0	0	80	60	0	23	27	0	104	0	0	0	469
2	1	0	34	0	0	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	194
3	1	0	43	0	0	19	0	0	0	22	0	34	0	0	0	305
4	1	0	51	0	0	47	0	0	0	25	0	63	0	0	0	325
5	10	92	242	42	0	144	51	21	19	63	30	124	17	24	73	1134
6	10	101	125	0	0	66	54	0	19	32	0	100	0	0	0	625
7	1	34	64	0	0	42	38	18	14	12	0	88	0	0	0	298
8	1	23	58	0	0	68	29	0	0	0	22	76	0	0	0	238
9	1	48	114	36	0	57	21	0	13	33	21	47	0	0	71	549
10	10	71	139	22	0	76	10	8	12	17	0	70	40	38	0	682
11	10	0	171	0	0	116	0	0	45	58	0	155	0	0	0	820

Figure 14 : image partielle du tableau de données du classeur « Data »

Ratios : Ici doivent être rentrés les rapports pigmentaires initiaux (matrice Fo).

Attention : dans cette méthode, les rapports pigmentaires sont → pig/chla.

Comme pour le classeur « Data », veiller à ne pas supprimer d'autres lignes que celles des classes algales. Ajouter si nécessaire des colonnes pour les pigments ou des lignes pour les classes algales.

Si l'on veut tester plusieurs hypothèses, on peut créer autant de matrices Fo que l'on veut (Figure 15). Les renommer à souhait (Testrun1, A, Fo1, ou RAT1...). Mais surtout ne rien changer à l'organisation de la feuille.

Ce classeur est l'équivalent des fichiers .rat de chemtax V1.

Pigment Data Configuration																
Output Relative	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Output Absolute	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
RATIOS																
Name	Testrun1															
Pigment Selection	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	
Class / Pigment	c3	c1c2	peri	BF	fuco	HF	prasi	diadino	allo	zea	chlb	bcarot	bpcarot	chlallo	chl_a	
dinos	0	0	0.556	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
diatos	0	0	0	0	0.625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
prymne	0	0	0	0	0	0.556	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
cryptos	0	0	0	0	0	0	0	0	0.385	0	0	0	0	0	1	
cyanos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.625	0	0	0	0	1	
vertes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.313	0	0	0	1	
Name	Testrun2															
Pigment Selection	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	
Class / Pigment	c3	c1c2	peri	BF	fuco	HF	prasi	diadino	allo	zea	chlb	bcarot	bpcarot	chlallo	chl_a	
dinos	0	0	0.556	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
diatos	0	0	0	0	0.625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
prymne	0	0	0	0	0	0.556	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
cryptos	0	0	0	0	0	0	0	0	0.385	0	0	0	0	0	1	
cyanos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.625	0	0	0	0	1	
chloros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.032	0.315	0	0	0	1	
prasinus	0	0	0	0	0	0	0.245	0	0	0.058	0.704	0	0	0	1	

Figure 15 : Image d'un classeur « Ratios » avec deux matrices pigmentaires

Il est possible de copier directement le nom des colonnes (pigments) du classeur « Data » dans la ligne 9. Peu importe s'il y a des pigments que l'on ne souhaite pas utiliser. Pour définir ceux qui serviront au calcul, il suffit de mettre « 1 » au-dessus du pigment (ligne 8). S'il y a un « 0 », il ne sera pas considéré dans le calcul.

Les lignes 2 et 3 sont dédiées au choix du type de résultat cherché (classeurs OutR1,...). Nous pourrions avoir :

- Une matrice de résultats en valeur absolue (concentration en ng/L par exemple) qui représente la part de la biomasse totale (chl_a) prise par cette classe algale. Donc l'addition de toutes les classes algales (lignes) doit être égale à la valeur de la chl_a dans cet échantillon.
- Une matrice de résultats relatifs en % de la biomasse totale (chl_a). Donc, la somme de la ligne doit être égale à 100% ou 1 selon le calcul.

On peut demander les deux, mais si la matrice de données est grande et s'il y a trop de tests à faire, il est préférable d'en choisir une et obtenir l'autre avec une feuille Excel pour éviter d'avoir des gros fichiers de sortie.

Ratio Limits :

C'est l'équivalent des fichiers .rlm de chemtax V1.

On doit avoir ici les mêmes colonnes et lignes que dans le classeur « Ratios ». On peut créer également plusieurs matrices de ratios limites pour tester les différentes hypothèses. Peu importe qu'on fasse figurer des pigments à ne pas utiliser dans le calcul, CHEMTAX n'en tiendra pas compte (Figure 16).

RATIO LIMITS															
Name	A														
Class / Pigment	c3	c1c2	peri	BF	fuco	HF	prasi	diadino	allo	zea	chlb	bcarot	bpcarot	chlallo	chl_a
dinos	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
diatos	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
prymne	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
cryptos	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
cyanos	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
vertes	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Name	B														
Class / Pigment	c3	c1c2	peri	BF	fuco	HF	prasi	diadino	allo	zea	chlb	bcarot	bpcarot	chlallo	chl_a
dinos	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	100
diatos	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	100
prymne	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	100
cryptos	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	100
cyanos	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	100
chloros	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	100
prasinus	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	100

Figure 16 : Vue du classeur « Ratio Limits » avec deux matrices (A et B)

Configuration :

Cette partie était effectuée par le programme PREPRO fourni par chemtax V1. Mais avec la version 1.95, il est possible de définir des groupes ou 'Bins' (en fonction de la profondeur par exemple). Chaque groupe (Bin dans le classeur) peut être défini selon deux critères (quantitatifs). C'est ici qu'on définit la matrice de ratios initiaux (Testrun1 ou Testrun 2 par exemple) et la matrice de ratios limites choisis (A ou B). Il est possible de définir jusqu'à 16 bin par run chemtax, au-delà il faut lancer un nouveau run.

Dans la boîte en haut à gauche, ne rien changer sauf les « First Sort Parameter » et « Second Sort Parameter », où on doit définir le critère de sélection des Bin (Figure 17).

Par exemple, si l'on veut diviser le jeu de données en fonction des clusters réalisés (ou la profondeur), regarder le nom de la colonne où se trouvent les valeurs des clusters et y mettre le nom de cette colonne (voir le classeur « Data »).

Pour la boîte WEIGHTING, préférer le choix Bounded Relative.

Pour le reste des paramètres, se référer au manuel de Chemtax V1 (Mackey et al 1997).

Data Configuration						
Convergence Runs	1					
First Sort Parameter	cluster					
Second Sort Parameter						
Update Ratio Matrix?						
Optimise ON	all					
Normalise F0 On	row					
Bin	Start (>=)	End (<)	Start (>=)	End (<)	Ratio Matrix	RLM
1	0	10			Testrun1	A
2	10	100			Testrun1	A
Run Configuration						
Diary Filename						
Verbosity	2					
Iteration Limit	500					
Epsilon Limit	0.0001					
Initial Step Size	10					
Step Ratio	1.3					
Cutoff Step	10000					
Elements Varied	7	nombre pigments				
Subiterations	1					
Weighting	3					
Weight Bound	30					

VERBOSITY	WEIGHTING
Minimum	None
Low	Relative
Normal	Bounded Relative

Figure 17 : Vue du classeur « Configuration »

Analysis History :

Lors du premier run de CHTX, il sera créé automatiquement un classeur avec une synthèse de ce qui a été fait. A chaque fois qu'un nouveau run sera effectué, une nouvelle ligne sera ajoutée dans ce classeur.

Convergence : Ce classeur est à éliminer s'il existe dans votre TESTRUN195.xls car il fait partie d'une procédure qui n'est pas encore validée. Elle le sera dans une prochaine version (Chemtax 2).

OutR1 : C'est le nom des classeurs de résultats créés par chemtax.exe. Il y a autant de OutRxx que des runs lancées. Sur un run, nous pouvons avoir jusqu'à 16 Bins, mais si nous en avons besoin davantage (cas de l'optimisation par exemple), il faut lancer des runs avec des paquets successifs de 16 Bins, qui créeront autant de classeurs OutRxx.

Ce classeur présente les ratios calculés (F1) et les résultats par classe algale et par station. Selon la demande effectuée dans le classeur « Ratios », nous aurons les sorties en valeur absolue, relative (%) ou les deux.

6.1.2. PROCEDURE DE LANCEMENT DE CHEMTAX .EXE

Pour lancer un run en chemtax 1.95 suivre les étapes suivantes :

- 1.- Fermer le fichier Excel de données (pcaf2000.xls), Chemtax l'ouvre lui-même (bien que même ouvert je n'ai jamais eu de problèmes).
- 2.- Dans l'explorateur Windows, double-cliquer sur le fichier **chemtax.exe** du répertoire de travail pour ouvrir l'interphase Chemtax 1.95.
- 3.- Dans File/Open, ouvrir le fichier pcaf2000.xls. Chemtax crée les groupes définis dans la configuration (Bins), s'il y a un problème, il s'arrête et indique le problème (le plus souvent des problèmes de formatage ou de mauvais nom de pigments ou classes). Le menu 'View Data' permet de jeter un coup d'œil sur les données, mais c'est assez austère.
- 4.- Aller dans Run/Solve et valider. Une petite figure s'ouvre pour montrer l'évolution des calculs. Il crée alors le classeur « Analysis History » (ou ajoute une ligne s'il existe déjà), puis crée le classeur « OutRxx » qui contient les valeurs des matrices de rapports pigmentaires calculés F1 (ajustées par rapport à la matrice initiale Fo) et les résultats des matrices de classes algales (en absolu ou relatif, ou les deux selon notre choix en « Configuration »).

6.1.3. ANALYSE DES RESULTATS

Les résultats se présentent dans les classeurs OutRxx, où l'on trouve deux parties successives, *****RATIOS***** et *****COMPOSITIONS*****

Partie 'RATIOS' :

La feuille de résultats OutRxx présente toujours en premier la date et l'heure du run, puis sera suivie des résultats des matrices des rapports pigmentaires F1 modifiés (ajustées) par chemtax et ceci bin par bin (Figure 18).

*** RATIOS ***									
Bin #	FSP Sta	FSP End	SSP Sta	SSP End	RM	RLM	Final Ite	Final Step	S RMS Errc
1	0	10	0	0	Testrun1	A	86	11925.3193	0.07035
Final Ratio Matrix (F1)									
	peri	fuco	HF	allo	zea	chlb	chl_a		
dinos	0.35733	0	0	0	0	0	0.64267		
diatos	0	0.20926	0	0	0	0	0.79074		
prymne	0	0	0.81208	0	0	0	0.18792		
cryptos	0	0	0	0.16676	0	0	0.83324		
cyanos	0	0	0	0	0.38462	0	0.61538		
vertes	0	0	0	0	0	0.47209	0.52791		
% Change in Ratio Matrix (100 x (F1 - F0) / F0)									
dinos	0	0	0	0	0	0	0		
diatos	0	-45.592	0	0	0	0	28.495		
prymne	0	0	127.266	0	0	0	-70.76		
cryptos	0	0	0	-40.008	0	0	15.4032		
cyanos	0	0	0	0	0	0	0		
vertes	0	0	0	0	0	98.0358	-30.685		

Figure 18 : OutR1 avec les résultats de la matrice de ratios pigmentaires F1 du premier bin

Sur la première ligne nous pouvons voir les données entrées dans le classeur « Configuration ». "FSP Start"=First Step Start et "SSP Start" pour Second Step Start. Nous avons aussi le RMS, error qui permet de connaître quel est le bin qui a eu la moindre erreur (ou meilleur ajustement) si plusieurs bins sont testés.

Nous trouvons également les matrices de rapports pigmentaires en % de changement par rapport à la matrice originale (% Change in Ratio Matrix (100 x (F1 - F0) / F0)).

Pour pouvoir réaliser les calculs, Chemtax normalise la matrice Fo de façon à avoir la somme de chaque ligne égale à 1 (chla incluse). Les résultats de la matrice F1 présentés dans OutRxx sont

également normalisés et ne sont pas directement comparables avec ceux de la matrice Fo ni avec ceux de la littérature (ATTENTION !).

Partie 'COMPOSITIONS' :

Dans la deuxième partie du classeur OutRxx nous trouvons les matrices de distribution des classes pigmentaires par échantillon (ou station). Historiquement, c'est la matrice [C] dans chemtax V1. Cette deuxième partie intègre selon la configuration (Figure 19) :

- une matrice de résultats avec la composition relative à la biomasse totale en chla (Relative Pigment Compositions) ou,
- une matrice en valeurs absolues qui correspond à la part en concentration de la chla pour chaque classe (Absolute Pigment Compositions).

*** COMPOSITIONS ***										
Relative Class Compositions (C1)										
Relative Pigment Compositions - Bin # 1										
chl_a										
Bin #	Index	st	cluster	dinos	diatos	prymne	cryptos	cyanos	vertes	
1	1	1	1	0	0.50058	0.0277	0.26272	0	0.209	
1	2	2	1	0.00309	0.9219	0.00059	0.01915	0.00254081	0.05273	
1	3	3	1	0.00223	0.41793	0.00042	0.40448	0.00183041	0.17312	
1	4	4	1	0	0.44702	0	0.36291	0	0.19007	
1	7	7	1	0	0.4692	0.02864	0.19192	0	0.31024	
1	8	8	1	0	0.62	0.02324	0	0.12266653	0.23409	
1	9	9	1	0.11889	0.40768	0.00894	0.3034	0.06174907	0.09934	
1	12	12	1	0.10343	0.49439	5.8E-05	0.20652	0.04612005	0.14948	
1	15	15	1	0.00203	0.70707	0.00039	0.01258	0.00166905	0.27627	
1	16	16	1	0.00071	0.70069	0.01485	0.00441	0.00058478	0.27876	
1	19	19	1	0.00144	0.62112	0.00027	0.23624	0.00118545	0.13974	
1	23	28	1	0.14929	0.30072	0.0161	0.15672	0.07524099	0.30193	
1	24	29	1	0	0.3198	0.02288	0.27344	0	0.38389	
1	25	30	1	0	0.36061	0.03412	0.22043	0.0727535	0.31209	
1	27	32	1	0.0918	0.27513	0.00033	0.44527	0.05202299	0.13546	
1	28	33	1	0	1	0	0	0	0	
1	30	35	1	0	0.39914	0.02092	0.19181	0	0.38813	
1	31	36	1	0.00208	0.49894	0.01942	0.21354	0.00171057	0.26431	
1	32	37	1	0.00048	0.98796	9.1E-05	0.00295	0.00039157	0.00813	
1	33	38	1	0	1	0	0	0	0	
1	34	39	1	0.00137	0.69421	0.02666	0.00847	0.00112375	0.26816	
1	35	40	1	0	0.67449	0.02008	0	0	0.30543	
1	36	41	1	0.00118	0.61724	0.03508	0.00729	0.00096709	0.33824	
1	37	42	1	0	0.57951	0.02501	0	0.05017498	0.3453	
1	38	43	1	0	0.61925	0.02709	0.14623	0.02195393	0.18547	
1	39	44	1	0	0.58574	0.02068	0.16246	0	0.23113	
1	40	45	1	0	0.61249	0	0.11915	0.04123073	0.22712	
1	41	46	1	0	0.49125	0.01465	0.22543	0.06229474	0.20639	
1	42	47	1	0.0022	0.73287	0.01279	0.01359	0.00180379	0.23675	
Absolute Pigment Compositions - Bin # 1										
chl_a										
Bin #	Index	st	cluster	dinos	diatos	prymne	cryptos	cyanos	vertes	
1	1	1	1	0	234.77	12.9928	123.217	0	98.0202	
1	2	2	1	0.59986	178.849	0.11408	3.71421	0.49291644	10.2299	
1	3	3	1	0.67939	127.467	0.1292	123.365	0.55827367	52.801	
1	4	4	1	0	145.281	0	117.946	0	61.7734	
1	7	7	1	0	139.823	8.5337	57.1908	0	92.4527	
1	8	8	1	0	147.559	5.53209	0	29.1946335	55.7142	
1	9	9	1	65.2708	223.814	4.90973	166.565	33.900238	54.5397	
1	12	12	1	51.0932	244.227	0.02879	102.022	22.7833061	73.8455	
1	15	15	1	0.57685	200.807	0.1097	3.57175	0.47401035	78.4606	
1	16	16	1	0.22986	226.322	4.796	1.42326	0.18888247	90.0397	
1	19	19	1	0.67227	289.443	0.12785	110.088	0.55241925	65.1166	
1	23	28	1	82.5096	166.205	8.89572	86.6181	41.5848045	166.875	
1	24	29	1	0	130.477	9.33399	111.563	0	156.626	
1	25	30	1	0	173.454	16.4094	106.025	34.9944305	150.117	
1	27	32	1	37.0856	111.151	0.1322	179.89	21.0172882	54.7246	
1	28	33	1	0	59	0	0	0	0	
1	30	35	1	0	121.338	6.36002	58.3117	0	117.991	
1	31	36	1	1.17407	281.402	10.9549	120.435	0.96476251	149.069	
1	32	37	1	0.16317	338.303	0.03103	1.01034	0.13408276	2.78272	
1	33	38	1	0	273.333	0	0	0	0	
1	34	39	1	0.46633	236.727	9.09223	2.88747	0.38319802	91.4435	
1	35	40	1	0	185.486	5.52153	0	0	83.9927	
1	36	41	1	0.36719	192.58	10.9452	2.27361	0.30173296	105.532	
1	37	42	1	0	210.364	9.07801	0	18.2135181	125.345	
1	38	43	1	0	293.526	12.8411	69.3136	10.4061613	87.9129	
1	39	44	1	0	307.838	10.867	85.3797	0	121.471	
1	40	45	1	0	330.747	0	64.341	22.2645969	122.647	
1	41	46	1	0	184.218	5.49194	84.5345	23.360527	77.3947	
1	42	47	1	0.53342	178.087	3.10819	3.30283	0.4383209	57.53	

Figure 19 : OutR1 avec les résultats en biomasse et relatifs (%) de la chla pour le bin 1

On peut vérifier que dans la matrice des résultats relatifs, la somme de la ligne de chaque échantillon est = 1. Donc, chaque valeur représente le pourcentage de cette classe algale dans l'échantillon total. La somme de chaque ligne dans la matrice de valeurs absolues n'est autre que la concentration en chl_a présentée dans la matrice de données du classeur « Data ». Donc, leur addition par ligne doit être égale à la valeur en chl_a mesurée figurant dans la matrice de données du classeur « Data ».

6.2. Procédure d'optimisation des résultats

L'un des principaux problèmes dans la résolution matricielle est de tomber dans un *minima* qui arrête le processus de calcul par itérations avant de trouver le meilleur ajustement. Pour éviter ce problème, ou tout au moins pour savoir si nous sommes dans ce cas, il est prévu dans Chemtax 2 une procédure d'optimisation. Elle est seulement en ébauche dans chemtax1.95 et ne fonctionne pas correctement. En attendant la sortie de Chemtax 2, Simon Wri^gth a mis en place une procédure permettant de mieux optimiser les résultats de Chemtax 1.95.

Définition de la procédure d'optimisation pour Chemtax 1.95 :

Oublions la procédure de « Convergence » prévue et suivons la démarche expliquée par S. Wri^gth (voir en annexes le texte original). Les résultats de Chemtax sont très sensibles aux valeurs initiales de Fo et rien n'empêche le calcul de s'arrêter dans un minima local (fausse valeur optimale). L'idée est donc d'augmenter le nombre de calculs avec des matrices Fo légèrement différentes afin de permettre d'avoir des solutions qui ne tombent pas dans les minimas.

Il est proposé de réaliser 60 matrices Fo, calculées selon une méthode aléatoire qui les font varier de plus ou moins 35% par rapport à la matrice initiale Fo fixée par l'utilisateur. Chacune de ces nouvelles matrices Fo (A00 pour celle fixée par nous, puis A01, A02... A61 pour celles calculées avec le coefficient F) génère une matrice de résultats, où $F=1+S*(R-0.5)$, avec S = facteur d'échelle (typiquement = 0.7) et R un chiffre aléatoire entre 0 et 1.

Nous obtenons donc 61 matrices de résultats contenant les rapports pigmentaires, les classes algales ainsi que leur RMS (erreur). Il est donc possible de savoir s'il y a des variations suspectes et si besoin, de détecter les rapports pigmentaires F1 en cause.

Lire attentivement les instructions écrites par Simon Wright à ce sujet.

Pour utiliser les procédures d'optimisation de la macro CHEMTAXHelper4 for V195.xlm ou CHEMTAXHelper5 for V195.xlm, il est nécessaire de disposer une version originale en anglais d'Excel 2000 à 2003. Les versions supérieures à 2007 ont un langage en visual basic différent des anciennes et ce n'est pas transposable. De même, les macros écrites en anglais ne fonctionnent pas sur les versions françaises.

Procédure :

1.- La procédure d'optimisation peut être réalisée dans le fichier Excel où ont été réalisés les calculs avec Chemtax 1.95, ou dans un autre si le nombre de classeurs est trop important. Ceci permet d'avoir une meilleure visibilité sur tous les calculs.

Si on choisit d'utiliser un autre classeur, il faut partir du fichier des calculs (pcaf2000.xls par exemple) en gardant uniquement les classeurs : Data, Ratios, Ratios Limite, Configuration et les sorties OutRxx que nous voulons pour l'optimisation. Puis on change le nom du fichier (pcaf2000_optim.xls) et l'on

y ajoute le classeur « RatiosLiveFormulae » qui se trouve dans le fichier « PicoDataWorkup.xls » fourni avec Chemtax 1.95.

2.- Ne rien changer dans le classeur Data.

3.- Dans le classeur Ratios, il faut ajouter les 60 matrices de ratios pigmentaires aléatoires. Pour ce faire, ouvrir le classeur « RatiosLiveFormulae » où se trouvent 3 ou 4 anciennes matrices réalisées par S.Wright et les modifier avec nos pigments et nos classes algales. Faire les modifications uniquement au niveau des matrices, pas dans les lignes au-dessus.

A partir de la matrice A00 sont créées les autres matrices A01, A02... avec des références absolues. Il faut le faire jusqu'à la matrice A61 en copiant successivement vers le bas d'autres matrices avec les mêmes références. Attention, vérifier chaque étape.

Comme il s'agit des calculs 'à la volée', toutes les matrices sont recalculées avec la formule aléatoire à chaque changement. Pour garder ces matrices fixes, il faut copier (copier/valeur) les 61 matrices dans le classeur « Ratios ». Nous obtenons donc, en plus des matrices qui ont été utilisées pour les calculs initiaux (A00 dans notre cas), les matrices A01 à A61.

4.- Le classeur « Ratios Limits » ne doit pas être changé en principe, car dans le fichier pcaf2000.xls, nous avons obtenu la bonne combinaison des matrices de ratios pigmentaires (maintenant notre A00), de ratios limites et des bins (s'il y a lieu).

5.- Le classeur « Configuration » doit maintenant être paramétré pour l'optimisation.

Les paramètres de calcul doivent rester les mêmes que ceux utilisés pour le calcul initial, mais il faut ajouter les 61 matrices de ratios pigmentaires. Dans les « bin's » on peut ajouter seulement 16 bins simultanés (lignes). Il faut donc lancer un run avec les bins des matrices A00 à A15, puis recommencer avec les bins A16 à A31, A32 à A47 et A48 à A61, pour créer 4 fichiers de résultats (OutR1 à OutR4).

Cette opération n'est valable que pour un seul des bins du calcul initial. C'est-à-dire que si pcaf2000.xls avait été sectorisé par cluster avec deux bins (Figure 7), il faudrait réaliser la procédure d'optimisation décrite plus haut pour chaque sectorisation.

6.- Insérer un classeur et le nommer « Summary » s'il n'existe pas. S'il existe, supprimer tout ce qu'il contient.

7.- Prendre note du nom des classeurs de résultats qui nous concernent pour l'optimisation (s'il y en a beaucoup) ; dans notre cas par exemple OutR1 à OutR4.

8.- Lancer la macro CHEMTAXHelper4 for V195.xlm (ou la version 5 si elle marche mieux), puis dans le fichier pcaf2000_optim.xls lancer la macro Tools/Macro/Macros/CollateData (ou Shift-Ctrl-L). Cette macro demande le premier et le dernier classeur de résultats (par exemple OutR1 à OutR4), puis calcule les moyennes des pourcentages (toutes stations confondues) des classeurs OutRxx et les met dans le classeur « Summary » par ordre décroissant d'erreur (RMS). S.Wright calcule alors la moyenne et l'écart type des dernières 6 meilleures.

Nous pouvons également faire un graphique de l'évolution de ces % de dominance des classes algales en fonction de l'erreur RMS et vérifier si c'est cohérent ou s'il y a des problèmes de flipping (voir annexe II). Le flipping peut être causé par des classes algales ayant des ratios pigmentaires qui sont proches et qui se chevauchent à cause de la variation aléatoire lors de la création des matrices A01 à A61.

9.- Pour savoir comment évoluent les ratios pigmentaires, on insère un nouveau classeur, qu'on appelle « RatioSummary ». On y copie une matrice pigmentaire du classeur « Ratios » avec les noms

de lignes et de colonnes (s'assurer que la chl_a est écrit « **chl_a** » exactement) dans ce nouveau classeur. Eliminer les colonnes avec les pigments inutiles (figure 20). Lorsque cette matrice copiée est sélectionnée, la nommer (Insert/Name/Define) RatioMatrix. Copier seulement à partir de la ligne Class/Pigment vers le bas et veiller à ne laisser que les pigments qui comptent pour le calcul, sinon, la macro produira des erreurs.

Class / Pigment	peri	fuco	HF	prasi	allo	zea	chlb	chl_a
dinos	0.556	0	0	0	0	0	0	1
diatos	0	0.625	0	0	0	0	0	1
prymne	0	0	0.556	0	0	0	0	1
cryptos	0	0	0	0	0.385	0	0	1
cyanos	0	0	0	0	0	0.625	0	1
chloros	0	0	0	0	0	0.032	0.315	1
prasinios	0	0	0	0.245	0	0.058	0.704	1

Figure 20 : Exemple de matrice de rapports pigmentaires à copier dans le classeur « RatioSummary ».
Seulement les pigments retenus pour le calcul doivent y figurer

10.- S'assurer qu'on est bien dans le fichier d'optimisation pour lancer la macro Tools/Macro/Macros/SummarizeOutputRatios (ou Shift-Ctrl-Z) qui demande les noms des sorties OutRxx du début et de fin. Cette macro colle tous les ratios calculés dans une table.

11.- Pour avoir ces valeurs normalisées par rapport à la chl_a, on peut lancer une nouvelle macro Tools/Macro/Macros/NormaliseRatios (ou Shift-Ctrl-N). Cette macro crée une nouvelle table en dessous de la première avec les valeurs de la chl_a=1. Il suffit alors de trier par RMS décroissante et de faire les figures d'évolution de chaque ratio pigmentaire. Les comparer avec les figures du classeur « Summary » et garder les 6 meilleurs résultats. On peut alors vérifier si ces ratios pigmentaires sont dans les fourchettes décrites dans le livre de Roy (Higgins, Wright, et Schlüter 2011) ou s'il faut chercher d'autres résultats ou relancer la procédure avec d'autres configurations.

12.- Ajouter un classeur « Notes » pour y porter l'évolution des choix et des calculs au fil de l'eau : on est rapidement perdu après plusieurs runs ou changements.

7. Bibliographie citée

- Borcard, Daniel, François Guillet, et Pierre Legendre. 2011. *Numerical Ecology with R*. Use R! Springer.
<http://www.springer.com/statistics/life+sciences%2C+medicine+%26+health/book/978-1-4419-7975-9>.
- Higgins, Harry W., Simon W. Wright, et Louise Schlüter. 2011. « Quantitative Interpretation of Chemotaxonomic Pigment Data ». In *Phytoplankton Pigments: Characterization and Applications in Oceanography*, Cambridge University Press. Suzanne Roy, Carole Llewellyn, Einar Skarstad Egeland and Geir Johansen.
- Jeffrey, S. W., R. F. C. Mantoura, S. W. Wright, International Council of Scientific Unions Scientific Committee on Oceanic Research, et Unesco. 1997. *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. UNESCO Publishing.
- Legendre, Pierre, et Louis Legendre. 1998. *Numerical Ecology*. Elsevier Science B.V. Developments in Environmental Modelling 20. Amsterdam: Elsevier.

-
- Mackey, M.D., H.W. Higgins, D.J. Mackey, et S.W. Wright. 1997. « CHEMTAX user's manual: a program for estimating class abundances from chemical markers — application to HPLC measurements of phytoplankton pigments ». Scientific et technique Report 229. Australia: CSIRO.
- Roy, Suzanne. 2011. *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*. Cambridge University Press.
- Van Heukelem, Laurie, et Crystal S Thomas. 2001. « Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments ». *Journal of Chromatography A* 910 (1): 31-49. doi:10.1016/S0378-4347(00)00603-4.
- Zapata, M, F Rodríguez, et JI Garrido. 2000. « Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases ». *Marine Ecology Progress Series* 195: 29-45. doi:10.3354/meps195029.

ANNEXES

- I.- Cover letter de Simon Wright au sujet de la version CHEMATX 1.95
- II.- Document original de Simon Wright pour l'utilisation de CHEMTAX 1.95
- III.- Quelques notes et échanges par email sur les problèmes d'utilisation
- IV.- Script « cours CHEMOTX2014.r »
- V.- Script « hcoplot.R »
- VI.- Bibliographie chémotaxonomique de base

I.- Cover letter de Simon Wright au sujet de la version CHEMATX 1.95

Dear colleagues

CHEMTAX distribution: There is an unresolved issue with V2 which our developer has been unable to address so far.

Since many of you have been waiting an awfully long time for V2, I've decided to fill the gap with V1.95. It includes many of the features of V2, but not the automation. I've also included Excel macros that I wrote to handle V1.95 data. This adds much of the V2 power, but it's nowhere near as elegant.

This is not an official release. The problem is that at present I have no way to support the software. When V1 was released, we (Denis Mackey, Harry Higgins and (to a much lesser extent) myself) spent 1 -2 days per week for over a year, answering questions and providing help. Denis and Harry have since both retired. Harry though is continuing to work on CHEMTAX.

Our organizations aren't in the business of selling software. Our present solution is to give the software away (as per V1) and hopefully in the future Harry will be able to provide professional support (he is in the process of setting up). CHEMTAX is distributed free with no guarantees or warranties or liabilities. It can't be sold on.

One thing I can guarantee is that it will give wrong answers if you give it wrong data. It will optimize on any taxonomic mix that you give it, whether it makes any sense or not.

The zip folder contains Chemtax.exe, Chemtax2.dll, Testrun195.xls, PicoDataWorkup.xls (example), CHEMTAXHelper for V195.xlm.

Also included are two Word files (Chemtax 195 Instructions.doc, and Chaxmanw.rtf, which is the manual for Version 1). The latter manual contains details on the algorithms used in Chemtax, which are unchanged, but the operating instructions in that manual are superseded by those in Chemtax 195 Instructions.doc. I will also include the page proofs of a chapter (Wright and Jeffrey 2006) that gives some advice on strategies for interpreting pigment data.

I hope it all works for you.

Best wishes

Simon

Dr Simon Wright
 Marine Microbial Ecology Group
 Australian Government Antarctic Division and
 Antarctic Climate and Ecosystems Cooperative Research Centre
 Channel Hwy
 Kingston, Tas 7050, Australia
 Phone: +61 3 6232 3338
 Fax: +61 3 6232 3158
 Email: Simon.Wright@aad.gov.au
 Web Sites:
 AAD home: <http://www.aad.gov.au>
 ACE-CRC: <http://www.acecrc.org.au/>
 Marine Microbial Ecology: <http://www.aad.gov.au/science/biology/mme>

II.- Document original de Simon Wright pour l'utilisation de CHEMTAX 1.95

CHEMTAX 1.95

This is not an official release of the software. Treat it as a beta test. Distributed only for scientific collaboration. Please don't pass it on without permission. CSIRO and the Australian Antarctic Division retain copyright.

It is very important to understand that CHEMTAX does not interpret pigment data for you. It must not be used as a black box. You must decide which taxa are in the sample and what pigments they contain. CHEMTAX is a tool to quantitatively optimize a model derived from expert interpretation of pigment data. If possible the taxa present should be determined by independent means, e.g. microscopy. CHEMTAX cannot correct garbage input.

A guide to interpreting pigment data is given in Wright and Jeffrey (2006) and references therein.

In this sheet blue text refers to sequences of commands from the pull-down menus at the top of the Excel or CHEMTAX window. E.g. [Insert/Name/Define](#) is found by sequential selection of choices from the Insert menu at the top of the page. Forgive me if I've been too explicit for Excel experts (who are identifiable by the wall marks on their foreheads!).

1. The zip file contains CHEMTAX.exe, CHEMTAX2.dll and Testrun195.xls. Extract them into an appropriate directory. You may want to make a backup of the XL file so that you can come back to the original version. I've also included some real (unpublished) data to show how I've approached the analysis (PicoDataWorkup.xls).

2. CHEMTAX 1.95 uses the same algorithm as V1 (Mackey et al 1996) but the interface is much better and the system is more powerful, because it is easier to automate. Unlike CHEMTAX V1 the data is entered directly from excel and the output is written back to the same sheet. I will attach the version 1 manual in which the algorithms behind CHEMTAX are described. Those unfamiliar with CHEMTAX should definitely understand the workings of Version 1 before attempting analysis with V1.95. This sheet replaces the operating instructions given in the V1 manual. Prepro is no longer used ☺.

3. The example sheet Testrun195.xls shows how it is done. It contains many worksheets:

Data: Obviously where the data goes, in columns. Non-pigment data can be included in this sheet. (The data in these columns was made up by the developer to test his routines. In a real data set they are very useful because you can use them to create subsets of the data, e.g. depth bins, and run CHEMTAX separately on each bin – more on this below). The pigment concentrations are in ug/L here, but can be any consistent unit. The chl_a column must be named "chl_a" exactly in the ratio matrices to work with my software below. Don't over-write the Data heading in cell A1.

Ratios: This contains pigment ratio matrices used as the starting point for CHEMTAX calculations. There is one column per pigment. Multiple pigment ratio matrices can, and should, be defined in this sheet – the additional power of V1.95 comes from the ability to test multiple scenarios.

The top three rows are used to define the output type, absolute concentrations or relative, for each pigment of interest. I only ever use absolute chl a.

Below that are the pigment matrices. Each matrix has a name (which must be unique) that is used by CHEMTAX as an identifier. The names of the pigments must match those in the data worksheet exactly; however you don't need to include all names from the data matrix in this table.

At the top of each matrix, there is a pigment selection row. This allows you to include (1) or ignore (0) individual pigments in the analysis.

*Note that the developer used the old categories *Haptophytes_N* and *Haptophytes_S* in this sheet, based on the 1996 version. Their persistence in the CHEMTAX literature is unfortunate because they were really just populations from the Southern Ocean in my data set (representing coccolithophorids and *Phaeocystis*). They were originally based on *Haptophytes* type 4 and 3, respectively, from Jeffrey and Wright (1994). These now correspond to as *Haptophytes* type 8 and 6, respectively, from Zapata et al (2004), in which there is more complete pigment information.*

Below the ratio matrices is the convergence matrix: This part isn't really going properly. It was intended to test the stability and reliability of the output ratios. I have approached this problem in a different way, using multiple (50+) ratio matrices and comparing the results. I'll describe this later.

Ratio Limits: One or more matrices define how far (%) the input ratios may be changed to optimise the pigment match.

Configuration: This sheet tells CHEMTAX what to do.

The data configuration section at top (ignore convergence) allows you to run Chemtax on subsets of the data, using columns from the data matrix. It is configured to separate two depth bins 0-50m, 50 – 100m. (I'd normally use more). Two parameters can be used to sort data on any parameter, e.g. depth, time, date, lat, long or any arbitrary data column (e.g a group defined from a cluster analysis). The rows below define the bins, their characteristics for the sort parameters above, and which ratio matrix and ratio limit matrix (RLM) to use on each bin. You can fill in 16 rows here.

The run configuration parameters correspond to V1. Weighting is fixed on Bounded Relative.

Notes: For your notes about each run

When you run CHEMTAX it will create additional worksheets: a run history sheet and multiple output sheets depending on the configuration.

4. To run CHEMTAX

1. Close the excel sheet if it's open. CHEMTAX likes to open it by itself
2. Run CHEMTAX by double clicking the Chemtax.exe icon
3. [File/Open](#) TestrunV195.xls. Chemtax reads the files and creates bins. If it has problems it will say so in the bottom System Status window. Problems usually occur with incorrect formatting, duplicate or missing names.

The View Data menu allows you to scan quickly through the pigment data, by pigment or by sample, to check for any outliers.

4. [Run/Solve](#). The little graph shows the RMS error being reduced. It will run through for each bin then write the results to the Excel sheet.

5. The Excel sheet now has an Analysis History sheet and an output sheet OutR1 (or more) that contains the data for each bin. It contains the final ratio matrix for each bin, the %change, and the calculated contributions of each taxon to the total chl. Each taxon abundance is expressed in ug chl a /L if that's what the starting units were.

5. Optimising the results

We have found that CHEMTAX is sensitive to the starting ratios.

Here's how I optimize them.

For CHEMTAX analysis, marker pigment: chl *a* ratios for various algal taxa were chosen from the literature or derived from laboratory cultures and used as 'seed' values, which CHEMTAX adjusted to best explain the field observations and to derive the taxonomic composition of field populations. CHEMTAX optimizes pigment ratios using iteration and a steepest descent algorithm to find a minimum residual (pigment content unexplained by the CHEMTAX solution, as root mean square), but it may not discover the best global solution if it encounters local minima in the process. To circumvent this possibility, multiple starting points were used: sixty further pigment ratio tables were generated by multiplying each cell of the initial table by a randomly determined factor F , where $F = 1 + S * (R - 0.5)$, S is a scaling factor (normally 0.7), and R is a random number between 0 and 1 generated using the Microsoft Excel RAND function. Each of the 60 ratio tables was used as the starting point for a CHEMTAX optimization. The solution with the smallest residual was used for the estimated taxonomic abundance. The best 10% of results ($n=6$) were chosen to calculate the average and the standard deviation of the abundance estimates.

I generated 61 ratio matrices (called A00-A60) on the matrix sheet. The configuration sheet only lets you define 16 rows, so I ran the data several times with another 16 each time.

Note: I've included a worksheet called RatiosLiveFormulae. This has the formulae for generating the randomized ratio matrices. I've fixed a scaling factor of 0.7 in the formulae. The Matrix A00 is fixed. All others have active formulae in them that refer back to matrix A00. You can copy these as many times as you like down the page and they will generate a new matrix every time you do so. All but A00 recalculate every time you change anything, so you can't leave them active, or you won't have any history trail.

When you have made enough matrices, fix the values in the matrices by going: select all (Ctrl-a), copy, [Edit/PasteSpecial/Values](#). You can use this live sheet to make more ratio sheets if you like. I suggest first setting up A00 with your best values, inserting/renaming/deleting rows and columns as necessary, then modify A01 to suit, and copy all of A01 and paste it many times down the page. Note that when you modify A01, the dollar signs in the formula specify which row in A00 is used. These

don't change if you fill down within the A01 matrix. You can fill right within the table, but if you fill down then you have to change the row numbers in each cell manually (fill column B, modify lines, fill right).

Working up the data

I've included an Excel Macro 'CHEMTAXHelper for V195.xlm'. This is an Excel 4 (!) macro that was used to compile the data for the 61 outputs above.

(Many years ago I wrote a 4000-line Excel 4 macro that I use to identify the peaks and compile my HPLC results, because successive generations of Waters software haven't been up to the job. Then Microsoft changed to Visual Basic and gave no path to it from Excel4 language (thanks a lot!). I still cling to Excel 4 because I still have to apply software bandaids to my main macro. It's a horror story).

Anyway, I hope it works on your machine. It works up to XL 2000, at least.

It's a bit messy. I never intended it for outside use. It includes some manual steps that can't be programmed (or I couldn't bother figuring out!)

But it does much of what CHEMTAX 2 is supposed to do. It's only useful if you've done the multiple ratio matrix trials I've talked about above.

I used it on the PicoDataWorkup sheet that I've included. I must point out that the data in this sheet is very messy because the pigment concentrations were very low (Picoplankton are very scarce in Antarctic waters). I had to omit several pigments because their concentrations were too low to be useful. Nevertheless, you will see that multiple trials arrived at reasonably stable results.

Here's how you do it.

1. In your data file, [Insert / worksheet](#), click on the bottom tab and name it Summary. I have renamed my sheet SummaryCopy so that you can see the final version and try the software without overwriting it.

If the Summary sheet exists, you can simply select all (Cntrl_a) and [edit/clear/all](#)

2. Before starting the macro, note the names of the output worksheets. On the Pico sheet they are OutR17 – OutR20 (I did lots of trials).
3. Make sure the data workbook is active (click on any cell) so that the macro knows which book you want to operate upon.
4. Type Shift-Ctrl-L, or use [Tools / Macro / Macros/ CollateData](#). It asks for the first and last output numbers. For my sheet, just type 17 and 20 respectively
5. The macro collates all of the taxonomic estimates into one table and sorts them with the best at the bottom (lowest RMS residual). I then manually calculated the averages and standard deviations of the best 10% (n=6) of the estimates.

Then

6. In your data file, [Insert / worksheet](#), click on the bottom tab and name it RatioSummary. Again, I have renamed my sheet RatioSummaryCopy so that you can see the final version and try the software without overwriting it.
7. Copy a ratio matrix (including pigment names, taxon names and ratios) from the Ratios sheet. Paste it into the RatioSummary sheet. While it is still highlighted, name it ([Insert /Name/ Define](#)) RatioMatrix.
8. Make sure the data workbook is active (click on any cell) so that the macro knows which book you want to operate upon.
9. Type Shift-Ctrl-Z, or use [Tools / Macro / Macros/ SummarizeOutputRatios](#). It asks for the first and last output numbers. For my sheet, just type 17 and 20 respectively
10. The macro collates all of the output pigment ratios into one table.
11. Type Shift-Ctrl-N, or use [Tools / Macro / Macros/ NormaliseRatios](#). This normalizes ratios to chl_a = 1 for each taxon. The chl_a column must be named "chl_a" exactly in the ratio matrices.
12. I then manually (sorry) sorted the table by decreasing Residual RMS (Select the entire lower table and use [Data/ Sort](#) by decreasing RMS). Then I plotted the pigment:chl_a ratios for each taxon vs RMS. These are in the sheets called something like "Ratios Dinos 17-20". Normally you will find that as the RMS decreases, so does the scatter in the output ratios. (This gave me some confidence that Chemtax is actually working properly!)

Important:

Sometimes these ratio graphs look awful ! We have identified a problem we call "flip-flopping" where ratios alternate between values. There is an example in the sheet RatiosDiatomsPseudoN17-20, where the fucoxanthin values for Diatoms and Pseudonitzschia (i.e. diatoms containing Chl c3) alternate. This is also seen in the taxonomic interpretations, particularly with Haptophyte categories. See the Summary17_20 sheet, with the Hapto6's and 8's swapping. This is because the process of randomizing the input ratios (producing the 60 starting ratio matrices) allows the starting values for different taxa to cross each other. In effect, the starting ratios for Hapto6 look more like a real Hapto8 than the Hapto8 category does. So CHEMTAX optimises the ratios, but what it thinks was a Hapto6 is what you had called Hapto8. So it's really important to check the output ratios and see that they correspond to the categories you had intended.

Using your own data

Some of the Chemtax routines require the data to be formatted in particular ways. Rather than setting up your own data sheets, it's safer to paste your data into the example worksheet.

With my macros, there may be some issues with duplicate names, like RatioMatrix, if you leave the old worksheets there. I'm afraid it will take some messing around and some familiarity with Excel. In particular, be aware that you can use [Insert /Name / Define](#) to show you a list of the defined names in a worksheet and to what they refer. In this table you can add, delete or redefine names.

Keep the original file as a backup and paste back into it.

GOOD LUCK !

Simon Wright

20 June 2006

References

- Jeffrey, S. W., Wright S.W. (1994) Photosynthetic pigments in the Haptophyta, *in* The Haptophyte Algae (ed. J. C. Green and B. S. C. Leadbeater), Clarendon Press, Oxford, pp. 111-132.
- Mackey, M. D., Mackey, D. J., Higgins, H. W., Wright, S. W. (1996) CHEMTAX- A program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton pigments. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 144, 265-283.
- Wright, S.W., Jeffrey, S.W. (2006) Pigment markers for phytoplankton production In: *Marine Organic Matter: Biomarkers, isotopes and DNA* (J.K.Volkman, ed.), Springer-Verlag, Berlin, ISBN-10-3-540-28401-X, pp. 71–104.
- Zapata M., Jeffrey S.W., Wright S.W., Rodríguez F., Clementson L., Garrido J.L. (2004) Photosynthetic pigments in 37 species (65 Strains) of Haptophyta: implications for phylogeny and oceanography. *Mar Ecol Prog Ser.* 270: 83-102.

III.- Quelques notes et échanges par email sur les problèmes d'utilisation

Some important information:

Some users have encountered the following error when trying to use CHEMTAX for the first time:

"Component 'comdlg32.ocx' or one of its dependencies not correctly registered: a file is missing or invalid"

The file is a Windows component that is needed for running VisualBasic files, but is missing from some installations. Users had success after downloading the file from this site:

<http://windowsxp.mvps.org/comdlg32.htm>.

For a Windows 7 64-bit computer, use the instructions on this site:

<http://devonenote.com/2010/02/register-comdlg32-ocx-on-x64-win7/>

More info.....

I recently had a question about using randomised starting ratios, because apparently the notes with the package are a bit unclear. Here's some more detail. Read the other stuff first. This gives instructions and example of how to set up the multiple matrices. I've attached an example file RandomisingCHEMTAX.xls.

I normally make a LiveRatios sheet with the formulae to add random noise to the pigment ratios as a basis for multiple CHEMTAX runs. This is to maximise the chance of finding the best global solution instead of getting trapped in local optima.

I normally only make 1 or 2 matrices (for different scenarios) then copy them multiple times onto the Ratios sheet, using Paste.Special (Values only). This way the Ratios sheet isn't recalculated every time excel does an operation, which slows it down a lot. I just keep the 1 or 2 ratios in the LiveRatios sheet active so that it's easy to produce new scenarios without having to re-type the formulae.

You will note that the LiveRatios matrix contains a formula to make the appropriate "Rat02" name for each matrix. That depends on the number of rows in the matrix and its starting position, so you will have to alter that if you change the setup. Rat01 has the starting values, Rat02 has live formulae.

So I would copy the Rat01 and 02 matrices from the LiveRatios page to the Ratios page. Then copy the Rat02 matrix (whole rows) including the blank row above it (=15 rows, in this case), and select a multiple of 15 rows (say 20*15 = 300) and paste. Select the lot and copy, paste.special(values) to prevent the formulae from recalculating. Note also that the live formulae contains a factor 0.7 which is the degree of random noise added to the ratios (+/- 35%, in this case). You can change that if you have more info about local info, but remember that it is additive to the ratio limits variation.

You will note also the backup configuration page. I keep this for when I am depth-binning the samples. Then I just copy a configuration from here to the Configuration page for each run.

My recent paper in Deep Sea Research has some discussion of using CHEMTAX for discriminating populations.

Wright, SW, van den Enden, RL, Pearce, I, Davidson, AT, Scott FJ, Westwood, KJ (2010). Phytoplankton community structure and stocks in the Southern Ocean (30 - 80°E) determined by CHEMTAX analysis of HPLC pigment signatures. Deep-Sea Research II 57, 758-778

Our chapter in the latest pigment book gives a more detailed explanation on how to interpret pigment data and it summarises ratios across all taxa from the literature. The book itself is great, and essential reading for those working on pigments.

Higgins H.W., Wright S. W., Schlüter L. (2011). Quantitative Interpretation of Chemotaxonomic Pigment Data, Chapter 6, Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography, Suzanne Roy, Einar Skarstad Egeland, Geir Johnsen and Carole Anne Llewellyn (eds.) Cambridge University Press.

I've also included the manual for V1 of the software (which you may already have). It has an explanation of how the software works and the algorithms behind it. However it covers the MATLAB version, in which you have to run PREPRO and MATLAB to process your data. In V1.95, the program is standalone but reads an Excel file. If you have any problems running the program, please get back to me.

Let me know if you have any problems.

Good luck with your project!

Best wishes

Simon

Dr Simon Wright
Principal Research Scientist
Marine Microbial Ecology Group
Australian Antarctic Division
and
Antarctic Climate and Ecosystems Cooperative Research Centre
203 Channel Hwy Kingston, Tas 7050 Australia
Phone: +61 3 6232 3338
Fax: +61 3 6232 3449
Email: Simon.Wright@aad.gov.au

Web Sites:

AAD home: <http://www.aad.gov.au>

ACE-CRC: <http://www.acecra.org.au/>

Marine Microbial Ecology: <http://www.aad.gov.au/default.asp?casid=3380>

IV.- Script « cours CHEMOTX2014.r »

```

#*****
#
#           COURS INITIATION A LA CHEMOTAXONOMIE
#
#*****

# Creation : Luis Lampert
# Data : 19/02/2014
# Dernière modification :

# Ci dessous une serie de commandes en relation avec le cours d'initiation
a la chemotaxonomie

#*****
# 1.- INITIALISATIONS
#*****

      fich1="pcaf2000.txt"      # fichier avec pigments et positions
stations
      fich2="carteAtlantique.txt" # fichier avec fond de carte

# Librairies a charger et sources
library(gclus)
source("hcoplot.R")

#*****
# 2.- IMPORTATION DE DONNEES
#*****

data0= read.table(fich1, header=T)
head(data0)
dim(data0)

# On prends la matrice de pigments complete
pig=data0[,4:18]
row.names(pig)=data0[,1]
head(pig)

# On prends la matrice de pigments reduite
spe=pig[,c(3,5,6,9,10,11,15)]
head(spe)

# On charge la matrice avec les positions geo des stations
spa=data0[,2:3]
head(spa)

# On charge le fond de carte de l'Atlantique
fra=read.table(fich2)
head(fra)

#*****
# 3.- EXPLORATION DE DONNEES
#*****

```

```

#-----
# 3.1 Carte de position des stations
#-----
windows(title="Position stations")
# Carte des stations
plot(spa, asp=1, type="p", xlim=c(-5,-1), ylim=c(43,48), main="Stations
PCAF2000", cex=0.6, pch=16, xlab="Longitude", ylab="Latitude")
# Ajoute le nom des stations
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.7, col="red")
# Ajoute la carte de la facade Atlantique
lines(fra, col="blue")

#-----
# 3.2 Compare sites : richesse pigmentaire
#-----
# Calcule le nombre de pigments par station
# Somme par ligne, le 2eme argument de apply(), MARGIN, doit = 1
sit.pres = apply(pig > 0, 1, sum)
# Tri incrementiel
sort(sit.pres)
windows(title="Richesse pigmentaire", 10, 5)
par(mfrow=c(1,2)) # Divise la fenetre horizontalement
# Plot richesse pigmts vs. position des stations
plot(sit.pres, type="s", las=1, col="gray",
      main="Richesse pigmentaire vs. \n N° station",
      xlab="N° station", ylab="Richesse pigmentaire")
text(sit.pres, row.names(pig), cex=.8, col="red")
# Utilise les coordonnées geo pour faire un "bubble map"
plot(spa, asp=1.5, main="Carte de richesse pigmentaire", pch=21,
      col="white",
      bg="grey", cex=5*sit.pres/max(sit.pres), xlab="Longitude",
      ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")

#-----
# 3.3 Carte des pigments biomarqueurs
#-----
# initialisations
dataC1=spe[,1]
dataC2=spe[,2]
dataC3=spe[,3]
dataC4=spe[,4]
dataC5=spe[,5]
dataC6=spe[,6]
dataC7=spe[,7]
dataC8=spe[,8]
dataC9=spe[,9]

windows(title="Distribution pigments biomarqueur", 9, 9) # Nouvelle fenetre
(taille 9x9 inches)
par(mfrow=c(3,3)) # Divise la fenetre en 3x3

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC1/range(dataC1)[2],
      main=colnames(spe)[[1]], xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=10*dataC2/range(dataC2)[2],
      main=colnames(spe)[[2]], xlab="Longitude", ylab="Latitude")

```



```

lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC3/range(dataC3)[2],
main=colnames(spe)[[3]], xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC4/range(dataC4)[2],
main=colnames(spe)[[4]], xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC5/range(dataC5)[2],
main=colnames(spe)[[5]], xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC6/range(dataC6)[2],
main=colnames(spe)[[6]], xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC7/range(dataC7)[2],
main=colnames(spe)[[7]], xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

#plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC8/range(dataC8)[2],
main=colnames(spe)[[8]], xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

#plot(spa, asp=1.5, col="red", cex=5*dataC9/range(dataC9)[2],
main=colnames(spe)[[9]], xlab="Longitude", ylab="Latitude")
lines(fra, col="blue")
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.3, col="black")

#-----
# 3.4 Coef de correlation (r) entre pigments
#-----

# OBJET : Permet de voir quels sont les pigments qui ont de bonnes
correlations entre eux dans une matrice pigmentaire (pigments en colonne et
stations en ligne). On utilise une matrice de correlation (r de pearson en
"mode R").

# Matrice de correlations
data1=round(cor(spe),2)
data1
# pour mieux visualiser la matrice de correlations
data1.D=as.dist(data1)
data1.D

#*****
# 4.- REGRESSIONS MULTIPLES (RLM)
#*****
# Realisation de la regression

```

```

reg=lm(chl_a ~ peri+fuco+HF+allo+zea+chlb, data=spe)
#reg=lm(chl_a ~ -1+peri+fuco+HF+allo+zea+chlb, data=spe) # sans Cte
summary(reg)

#*****
# 5.- CLUSTER ANALYSIS
#*****
# Groupements hierarchiques (en francais).
# Voir documents :
# => Numerical Ecology (Legendre et Legendre, 1998)
# => Numerical Ecology with R (Borcard et al, 2011)

#-----
# 5.1. Discrimination des stations en fonction des pigments
#-----

# Clusters en utilisant une distance euclidienne D1
#-----
data2.D=dist(spe, method="eucl")
data2.cl=hclust(data2.D, method="complete")
plot(data2.cl, main="Cluster avec distance euclidienne D1")
hcoplot(data2.cl, data2.D, k=2)

# Carte geo avec les groupes obtenus par clusters
#-----
# Plot des clusters sur la carte en fonction du partage des branches
data2.g=cutree(data2.cl,2) # choix du nombre de branches a garder

# Coordonnes geo x et y de la matrice spa
plot(spa, asp=1, type="n", xlim=c(-5,-1), ylim=c(43,48), main="Selon
clusters dist=D1",
      xlab="Longitude", ylab="Latitude")
# Ajoute labels
text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.7, col="red")
# Ajoute carte ouest France
lines(fra, col="blue")
# Ajouter les groupes
grw=data2.g
k=length(levels(factor(grw)))
for (i in 1:k) {
  points(spa[grw==i,1], spa[grw==i, 2], pch=i+20,cex=2,col=i+1,bg=i+1)
}
#text(spa, row.names(spa), cex=0.4, col="black", font=2)
legend("bottomleft", paste("Group",1:k), pch=(1:k)+20, col=2:(k+1),
pt.bg=2:(k+1), pt.cex=2, bty="n")

# Pour recuperer les matrices de donnees separees par les clusters
#-----
spe.cl1=subset(spe,grw==1)
spe.cl2=subset(spe,grw==2)

#***** O P T I O N
#*****

# 5.2. En utilisant une distance Manhattan (ou taxicab ou city-block D7)
#-----

```



```

data3.D=dist(spe, method="manhattan")
data3.cl=hclust(data3.D, method="average")
plot(data3.cl, main="Cluster avec distance Manhattan D7")
hcoplot( data3.cl, data3.D, k=2)

# Carte geo avec les groupes obtenus par clusters
#-----
# Plot des clusters sur la carte en fonction du partage des branches
data3.g=cutree(data3.cl,2) # choix du nombre de branches a garder

# Geographic coordinates x and y from the spa data frame
plot(spa, asp=1, type="n", xlim=c(-5,-1), ylim=c(43,48), main="Selon
clusters dist=D7 (Manhattan)",
      xlab="Longitude", ylab="Latitude")
# Add site labels
#text(spa, row.names(spa), pos=2, cex=0.7, col="red")
# Add France map west
lines(fra, col="blue")
# Ajouter les groupes
grw=data3.g
k=length(levels(factor(grw)))
for (i in 1:k) {
  points(spa[grw==i,1], spa[grw==i, 2], pch=i+20,cex=3,col=i+1,bg=i+1)
  }
  text(spa, row.names(spa), cex=0.8, col="white", font=2)
  legend("bottomleft", paste("Group",1:k), pch=(1:k)+20,
col=2:(k+1), pt.bg=2:(k+1), pt.cex=2, bty="n")

#***** F I N   O P T I O N   *****

#*****
#
#           F I N
#*****

```

V.- Script « hcoplot.R »

```

# Function hcoplot()
# Reorder and plot dendrogram with colors for groups and legend
#
# Usage:
# hcoplot(tree = hclust.object, diss = dissimilarity.matrix, k =
nb.clusters,
#       title = paste("Reordered dendrogram from" ,deparse (tree$call),
sep="\n"))
#
# License: GPL-2
# Author: Francois Gillet, September 2007

'hcoplot' <- function(tree, diss, k, title=paste("Reordered dendrogram
from",deparse(tree$call),sep="\n"))
{
  require(gclus)
  gr <- cutree(tree, k=k)
  tor <- reorder.hclust(tree, diss)
  plot(tor, hang=-1, xlab=paste(length(gr),"sites"),
sub=paste(k,"groups"), main=title)
  so <- gr[tor$order]
  gro <- numeric(k)
  for (i in 1:k) {
    gro[i] <- so[1]
    if (i<k) so = so[so!=gro[i]]
  }
  rect.hclust(tor, k=k, border=gro+1, cluster=gr)
  legend("topright", paste("Group",1:k), pch=22, col=2:(k+1), bty="n")
}

```

Dans : Borcard, Daniel, François Guillet, et Pierre Legendre. 2011. *Numerical Ecology with R*. Use R! Springer.

VI.- Bibliographie chémotaxonomique de base

- Abaychi, J.K., et J.P. Riley. 1979. « The determination of phytoplankton pigments by high-performance liquid chromatography ». *Analytica Chimica Acta* 107: 1-11. doi:10.1016/S0003-2670(01)93190-3.
- Andersen, R. A., R. R. Bidigare, M. D. Keller, et M. Latasa. 1996. « A comparison of HPLC pigment signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the North Atlantic and Pacific Oceans ». *Deep-sea research. Part 2. Topical studies in oceanography* 43 (2-3): 517-537.
- Andersson, A., P. Haecky, et Å Hagström. 1994. « Effect of Temperature and Light on the Growth of Micro- Nano- and Pico-Plankton: Impact on Algal Succession ». *Marine Biology* 120 (4): 511-520. doi:10.1007/BF00350071.
- Anotegui, A., J.M. Trigueros, et E. Orive. 2001. « The Use of Pigment Signatures to Assess Phytoplankton Assemblage Structure in Estuarine Waters ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 52 (6): 689-703. doi:10.1006/ecss.2001.0785.
- Antajan, E., M.-J. Chrétiennot-Dinet, C. Leblanc, M.-H. Daro, et C. Lancelot. 2004. « 19'-hexanoyloxyfucoxanthin may not be the appropriate pigment to trace occurrence and fate of Phaeocystis: the case of *P. globosa* in Belgian coastal waters ». *Journal of Sea Research* 52 (3): 165-177. doi:10.1016/j.seares.2004.02.003.
- Barlow, R.G., P.H. Burkill, et R.F.C. Mantoura. 1988. « Grazing and degradation of algal pigments by marine protozoan *Oxyrrhis marina* ». *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 119 (2): 119-129. doi:10.1016/0022-0981(88)90227-4.
- Barlow, R.G., R.F.C. Mantoura, et D.G. Cummings. 1998. « Phytoplankton pigment distributions and associated fluxes in the Bellingshausen Sea during the austral spring 1992 ». *Journal of Marine Systems* 17 (1-4): 97-113. doi:10.1016/S0924-7963(98)00032-3.
- Barlow, R.G. 1999. « Monsoonal influence on the distribution of phytoplankton pigments in the Arabian Sea ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 46 (3-4): 677-699. doi:10.1016/S0967-0645(98)00123-4.
- Barlow, R.G., R.F.C. Mantoura, D.G. Cummings, D.W. Pond, et R.P. Harris. 1998. « Evolution of Phytoplankton Pigments in Mesocosm Experiments ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 46 (2): 15-22. doi:10.1006/ecss.1998.0331.
- Barlow, R.G., R.F.C. Mantoura, M.A. Gough, et T.W. Fileman. 1993. « Pigment signatures of the phytoplankton composition in the northeastern Atlantic during the 1990 spring bloom ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 40 (1-2): 459-477. doi:10.1016/0967-0645(93)90027-K.
- Bidigare, R. R., J. Marra, T.D. Dickey, R. Iturriaga, Raymond C. Baker, Smith, et Hasong Pak. 1990. « Evidence for phytoplankton succession and chromatic adaptation in the Sargasso Sea during spring 1985' ». *Mar. Ecol. Prog. Ser* 60: 113-22.
- Bidigare, R. R., J. H. Morrow, et D. A. Kiefer. 1989. « Derivative analysis of spectral absorption by photosynthetic pigments in the western Sargasso Sea ». *Journal of Marine Research* 47 (2): 323-341. doi:10.1357/002224089785076325.
- Bidigare, Robert R., Tamara J. Frank, Colleen Zastrow, et James M. Brooks. 1986. « The distribution of algal chlorophylls and their degradation products in the Southern Ocean ». *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 33 (7): 923-937. doi:10.1016/0198-0149(86)90007-5.
- Bidigare, Robert R., R. C. Smith, K. S. Baker, et J. Marra. 1987a. « Oceanic Primary Production Estimates from Measurements of Spectral Irradiance and Pigment Concentrations ». *Global Biogeochemical Cycles* 1 (3): 171-86. doi:10.1029/GB001i003p00171.
- Breton, E., C. Brunet, B. Sautour, et J.-M. Brylinski. 2000. « Annual Variations of Phytoplankton Biomass in the Eastern English Channel: Comparison by Pigment Signatures and Microscopic Counts ». *Journal of Plankton Research* 22 (8): 1423-1440. doi:10.1093/plankt/22.8.1423.
- Buchaca, Teresa, Marisol Felip, et Jordi Catalan. 2005. « A Comparison of HPLC Pigment Analyses and Biovolume Estimates of Phytoplankton Groups in an Oligotrophic Lake ». *Journal of Plankton Research* 27 (1): 91-101. doi:10.1093/plankt/fbh154pap.

- Cailliau, C., H. Claustre, et S. Giannino. 1997. « Chemotaxonomic Analysis of Phytoplankton Distribution in the Indian Sector of the Southern Ocean during Late Austral Summer ». *Oceanologica Acta* 20 (5): 721-732.
- Carreto, J. I., N. G. Montoya, H. R. Benavides, R. Guerrero, et M. O. Carignan. 2003. « Characterization of Spring Phytoplankton Communities in the Río de La Plata Maritime Front Using Pigment Signatures and Cell Microscopy ». *Marine Biology* 143 (5): 1013-1027. doi:10.1007/s00227-003-1147-z.
- Carreto, José I., Nora Montoya, Rut Akselman, Mario O. Carignan, Ricardo I. Silva, et Daniel A. Cucchi Colleoni. 2008. « Algal pigment patterns and phytoplankton assemblages in different water masses of the Río de la Plata maritime front ». *Continental Shelf Research* 28 (13): 1589-1606. doi:10.1016/j.csr.2007.02.012.
- Claustre, H. 1994. « The trophic status of various oceanic provinces as revealed by phytoplankton pigment signatures ». *Limnology and Oceanography* 39 (5): 1206-1210.
- Claustre, Hervé, Stanford B Hooker, Laurie Van Heukelem, Jean-François Berthon, Ray Barlow, Joséphine Ras, Heather Sessions, et al. 2004. « An intercomparison of HPLC phytoplankton pigment methods using in situ samples: application to remote sensing and database activities ». *Marine Chemistry* 85 (1-2): 41-61. doi:10.1016/j.marchem.2003.09.002.
- Claustre, Hervé, Philippe Kerhervé, Jean Claude Marty, Louis Prieur, Christianne Videau, et Jean-Henri Hecq. 1994. « Phytoplankton dynamics associated with a geostrophic front: Ecological and biogeochemical implications ». *Journal of Marine Research* 52 (4): 711-742. doi:10.1357/0022240943077000.
- Claustre, Hervé, et Jean-Claude Marty. 1995a. « Specific phytoplankton biomasses and their relation to primary production in the tropical North Atlantic ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 42 (8): 1475-1493. doi:10.1016/0967-0637(95)00053-9.
- Claustre, Hervé. 1995b. « Specific phytoplankton biomasses and their relation to primary production in the tropical North Atlantic ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 42 (8): 1475-1493. doi:10.1016/0967-0637(95)00053-9.
- Descy, Jean-Pierre, Hugo Sarmento, et Harry W. Higgins. 2009. « Variability of phytoplankton pigment ratios across aquatic environments ». *European Journal of Phycology* 44 (3): 319-330. doi:10.1080/09670260802618942.
- DiTullio, G. R., N. Garcia, S. F. Riseman, et P. N. Sedwick. 2007. « Effects of iron concentration on pigment composition in *Phaeocystis antarctica* grown at low irradiance ». In *Phaeocystis, major link in the biogeochemical cycling of climate-relevant elements*, édité par M. A. van Leeuwe, J. Stefels, S. Belviso, C. Lancelot, P. G. Verity, et W. W. C. Gieskes, 71-81. Springer Netherlands. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6214-8_7.
- Egeland, Einar Skarstad, Robert R.L. Guillard, et Synnøve Liaaen-Jensen. 1997. « Additional carotenoid prototype representatives and a general chemosystematic evaluation of carotenoids in prasinophyceae (chlorophyta) ». *Phytochemistry* 44 (6): 1087-1097. doi:10.1016/S0031-9422(96)00650-4.
- Eker-Develi, Elif, Jean-François Berthon, Elisabetta Canuti, Natalya Slabakova, Snejana Moncheva, Galina Shtereva, et Boryana Dzhurova. 2012. « Phytoplankton taxonomy based on CHEMTAX and microscopy in the northwestern Black Sea ». *Journal of Marine Systems* 94: 18-32. doi:10.1016/j.jmarsys.2011.10.005.
- Everitt, D.A., S.W. Wright, J.K. Volkman, D.P. Thomas, et E.J. Lindstrom. 1990. « Phytoplankton community compositions in the western equatorial Pacific determined from chlorophyll and carotenoid pigment distributions ». *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 37 (6): 975-997. doi:10.1016/0198-0149(90)90106-6.
- Gameiro, C., P. Cartaxana, et V. Brotas. 2007. « Environmental drivers of phytoplankton distribution and composition in Tagus Estuary, Portugal ». *Estuarine, coastal and shelf science* 75 (1-2): 21-34.
- Garibotti, Irene A., Mara Vernet, Wendy A. Kozlowski, et Martha E. Ferrario. 2003. « Composition and biomass of phytoplankton assemblages in coastal Antarctic waters: a comparison of chemotaxonomic and microscopic analyses ». *Marine Ecology Progress Series* 247: 27-42. doi:10.3354/meps247027.
- Garrido, José L., Jorge Otero, Miguel A. Maestro, et Manuel Zapata. 2000. « THE MAIN NONPOLAR CHLOROPHYLL c FROM EMILIANIA HUXLEYI (PRYMNESIOPHYCEAE) IS A CHLOROPHYLL c 2-MONOGLACTOSYLDIACYLGLYCERIDE ESTER: A MASS SPECTROMETRY STUDY ». *Journal of Phycology* 36 (3): 497-505. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99135.x.
- Gibb, Stuart W, Denise G Cummings, Xabier Irigoien, Ray G Barlow, R Fauzi, et C Mantoura. 2001. « Phytoplankton pigment chemotaxonomy of the northeastern Atlantic ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 48 (4-5): 795-823. doi:10.1016/S0967-0645(00)00098-9.

- Gibberd, Michael-John, Erika Kean, Ray Barlow, Sandy Thomalla, et Michael Lucas. 2013. « Phytoplankton chemotaxonomy in the Atlantic sector of the Southern Ocean during late summer 2009 ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 78: 70-78. doi:10.1016/j.dsr.2013.04.007.
- Gieskes, W. W. C., et G. W. Kraay. 1983. « Dominance of Cryptophyceae during the Phytoplankton Spring Bloom in the Central North Sea Detected by HPLC Analysis of Pigments ». *Marine Biology* 75 (2-3): 179-185. doi:10.1007/BF00406000.
- Gieskes, W. W., et G. W. Kraay. 1986. « Floristic and Physiological Differences between the Shallow and the Deep Nanophytoplankton Community in the Euphotic Zone of the Open Tropical Atlantic Revealed by HPLC Analysis of Pigments ». *Marine Biology* 91 (4): 567-576. doi:10.1007/BF00392609.
- Gieskes, W.W.C., G.W. Kraay, A. Nontji, D. Setiapermana, et Sutomo. 1988. « Monsoonal alternation of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of the euphotic zone of the banda sea (Indonesia): a mathematical analysis of algal pigment fingerprints ». *Netherlands Journal of Sea Research* 22 (2): 123-137. doi:10.1016/0077-7579(88)90016-6.
- Guisande, Castor, Aldo Barreiro, Alberto Acuña, Lili J. Marciales, Esnedy Hernandez, Angélica M. Torres, Nelson Aranguren, Willian López, Santiago R. Duque, et Lina J. Gallo. 2008. « Testing of the CHEMTAX program in contrasting Neotropical lakes, lagoons and swamps ». *Limnology and Oceanography: Methods* 6: 643-652. doi:10.4319/lom.2008.6.643.
- Hashihama, Fuminori, Toru Hirawake, Sakae Kudoh, Jota Kanda, Ken Furuya, Yukuya Yamaguchi, et Takashi Ishimaru. 2008. « Size fraction and class composition of phytoplankton in the Antarctic marginal ice zone along the 140°E meridian during February–March 2003 ». *Polar Science* 2 (2): 109-120. doi:10.1016/j.polar.2008.05.001.
- Havskum, Harry, Louise Schlüter, Renate Scharek, Elisa Berdalet, et Stphan Jacquet. 2004. « Routine quantification of phytoplankton groups: microscopy or pigment analyses? ». *Marine Ecology Progress Series* 273: 31-42. doi:10.3354/meps273031.
- Head, E.J.H., et E.P.W. Horne. 1993. « Pigment transformation and vertical flux in an area of convergence in the North Atlantic ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 40 (1-2): 329-346. doi:10.1016/0967-0645(93)90020-N.
- Henriksen, Peter, Bo Riemann, Hanne Kaas, Helene Munk Sørensen, et Henriette Lang Sørensen. 2002. « Effects of Nutrient-Limitation and Irradiance on Marine Phytoplankton Pigments ». *Journal of Plankton Research* 24 (9): 835-858. doi:10.1093/plankt/24.9.835.
- Higgins, H.W., et D.J Mackey. 2000. « Algal class abundances, estimated from chlorophyll and carotenoid pigments, in the western Equatorial Pacific under El Niño and non-El Niño conditions ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 47 (8): 1461-1483. doi:10.1016/S0967-0637(99)00114-4.
- Higgins, Harry W., Simon W. Wright, et Louise Schlüter. 2011. « Quantitative Interpretation of Chemotaxonomic Pigment Data ». In *Phytoplankton Pigments: Characterization and Applications in Oceanography*, Cambridge University Press. Suzanne Roy, Carole Llewellyn, Einar Skarstad Egeland and Geir Johansen.
- Hirata, T., N. J. Hardman-Mountford, R. J. W. Brewin, J. Aiken, R. Barlow, K. Suzuki, T. Isada, et al. 2011. « Synoptic relationships between surface Chlorophyll-a and diagnostic pigments specific to phytoplankton functional types ». *Biogeosciences* 8 (2): 311-327. doi:10.5194/bg-8-311-2011.
- Irigoien, X., Bettina Meyer, R. Harris, et D. Harbour. 2004. « Using HPLC pigment analysis to investigate phytoplankton taxonomy: the importance of knowing your species ». *Helgoland Marine Research*,. 58: 77-82.
- Irigoien, Xabier, Roger P. Harris, Robert N. Head, et Derek Harbour. 2000. « North Atlantic Oscillation and Spring Bloom Phytoplankton Composition in the English Channel ». *Journal of Plankton Research* 22 (12): 2367-2371. doi:10.1093/plankt/22.12.2367.
- Irigoien, Xabier, Jef Huisman, et Roger P. Harris. 2004. « Global Biodiversity Patterns of Marine Phytoplankton and Zooplankton ». *Nature* 429 (6994): 863-867. doi:10.1038/nature02593.
- Jeffrey, S. W. 1961. « Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae ». *Biochemical Journal* 80 (2): 336-342.
- Jeffrey, S. W. 1968. « Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 162 (2): 271-285. doi:10.1016/0005-2728(68)90109-6.

- Jeffrey, S. W., R. F. C. Mantoura, S. W. Wright, International Council of Scientific Unions Scientific Committee on Oceanic Research, et Unesco. 1997. *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. UNESCO Publishing.
- Jeffrey, S. W., et Jan M. Anderson. 2000. « *Emiliana Huxleyi* (haptophyta) Holds Promising Insights for Photosynthesis ». *Journal of Phycology* 36 (3): 449-52. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.00ag3.x.
- Kana, Todd M., et Patricia M. Glibert. 1987. « Effect of irradiances up to 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on marine *Synechococcus* WH7803—I. Growth, pigmentation, and cell composition ». *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 34 (4): 479-495. doi:10.1016/0198-0149(87)90001-X.
- Kozłowski, Wendy A. 2008. « PIGMENT DERIVED PHYTOPLANKTON COMPOSITION ALONG THE WESTERN ANTARCTIC PENINSULA ». Master Sciences, San Diego (USA): San Diego (USA).
- Kozłowski, Wendy A., Douglas Deutschman, Irene Garibotti, Charles Trees, et Maria Vernet. 2011. « An evaluation of the application of CHEMTAX to Antarctic coastal pigment data ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 58 (4): 350-364. doi:10.1016/j.dsr.2011.01.008.
- Lambert, Corey D, Thomas S Bianchi, et Peter H Santschi. 1999. « Cross-shelf changes in phytoplankton community composition in the Gulf of Mexico (Texas shelf/slope): the use of plant pigments as biomarkers ». *Continental Shelf Research* 19 (1): 1-21. doi:10.1016/S0278-4343(98)00075-2.
- Lampert, Luis. 2001. « Dynamique saisonnière et variabilité pigmentaire des populations phytoplanctoniques dans l'atlantique nord (Golfe de Gascogne) ». Thèse de 3eme cycle, Brest, France: Université de Bretagne Occidentale.
- Lampert, L., B. Quéguiner, T. Labasque, A. Pichon, et N. Lebreton. 2002. « Spatial variability of phytoplankton composition and biomass on the eastern continental shelf of the Bay of Biscay (north-east Atlantic Ocean). Evidence for a bloom of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) in spring 1998 ». *Continental Shelf Research* 22 (8): 1225-1247. doi:10.1016/S0278-4343(01)00103-0.
- Landry, M. R., M. E. Ondrusek, S. J. Tanner, S. L. Brown, J. Constantinou, R. R. Bidigare, K. H. Coale, et S. Fitzwater. 2000. « Biological response to iron fertilization in the eastern equatorial Pacific (IronEx II). I. Microplankton community abundances and biomass ». *Marine Ecology Progress Series* 201: 27-42. doi:10.3354/meps201027.
- Latasa, M., R. Scharek, F. Le Gall, et Laure Guillou. 2004. « Pigment suites and taxonomic groups in Prasinophyceae ». *Pas publié à ma connaissance ? (?) : ?*
- Latasa, Mikel. 1995. « Pigment composition of *Heterocapsa* sp. and *Thalassiosira weissflogii* in batch cultures under different irradiances ». *Scientia Marina* 59 (1): 25-37.
- Latasa, Mikel, et Robert R. Bidigare. 1998. « A comparison of phytoplankton populations of the Arabian Sea during the Spring Intermonsoon and Southwest Monsoon of 1995 as described by HPLC-analyzed pigments ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 45 (10–11): 2133-2170. doi:10.1016/S0967-0645(98)00066-6.
- Latasa, Mikel, Renate Scharek, Montserrat Vidal, Gemma VilaReixach, Andrs GutierrezRodríguez, Mikhail Emelianov, et Josep M. Gasol. 2010. « Preferences of phytoplankton groups for waters of different trophic status in the northwestern Mediterranean Sea ». *Marine Ecology Progress Series* 407: 27-42. doi:10.3354/meps08559.
- Lauridsen, T. L., L. Schlüter, et L. S. Johansson. 2011. « Determining Algal Assemblages in Oligotrophic Lakes and Streams: Comparing Information from Newly Developed Pigment/chlorophyll a Ratios with Direct Microscopy ». *Freshwater Biology* 56 (8): 1638-51. doi:10.1111/j.1365-2427.2011.02588.x.
- Laza-Martinez, Aitor, Sergio Seoane, Manuel Zapata, et Emma Orive. 2007. « Phytoplankton Pigment Patterns in a Temperate Estuary: From Unialgal Cultures to Natural Assemblages ». *Journal of Plankton Research* 29 (11): 913-929. doi:10.1093/plankt/fbm069.
- Leblanc, K., J. Aristegui, L. Armand, P. Assmy, B. Beker, A. Bode, E. Breton, et al. 2012. « A global diatom database – abundance, biovolume and biomass in the world ocean ». *Earth System Science Data* 4 (1): 149-165. doi:10.5194/essd-4-149-2012.
- Lemaire, Emmanuelle, Gwenaël Abril, Rutger De Wit, et Henri Etcheber. 2002. « Distribution of Phytoplankton Pigments in Nine European Estuaries and Implications for an Estuarine Typology ». *Biogeochemistry* 59 (1-2): 5-23. doi:10.1023/A:1015572508179.

- Lewitus, Alan J., David L. White, Raphael G. Tymowski, Mark E. Geesey, Sabrina N. Hymel, et Peter A. Noble. 2005. « Adapting the CHEMTAX Method for Assessing Phytoplankton Taxonomic Composition in Southeastern U.S. Estuaries ». *Estuaries* 28 (1): 160-172. doi:10.1007/BF02732761.
- Llewellyn, Carole A., James R. Fishivick, et Jerry C. Blackford. 2005. « Phytoplankton Community Assemblage in the English Channel: A Comparison Using Chlorophyll a Derived from HPLC-CHEMTAX and Carbon Derived from Microscopy Cell Counts ». *Journal of Plankton Research* 27 (1): 103-119.
- Louda, J. William. 2007. « HPLC-Based Chemotaxonomy of Florida Bay Phytoplankton: Difficulties in Coastal Environments ». *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 31 (3): 295-323. doi:10.1080/10826070701780599.
- Mackey, D.J., H.W. Higgins, M.D. Mackey, et D. Holdsworth. 1998. « Algal class abundances in the western equatorial Pacific: Estimation from HPLC measurements of chloroplast pigments using CHEMTAX ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 45 (9): 1441-1468. doi:10.1016/S0967-0637(98)00025-9.
- Mackey, M.D., H.W. Higgins, D.J. Mackey, et S.W. Wright. 1997. « CHEMTAX user's manual: a program for estimating class abundances from chemical markers — application to HPLC measurements of phytoplankton pigments ». Scientifique et technique Report 229. Australia: CSIRO.
- Matsumoto, Takuya, Masanobu Kawachi, Hideaki Miyashita, et Yuji Inagaki. 2012. « Prasinolanthin Is Absent in the Green-Colored Dinoflagellate *Lepidodinium Chlorophorum* Strain NIES-1868: Pigment Composition and 18S rRNA Phylogeny ». *Journal of Plant Research* 125 (6): 705-711. doi:10.1007/s10265-012-0486-6.
- Méjanelle, L., J. Laureillard, J. Fillaux, A. Saliot, et C. Lambert. 1995. « Winter distribution of algal pigments in small- and large-size particles in the northeastern Atlantic ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 42 (1): 117-133. doi:10.1016/0967-0637(94)00036-R.
- Mendes, Carlos Rafael Borges, Márcio Silva de Souza, Virginia Maria Tavano Garcia, Miguel Costa Leal, Vanda Brotas, et Carlos Alberto Eiras Garcia. 2012. « Dynamics of phytoplankton communities during late summer around the tip of the Antarctic Peninsula ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 65: 1-14. doi:10.1016/j.dsr.2012.03.002.
- Mendes, Carlos Rafael, Carolina Sá, João Vitorino, Carlos Borges, Virginia Maria Tavano Garcia, et Vanda Brotas. 2011. « Spatial distribution of phytoplankton assemblages in the Nazaré submarine canyon region (Portugal): HPLC-CHEMTAX approach ». *Journal of Marine Systems* 87 (1): 90-101. doi:10.1016/j.jmarsys.2011.03.005.
- Minaudo, C., F. Moatar, M. Meybeck, F. Curie, N. Gassama, et M. Leita. 2013. « Loire River eutrophication mitigation (1981–2011) measured by seasonal nutrients and algal pigments ». *Understanding Freshwater Quality Problems in a Changing World Proceedings of H04, IAHS-IAPSO-IASPEI Assembly, Gothenburg, Sweden, July 2013 (IAHS Publ. 361, 2013)*. 1-8.
- Muyllaert, Koenraad, Rhia Gonzales, Melanie Franck, Marie Lionard, Claar Van der Zee, André Cattrijsse, Koen Sabbe, Lei Chou, et Wim Vyverman. 2006. « Spatial variation in phytoplankton dynamics in the Belgian coastal zone of the North Sea studied by microscopy, HPLC-CHEMTAX and underway fluorescence recordings ». *Journal of Sea Research* 55 (4): 253-265. doi:10.1016/j.seares.2005.12.002.
- Not, Fabrice, Mikel Latasa, Dominique Marie, Thierry Cariou, Daniel Vaultot, et Nathalie Simon. 2004. « A Single Species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), Dominates the Eukaryotic Picoplankton in the Western English Channel ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (7): 4064-4072. doi:10.1128/AEM.70.7.4064-4072.2004.
- Not, Fabrice, Mikel Latasa, Renate Scharek, Manon Viprey, Pierre Karleskind, Vanessa Balague, Imelda Ontoria-Oviedo, et al. 2008. « Protistan Assemblages across the Indian Ocean, with a Specific Emphasis on the Picoeukaryotes ». *Deep-Sea Research. Part 1. Oceanographic Research Papers* 55 (11): 1456-1473.
- Not, Fabrice, Manuel Zapata, Yolanda Pazos, Emilia Campaa, Marylo Doval, et Francisco Rodriguez. 2007. « Size-fractionated phytoplankton diversity in the NW Iberian coast: a combination of microscopic, pigment and molecular analyses ». *Aquatic Microbial Ecology* 49 (3): 255-265. doi:10.3354/ame01144.
- Olson, Robert J., Sallie W. Chisholm, Erik R. Zettler, Mark A. Altabet, et Jeffrey A. Dusenberry. 1990. « Spatial and temporal distributions of prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean ». *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 37 (6): 1033-1051. doi:10.1016/0198-0149(90)90109-9.
- Pan, Xiaoju, Antonio Mannino, Harold G. Marshall, Katherine C. Filippino, et Margaret R. Mulholland. 2011. « Remote Sensing of Phytoplankton Community Composition along the Northeast Coast of the United States ». *Remote Sensing of Environment* 115 (12): 3731-3747. doi:10.1016/j.rse.2011.09.011.

- Pan, Xiaojun, Antonio Mannino, Mary E. Russ, Stanford B. Hooker, et Lawrence W. Harding Jr. 2010. « Remote sensing of phytoplankton pigment distribution in the United States northeast coast ». *Remote Sensing of Environment* 114 (11): 2403-2416. doi:10.1016/j.rse.2010.05.015.
- Peeken, Ilka. 1997. « Photosynthetic pigment fingerprints as indicators of phytoplankton biomass and development in different water masses of the Southern Ocean during austral spring ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 44 (1-2): 261-282. doi:10.1016/S0967-0645(96)00077-X.
- Peloquin, J., C. Swan, N. Gruber, M. Vogt, H. Claustre, J. Ras, J. Uitz, et al. 2013. « The MAREDAT global database of high performance liquid chromatography marine pigment measurements ». *Earth System Science Data* 5 (1): 109-123. doi:10.5194/essd-5-109-2013.
- Rodriguez, F., JI Garrido, Bg Crespo, B Arbones, et Fg Figueiras. 2006. « Size-fractionated phytoplankton pigment groups in the NW Iberian upwelling system: impact of the Iberian Poleward Current ». *Marine Ecology Progress Series* 323: 59-73. doi:10.3354/meps323059.
- Rodriguez, F., M. Chauton, G. Johnsen, K. Andresen, L. M. Olsen, et M. Zapata. 2006. « Photoacclimation in Phytoplankton: Implications for Biomass Estimates, Pigment Functionality and Chemotaxonomy ». *Marine Biology* 148 (5): 963-971. doi:10.1007/s00227-005-0138-7.
- Rodriguez, F., M. Varela, E. Fernández, et M. Zapata. 2003. « Phytoplankton and Pigment Distributions in an Anticyclonic Slope Water Oceanic Eddy (SWODDY) in the Southern Bay of Biscay ». *Marine Biology* 143 (5): 995-1011. doi:10.1007/s00227-003-1129-1.
- Rodriguez, Francisco, Manuel Varela, et Manuel Zapata. 2002. « Phytoplankton assemblages in the Gerlache and Bransfield Straits (Antarctic Peninsula) determined by light microscopy and CHEMTAX analysis of HPLC pigment data ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 49 (4-5): 723-747. doi:10.1016/S0967-0645(01)00121-7.
- Roy, Suzanne. 2011. *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*. Cambridge University Press.
- Schlüter, L., T. L. Lauridsen, G. Krogh, et T. Jørgensen. 2006. « Identification and Quantification of Phytoplankton Groups in Lakes Using New Pigment Ratios – a Comparison between Pigment Analysis by HPLC and Microscopy ». *Freshwater Biology* 51 (8): 1474-85. doi:10.1111/j.1365-2427.2006.01582.x.
- Schlüter, L., et F. Møhlenberg. 2003. « Detecting Presence of Phytoplankton Groups with Non-Specific Pigment Signatures ». *Journal of Applied Phycology* 15 (6): 465-476. doi:10.1023/B:JAPH.0000004322.47413.24.
- Schlüter, L., F. Møhlenberg, H. Havskum, et S. Larsen. 2000. « The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios ». *Marine Ecology Progress Series* 192: 49-63. doi:10.3354/meps192049.
- Schlüter, Louise, Peter Henriksen, Torkel Gissel Nielsen, et Hans H. Jakobsen. 2011. « Phytoplankton composition and biomass across the southern Indian Ocean ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 58 (5): 546-556. doi:10.1016/j.dsr.2011.02.007.
- See, Jason H., Lisa Campbell, Tammi L. Richardson, James L. Pinckney, Rongjun Shen, et Norman L. Guinasso. 2005. « Combining New Technologies for Determination of Phytoplankton Community Structure in the Northern Gulf of Mexico 1 ». *Journal of Phycology* 41 (2): 305-10. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.04132.x.
- Seoane, S., A. Laza, et E. Orive. 2006. « Monitoring phytoplankton assemblages in estuarine waters: The application of pigment analysis and microscopy to size-fractionated samples ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 67 (3): 343-354. doi:10.1016/j.ecss.2005.10.020.
- Sherrard, N J, M Nimmo, et C A Llewellyn. 2006. « Combining HPLC Pigment Markers and Ecological Similarity Indices to Assess Phytoplankton Community Structure: An Environmental Tool for Eutrophication? ». *The Science of the Total Environment* 361 (1-3): 97-110. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.08.058.
- Smythe-Wright, Denise, Aaron Daniel, Stephen Boswell, Diane Purcell, Mark Hartman, Susan Hartman, et David Hydes. 2014. « Phytoplankton and pigment studies in the Bay of Biscay and English Channel ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. doi:10.1016/j.dsr2.2013.12.015. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096706451300461X>.
- Stauber, Jennifer L., et S. W. Jeffrey. 1988. « Photosynthetic Pigments in Fifty-One Species of Marine Diatoms 1 ». *Journal of Phycology* 24 (2): 158-72. doi:10.1111/j.1529-8817.1988.tb04230.x.

- Stolte, Willem, Gijsbert W. Kraay, Anna A. M. Noordeloos, et Roel Riegman. 2000. « Genetic and Physiological Variation in Pigment Composition of *Emiliana Huxleyi* (prymnesiophyceae) and the Potential Use of Its Pigment Ratios as a Quantitative Physiological Marker ». *Journal of Phycology* 36 (3): 529-39. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99158.x.
- Thompson, P.A., P. Bonham, A.M. Waite, L.A. Clementson, N. Cherukuru, C. Hassler, et M.A. Doblin. 2011. « Contrasting oceanographic conditions and phytoplankton communities on the east and west coasts of Australia ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 58 (5): 645-663. doi:10.1016/j.dsr2.2010.10.003.
- Uitz, Julia, Hervé Claustre, André Morel, et Stanford B. Hooker. 2006. « Vertical Distribution of Phytoplankton Communities in Open Ocean: An Assessment Based on Surface Chlorophyll ». *Journal of Geophysical Research: Oceans* 111 (C8): n/a-n/a. doi:10.1029/2005JC003207.
- Uitz, Julia, Yannick Huot, Flavienne Bruyant, Marcel Babin, et Hervé Claustre. 2008. « Relating phytoplankton photophysiological properties to community structure on large scales ». *Limnology and Oceanography* 53 (2): 614-630. doi:10.4319/lo.2008.53.2.0614.
- Van den Meersche, Karel, Karline Soetaert, et Jack J. Middelburg. 2008. « A Bayesian Compositional Estimator for microbial taxonomy based on biomarkers ». *Limnology and Oceanography: Methods* 6: 190-199. doi:10.4319/lom.2008.6.190.
- Van Heukelem, Laurie, et Crystal S Thomas. 2001. « Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments ». *Journal of Chromatography A* 910 (1): 31-49. doi:10.1016/S0378-4347(00)00603-4.
- Vaulot, Daniel, Wenche Eikrem, Manon Viprey, et Hervé Moreau. 2008. « The Diversity of Small Eukaryotic Phytoplankton (≤ 3 Mm) in Marine Ecosystems ». *FEMS Microbiology Reviews* 32 (5): 795-820. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00121.x.
- Veldhuis, Marcel J.W., et Gijsbert W. Kraay. 2004. « Phytoplankton in the subtropical Atlantic Ocean: towards a better assessment of biomass and composition ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 51 (4): 507-530. doi:10.1016/j.dsr.2003.12.002.
- Vidussi, Francesca, Hervé Claustre, Beniamino B. Manca, Anna Luchetta, et Jean-Claude Marty. 2001. « Phytoplankton Pigment Distribution in Relation to Upper Thermocline Circulation in the Eastern Mediterranean Sea during Winter ». *Journal of Geophysical Research: Oceans* 106 (C9): 19939-56. doi:10.1029/1999JC000308.
- Vidussi, Francesca, Jean-Claude Marty, et Jacques Chiavérini. 2000. « Phytoplankton pigment variations during the transition from spring bloom to oligotrophy in the northwestern Mediterranean sea ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 47 (3): 423-445. doi:10.1016/S0967-0637(99)00097-7.
- Wright, S. W., S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura, C. A. Llewellyn, T. Bjornland, D. Repeta, et N. Welschmeyer. 1991. « Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton ». *Marine Ecology Progress Series* 77: 183-196.
- Wright, S.W., Thomas DP, Marchant HJ, Higgins HW, Mackey MD, et Mackey DJ. 1996. « Analysis of phytoplankton of the Australian sector of the Southern Ocean: comparisons of microscopy and size frequency data with interpretations of pigment HPLC data using the "CHEMTAX" matrix factorisation program ». *Marine Ecology Progress Series* 144: 285-298. doi:10.3354/meps144285.
- Wright, Simon W., Akira Ishikawa, Harvey J. Marchant, Andrew T. Davidson, Rick L. van den Eenden, et Geraldine V. Nash. 2009. « Composition and Significance of Picophytoplankton in Antarctic Waters ». *Polar Biology* 32 (5): 797-808. doi:10.1007/s00300-009-0582-9.
- Wright, Simon W., Rick L. van den Eenden, Imojen Pearce, Andrew T. Davidson, Fiona J. Scott, et Karen J. Westwood. 2010. « Phytoplankton community structure and stocks in the Southern Ocean (30–80°E) determined by CHEMTAX analysis of HPLC pigment signatures ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 57 (9–10): 758-778. doi:10.1016/j.dsr2.2009.06.015.
- Zapata, M, F Rodríguez, et JI Garrido. 2000. « Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases ». *Marine Ecology Progress Series* 195: 29-45. doi:10.3354/meps195029.
- Zapata, Manuel, Bente Edvardsen, Francisco Rodriguez, Miguel A. Maestro, et Jos L. Garrido. 2001. « Chlorophyll c2 monogalactosyldiacylglyceride ester (chl c2-MGDG). A novel marker pigment for *Chrysochromulina* species (Haptophyta) ». *Marine Ecology Progress Series* 219: 85-98. doi:10.3354/meps219085.

-
- Zapata, Manuel, Santiago Fraga, Francisco Rodriguez, et Jos L. Garrido. 2012. « Pigment-based chloroplast types in dinoflagellates ». *Marine Ecology Progress Series* 465: 33-52. doi:10.3354/meps09879.
- Zhu, Fei, Ramon Massana, Fabrice Not, Dominique Marie, et Daniel Vaultot. 2005. « Mapping of Picoeucaryotes in Marine Ecosystems with Quantitative PCR of the 18S rRNA Gene ». *FEMS Microbiology Ecology* 52 (1): 79-92. doi:10.1016/j.femsec.2004.10.006.
- Zhu, Zhuo-Yi, Ying Wu, Jing Zhang, Jin-Zhou Du, et Guo-Sen Zhang. 2013. « Reconstruction of anthropogenic eutrophication in the region off the Changjiang Estuary and central Yellow Sea: From decades to centuries ». *Continental Shelf Research*. doi:10.1016/j.csr.2013.10.018.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027843431300349X>.