



HAL
open science

PHENOPSIS Quelles évolutions technologiques du premier automate de phénotypage des plantes?

Myriam Dauzat, Anaëlle Dambreville, Justine Bresson, Denis Vile, Bertrand Muller, Vincent Negre, Garance Koch, François Vasseur, Alexis Bediee, Maxence Desigaux, et al.

► To cite this version:

Myriam Dauzat, Anaëlle Dambreville, Justine Bresson, Denis Vile, Bertrand Muller, et al.. PHENOPSIS Quelles évolutions technologiques du premier automate de phénotypage des plantes?. Cahier des Techniques de l'INRA, 2016, 89. hal-01602445

HAL Id: hal-01602445

<https://hal.science/hal-01602445>

Submitted on 27 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

PHENOPSIS

Quelles évolutions technologiques du premier automate de phénotypage des plantes?

Myriam Dauzat¹, Anaëlle Dambreville¹, Justine Bresson^{1,4}, Denis Vile¹, Bertrand Muller¹, Vincent Nègre¹, Garance Koch¹, François Vasseur^{1,3}, Alexis Bédiée¹, Maxence Desigaux², Denis Fourré², Christine Granier¹

Résumé. Afin de répondre aux besoins de phénotypage à haut débit dans le domaine végétal, le LEPSE (Laboratoire d'Ecophysiologie des plantes sous stress environnementaux) et la société Optimalog ont mis au point dès 2002 PHENOPSIS, un des premiers automates de phénotypage des plantes pour cultiver et suivre la croissance en pots de centaines de plantes de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* et ce à des niveaux de déficit hydrique du sol contrôlés. Depuis, PHENOPSIS a été utilisé comme outil de phénotypage dans plusieurs dizaines de publications. En parallèle, l'outil a évolué à la demande des utilisateurs pour élargir la gamme de mesures phénotypiques, accroître la sécurité des utilisateurs et améliorer la traçabilité et la fiabilité des données. Cet article fait le point sur ces évolutions.

Mots clés : automate, écophysiologie, flexibilité, phénotypage haut-débit, sécurités, type de mesures.

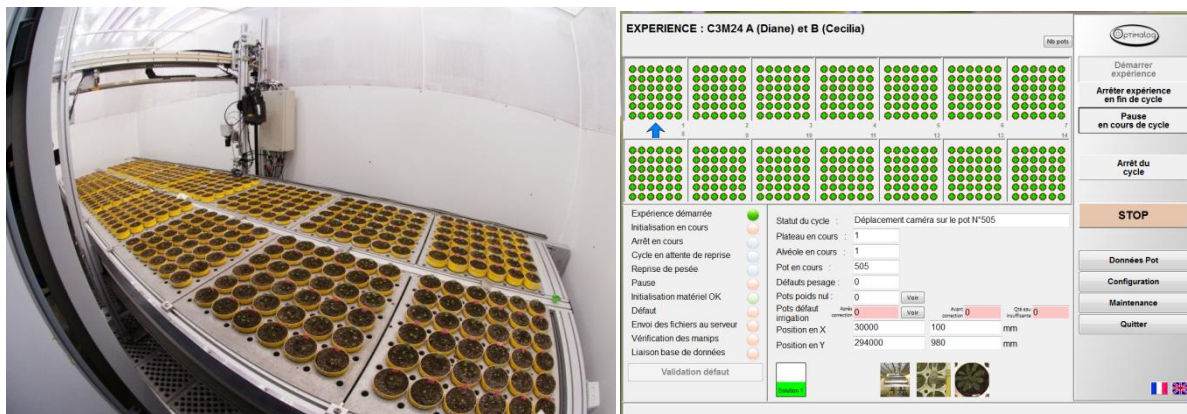


Photo 1. (a) vue générale de PHENOPSIS ; (b) interface de PHENOPSIS (Photos : INRA).

¹ INRA-LEPSE, 2 place Viala, 34060 Montpellier cedex, France
myriam.dauzat@supagro.inra.fr

² OPTIMALOG, SARL, 2 rue de la Fontaine de Mié, 37540 Saint Cyr sur Loire, France

³ adresse actuelle : CEFÉ, 1919, Route de Mende, 34090 Montpellier, France

⁴ adresse actuelle : Geschwister-Scholl-Platz, 72074, Tübingen, Germany

Introduction

Le Laboratoire d'Ecophysiologie des plantes sous stress environnementaux (UMR INRA-Supagro, LEPSE, Montpellier) s'intéresse particulièrement à la réponse de la croissance foliaire et de la transpiration des plantes aux conditions environnementales, en particulier au déficit hydrique du sol.

Au début des années 2000, le LEPSE a décidé d'investir fortement sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* pour pouvoir accéder à de larges ressources génétiques (populations d'accessions, mutants). Maîtriser l'état hydrique de centaines de plantes dans des conditions contrôlées devenait une nécessité et, en 2002, les techniciens et ingénieurs du LEPSE, associés à l'entreprise APILOGIC (aujourd'hui OPTIMALOG, <http://www.optimalog.com/>) ont mis au point un automate, PHENOPSIS, capable d'ajuster l'humidité du sol dans un dispositif de plus de 500 pots. L'automate repose sur un bras mobile x-y et un vérin pneumatique capable de soulever une balance sous chacun des pots et de commander un arrosage à la carte. Cet automate est installé dans une chambre de culture de 5 m², contrôlée par une centrale d'acquisition de données Campbell CR10X.

Aujourd'hui le LEPSE héberge trois PHENOPSIS dans trois chambres de culture, et la société Optimalog, forte de son expérience sur PHENOPSIS a implanté un PHENOPSIS en Belgique, conçu la plateforme de phénotypage Héliaphen à Toulouse et construit aujourd'hui un nouveau PHENOPSIS à Toulouse. Ce dernier a pu bénéficier des dernières évolutions technologiques de l'outil développées au LEPSE.

Les principales évolutions concernent :

- ✓ de nouveaux outils de gestion des images et données (Fabre et al., 2011, Fabre et al., 2008) ;
- ✓ des dispositifs de sécurité pour assurer la fiabilité des mesures et la tranquillité des utilisateurs ;
- ✓ l'ajout de nouvelles fonctionnalités pour répondre aux besoins des chercheurs.

Cet article vise à faire le point sur les évolutions d'un outil aujourd'hui mondialement reconnu (l'article Granier et al., 2006 est cité 307 fois et 34 articles ont utilisé des données issues de cette plateforme), partie intégrante de l'ensemble Montpellier Plant Phenotyping Platforms (M3P), labélisé IBISA et membre du réseau PHENOME (<https://www.phenome-fppn.fr/>). Il devrait aider les porteurs de futurs dispositifs de phénotypage et/ou imagerie de plantes à haut débit à établir un cahier des charges le plus complet possible. Il peut aussi susciter des idées d'expérimentations et pourquoi pas d'accueil sur notre plateforme ouverte vers l'extérieur et accessible au travers de projets (voir notre page décrivant les conditions d'accès sur le site <http://www6.montpellier.inra.fr/lepse/M3P>).

Rappel de la description technique et des fonctions primaires de PHENOPSIS (Dauzat et al., 2004)

PHENOPSIS est constitué d'un cadre principal fixe (4,17 x 1,46 m), et d'un portique mobile muni de capteurs se déplaçant en X et Y. Le cadre fixe supporte 14 plateaux en aluminium, amovibles percés de trous pour permettre à un total de 504 pots de prendre place. Cet ensemble est situé dans une chambre de culture dans laquelle l'utilisateur peut entrer (**Photo 2**), mais peut difficilement manipuler pour ses expérimentations puisque seuls quelques centimètres séparent le bord de l'automate des parois de la chambre. Cet automate pourrait être conçu et adaptable dans un autre environnement (serre, chambre plus grande: pouvoir circuler autour de l'automate serait l'idéal pour faciliter les prélèvements, ou les traitements plus fins de chaque pot).



Photo 2. Récolte dans PHENOPSIS (Photos : INRA-Lepse).

PHENOPSIS comportait en 2002 une balance, une pompe péristaltique, un tuyau d'irrigation et une caméra afin de peser, irriguer les pots en fonction d'un poids cible déterminé et permettre la mesure non-destructive de la surface foliaire des plantes au quotidien (voir **Annexe 2**, logigramme d'origine).

De nouvelles fonctionnalités ont été nécessaires

Au cours des années, il est apparu un besoin de plus en plus important de formation, une meilleure fiabilité et traçabilité des mesures. Des sécurités ont ainsi été rajoutées pour permettre aux expérimentateurs une meilleure confiance.

Un accueil personnalisé

Chaque utilisateur reçoit une formation sur le fonctionnement de l'automate à plusieurs niveaux suivant son implication et son degré de présence sur l'outil. Un livret d'accueil lui est délivré avec une validation des points de formation ainsi qu'une liste de contrôles à effectuer au démarrage de l'outil, en début et en cours d'expérimentation. Un accès à la base de données lui est attribué pour son expérimentation.

Sécurités mécaniques

Dès l'ouverture d'une porte de la chambre de culture une sécurité entraîne une interruption immédiate du déplacement du portique mobile. Une action manuelle (déblocage du bouton de sécurité) et une action *via* l'écran de supervision sont alors nécessaires pour réarmer et redémarrer l'automate.

Sécurités logicielles et informatiques

Des alertes sms ou mail peuvent être reçues par les expérimentateurs pour :

- ✓ **le climat des chambres*** : des valeurs maximum et minimum de chaque variable (température, humidité relative, rayonnement) sont définies pour le jour et la nuit et une alerte peut être envoyée en cas de dépassement ou de non atteinte des consignes ;
- ✓ **la qualité des images ***: une image RGB noire signifie qu'un cycle d'imagerie a été programmé la nuit par erreur ou que la caméra est en défaut ou que les lampes sont éteintes par erreur. La taille du fichier image sert de référence pour le déclenchement de cette alerte ;
- ✓ **tout défaut mécanique**** : celui-ci donne lieu à un message d'erreur sur l'écran de supervision de l'automate. Ce même message peut être envoyé par sms et/ou par mail à plusieurs adresses électroniques ou numéros renseignés.

Un message par sms est également envoyé dès la fermeture de l'application, ou si l'ordinateur est éteint (orage, fin d'autonomie de l'onduleur, arrêt volontaire ou non...).

* L'interface pour ces deux points a été conçue en interne par les informaticiens du LEPSE.

** Pour ce dernier type de défaut, les temps de latence avant l'envoi sont définis par l'utilisateur. Deux temps sont disponibles, fonction de l'interruption volontaire ou non de l'automate. Cela permet de limiter l'envoi de messages.

Une maintenance à distance

A tout moment il est possible de se connecter sur l'écran de l'ordinateur dédié à l'automate et de contrôler ce dernier à distance depuis un ordinateur ou un Smartphone distant grâce à un accès OpenVPN. Cette action peut être faite pour un simple contrôle, ou pour constater et visualiser un défaut pour lequel une action corrective pourra être apportée à distance ou nécessitera un déplacement.

La société Optimalog assure aussi la maintenance et la mise à jour logicielle par cet accès.

Sécurités sur les pesées

L'usage initial de PHENOPSIS est de peser chacun des pots afin qu'il soit comparé à un poids cible et arrosé de façon automatique par le déclenchement d'une pompe péristaltique. Si le principe reste simple, l'utilisation au cours du temps nous a montré de multiples sources d'erreurs possibles, le plus souvent bloquantes et décelables à l'exploitation des données. Nous essayons aujourd'hui de les anticiper.

Une première source d'erreur concerne la pesée des pots. Si un pot est mal pesé il sera mal irrigué car l'estimation de la quantité de solution à apporter (poids cible programmé-pesée) sera fausse.

Le Cahier des Techniques de l'INRA 2016 (89)

- ✓ Sous chacun des pots, une tare de la balance a lieu.
- ✓ Un pot physiquement absent mais déclaré présent sera pesé à 0 g ⁽¹⁾. PHENOPSIS contrôlera alors la pesée pour confirmer. Il n'arrosera pas ce pot.
- ✓ On définit également un poids minimal, ou un % du poids cible en dessous duquel il ne pourra pas y avoir d'arrosage.
- ✓ Un temps de stabilisation maximal est aussi paramétrable. Un temps long peut signifier un contact du pot à son alvéole et donc une stabilisation de la balance impossible. Ce temps dépassé, l'automate passera au pot suivant sans apporter d'eau.
- ✓ Un temps minimal de stabilisation de la pesée défini dans des variables est également déterminé si une action s'avère nécessaire en position de pesée (vérification du centrage quelquefois nécessaire pour des pots très lourds ou volumineux).
- ✓ En fin de cycle, un retour (ou non, suivant la consigne) de l'automate sur les pots pesés nuls ou mal pesés pour les raisons précédentes permettra un nouvel essai.

Les poids contrôlés sont enregistrés, donc tracés.

Sécurités sur les irrigations

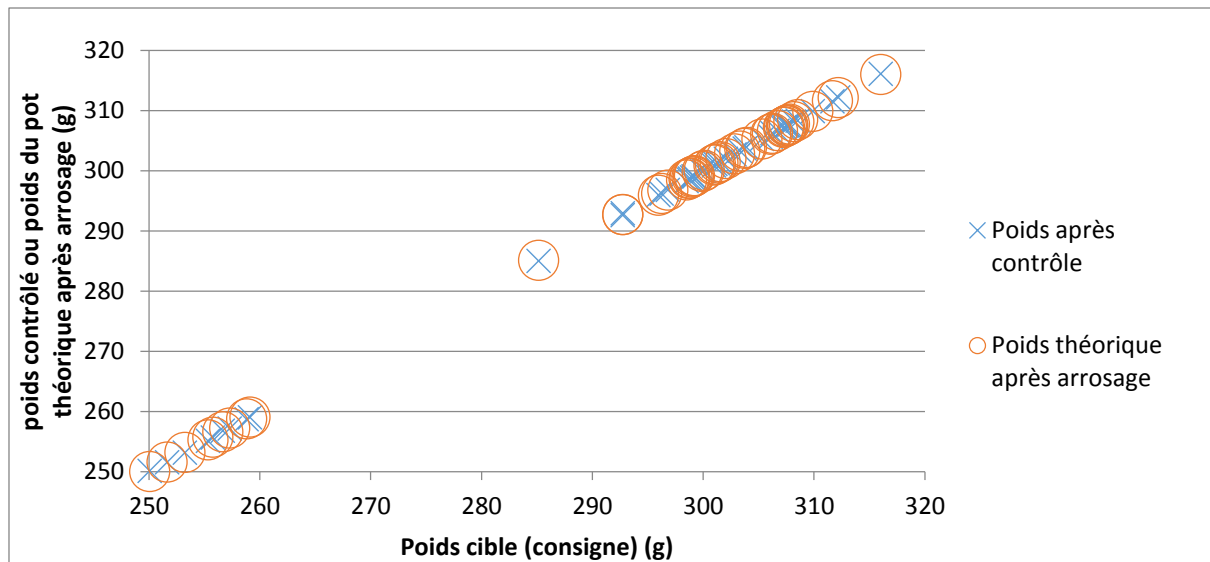
Tout comme sur les pesées, des erreurs sur les apports d'eau peuvent avoir lieu :

- ✓ une masse d'eau maximale à apporter pour chaque pot lors de chaque cycle est définie. Des masses maximales différentes sont programmables en fonction de la pompe utilisée et du type de cycle. Il est possible que cette masse maximale soit inférieure à la masse de solution nécessaire pour atteindre le poids cible du pot. Cela peut être une volonté de l'utilisateur de ne pas sur-arroser une plante trop brutalement ou une erreur d'évaluation des besoins de la plante. Une alerte en cas de limitation de la masse d'eau imposée (calculée) ne permettant pas de répondre à la consigne d'humidité du pot est alors envoyée par message électronique ⁽³⁾.

Les pots peuvent être contrôlés après irrigation :

- ✓ le pourcentage de pots contrôlés est défini par l'utilisateur et le choix des pots à contrôler est aléatoire (**Grphe 1**). Demander un pourcentage de repesée aléatoire après arrosage (0 à 100% des pots) entraîne des temps de cycle d'irrigation plus longs. Si le poids vérifié est toujours incorrect à l'issue des tentatives, un message d'alerte est envoyé ⁽²⁾. Sa validation permet à l'utilisateur de reprendre ou pas l'opération de contrôle sur ce même pot.
- ✓ une option permettant systématiquement de vérifier le poids de chaque premier pot de plateau après arrosage permet sans perte de temps de contrôler si la pompe n'est pas désamorcée.

Grphe 1 page suivante



Graph 1. Exemple de pots contrôlés après une irrigation. Les ronds représentent le poids théorique du pot après déclenchement de la pompe. Les croix sont les poids réels des pots contrôlés après l'arrosage. Ici, la moyenne des écarts par rapport au poids cible (consigne) est de $-0.033g$, l'erreur la plus grande est de $0,4g$. Nous tolérons une erreur de $0,5g$ pour des pots de $280g$ en moyenne. (Ici, des pots stressés et des pots témoins bien irrigués figurent sur le même graphique).

Les solutions nutritives sont localisées dans des bidons de 25 L à l'arrière de la chambre de culture. Un suivi du volume de solution disponible est visualisé à l'écran, calculé à partir du volume de solution initiale mise à disposition de l'automate. Une alerte est envoyée automatiquement quand le volume de solution disponible est trop faible (% définissable par l'utilisateur).

Un message est envoyé en fin de chaque cycle à une ou plusieurs adresses électroniques pour faire le bilan des défauts rencontrés en cours de cycle :

```
Pots poids nul(1) : 0
Pots en défaut d'irrigation avant correction : 4
Pots en défaut d'irrigation après correction(2) : 1
Pots en défaut par limitation de la quantité d'eau délivrée(3) : 2
```

Une interface plus conviviale et une utilisation plus souple

Lors d'une consultation à distance et en cours d'un cycle, il était impossible de voir sur l'interface si un utilisateur avait une action de maintenance, présent ou non dans la chambre pour une action corrective. L'interface a été améliorée pour mettre en évidence, par coloration différentielle de la flèche indicatrice de cycle en cours, qu'une maintenance est activée (**Photo 3**) et ainsi informer l'utilisateur à distance qu'un acteur agit sur l'automate et peut être physiquement présent dans la chambre malgré les sécurités.

Il est aussi possible d'écrire un commentaire visible sur l'interface pour informer les autres utilisateurs d'un point ou d'un paramétrage particulier (**Photo 3**).

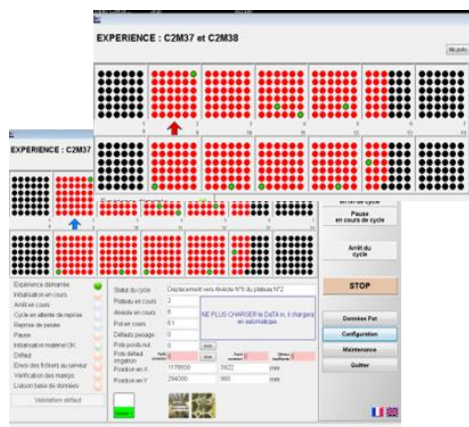


Photo 3. Les écrans diffèrent si la maintenance est activée. Un commentaire est possible dans la zone réservée (Photos : INRA-Lepse).

Il faut aussi souligner les améliorations sur la convivialité et la visualisation des fonctionnalités via un écran de supervision ergonomique et accueillant : suivant la fonction du cycle demandée, une image de la fonction en cours s'affiche (image Visible, Infra Rouge, Fluo, pesée, irrigation...), ainsi que la position à l'écran du bras en cours du cycle, ou du pot en cours.

La possibilité d'arrêter un cycle en cours avec reprise (pause) ou non (abandon) à l'endroit de l'arrêt a été rajoutée à la version originale.

La géométrie du dispositif est souple : la position des pots est interchangeable, les capteurs sont repositionnables (caméras, goutteur, balance) physiquement et/ou via l'interface en X et Y.

L'utilisateur peut décider de l'envoi ou non des données à la base de données par simple validation d'option, avec sauvegarde automatisée sur le PC.

Des demandes scientifiques et techniques en évolution

Avoir accès à de nouvelles variables phénotypiques via l'imagerie

La résolution de la caméra dans le spectre de lumière visible a été augmentée, et l'encombrement optimisé grâce aux nouvelles caméras Ethernet plus performantes (Prosilica GC 1600, Allied Vision, USA). Des caméras latérales permettant la mesure des angles foliaires (**Photo 4a**) peuvent être maintenant disposées sur le même bras (Vasseur et al., 2011). Elles sont du même type que la caméra visible, et permettent ainsi l'interchangeabilité en cas de panne. Une lumière verte permet de réaliser des images lorsque les lumières de la chambre de culture sont éteintes (**Photo 4b**) tout en évitant l'activité photosynthétique. Une horloge allume la lampe en simultané avec le départ des cycles d'images. Il faut signaler ici la nécessité de prévoir une alimentation en 220 V sur le bras de l'automate pour de nouveaux instruments.



Photo 4. (a) Mesure des angles foliaires, (b) caméra latérale sur le bras avec photo prise de nuit (Photos : INRA-Lepse).

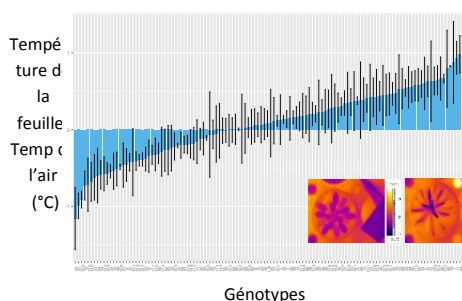
Le fluorimètre par imagerie PAM (Imaging PAM chlorophyll fluorometer, Walz, Germany) a été adapté pour la mesure de la fluorescence de chlorophylle.

Le logiciel de l'instrument Imaging Pam (logiciel Imaging Win, Walz) a été intégré à l'interface pour permettre la sortie et l'enregistrement automatique des images et fichiers acquis par la caméra en fluorescence. Il a fallu un investissement collectif des partenaires (Optimalog, Walz et LEPSE-INRA), pour adapter le système existant en tenant compte des contraintes d'encombrement, mais surtout pour coordonner et sécuriser les mesures entre l'automate et le logiciel Imaging Pam. Afin d'éviter l'illumination des plantes voisines lors du flash nécessaire à la prise d'image en fluorescence, la balance est en position élevée pour maintenir le pot dans un cône opaque. Il est possible de mesurer différents paramètres relatifs à la fluorescence de la chlorophylle comme par exemple le rendement quantique du PS II après adaptation à l'obscurité (**Photo 5**; Bresson et al., 2013, 2015). Des mesures d'autres variables « haut débit » comme l'ETR (electron transport rate), et l'absorbance sont en cours de validation.



Photo 5. Evolution du rapport de fluorescence Fv/Fm chez *Arabidopsis thaliana* au cours d'une phase de dessèchement puis de réhumectation. Imagerie en fausses couleurs (Photos : INRA-Lepse).

L'imagerie dans le spectre infrarouge (FLIR, SC645) permet de quantifier la température de surface des organes de la plante, en particulier des feuilles, et donc de déceler la variabilité des systèmes de régulation de la transpiration dans des populations de génotypes ou dans des conditions environnementales contrastées (**Graphe 2**).



Graphe 2. Différence de température entre la feuille et l'air chez une population de lignées recombinantes *Ler x Cvi* chez *Arabidopsis thaliana* (Vasseur, Vile et al., non publié).

Les mesures obtenues par la caméra reposent sur un système de prise en compte de la variabilité spatiale et temporelle des conditions environnementales par une mesure IR sur papier de cigarette positionné près du pot. Celle-ci a lieu en même temps que la mesure réalisée sur la plante indiquant la température de l'air ambiant (Dauzat et al., 2008).

Le logiciel ThermaCAM Researcher Pro (ThermaCAM Researcher Pro, 2.10) a été intégré au logiciel de PHENOPSIS pour permettre la visualisation des images thermiques. La communication entre optimaPLC et la caméra est assurée par le logiciel OptimaPLC/ThermaCAM, qui constitue le lien avec le logiciel de FLIR en mode OLE.

La connexion à l'ordinateur s'effectuait jusqu'à présent par câble FireWire (FLIR ThermoCAM B20HSV). Le câble étant très fragile, il était très difficile de le faire passer dans une chaîne porte câble soumise à de fortes contraintes sur une durée pluri-annuelle. La caméra IR est aujourd'hui connectée en Ethernet. La connexion est plus robuste, et le câble est aussi utilisé pour les caméras visibles ou de fluorescence. Un même câble peut donc avoir plusieurs utilisations. L'alimentation de la caméra n'est plus sur batterie et nécessite une prise 220 V directement sur le bras.

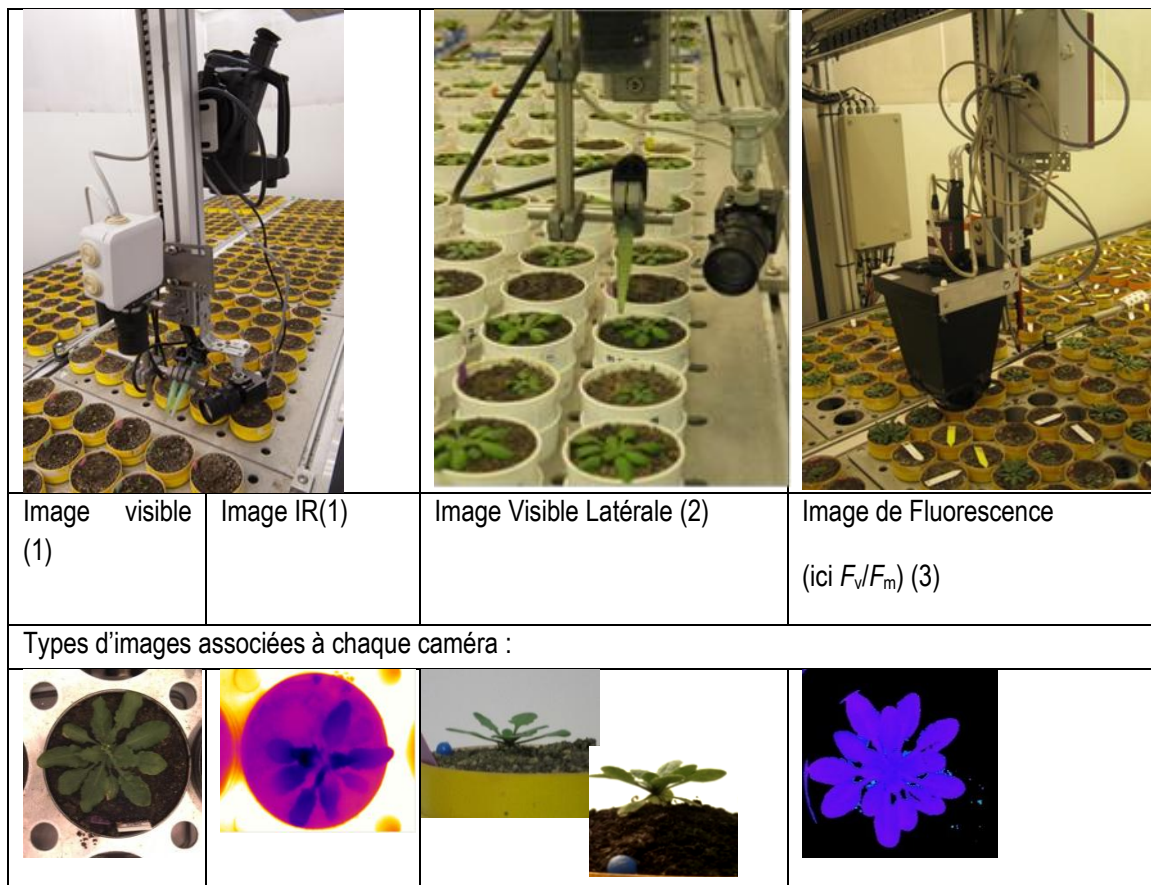


Photo 6. Mesure des quelques types de caméras montées sur PHENOPSIS et leurs images associées (Photos : INRA-Lepse).

Tous ces aménagements ont nécessité le passage de câbles nouveaux (Ethernet, alimentation des caméras, 220V...). Un dimensionnement large de la chaîne porte câble est donc nécessaire dès le départ.

Tous les types d'images sont possibles (**Photo 6**) sur une même expérimentation en même temps, sous réserve de l'ombrage causé par les instruments. Seul le cache pour la mesure de fluorescence s'enlève manuellement après chaque cycle.

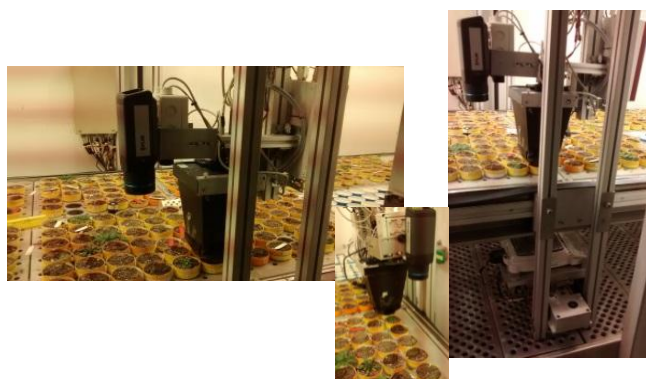


Photo 7. De gauche à droite : Caméra IR, Visible, Fluorescence sur un même portique se déplacent en même temps (Photos : INRA-Lepse).

Pouvoir imposer de nouveaux stress dans le sol

Il est possible d'utiliser deux types de solution pour l'irrigation (**Photo 7**) au cours d'une même expérimentation car le système est maintenant équipé de deux pompes péristaltiques, deux systèmes d'irrigation et deux bidons de réserve indépendants. Des stress minéraux couplés à des stress hydriques ont déjà été réalisés.



Photo 8. Deux solutions nutritives sont possibles
(Photos : INRA-Lepse).

Jusqu'à 10 cycles d'arrosage quotidiens sont programmables, ils sont indépendants : la pesée, l'irrigation, la prise d'images sont des fonctions libres (sélectionnables ou non) par cycle. La programmation s'effectue par cycle et par pot, via un fichier MS Excel, la consigne par pot étant primordiale sur celle du cycle : un pot non sélectionné pour l'arrosage ne sera pas arrosé malgré le cycle validé.

Pouvoir réaliser des traitements différents, ou des expérimentations indépendantes en même temps

Il est possible de séparer les pots d'une même expérience en deux lots pour leur imposer en cours d'expérimentation des conditions d'irrigation différentes : des pots nécessitant seulement d'être pesés plusieurs fois par jour et non arrosés (suivi de transpiration par exemple) auront des types de cycles différents des pots devant être arrosés régulièrement. Chaque pot a aussi ses propres caractéristiques et est géré individuellement: le pot X pourra ne jamais être arrosé ou pourra bénéficier de la solution nutritive 2, contrairement à son voisin.

Plusieurs expériences peuvent être déclarées en même temps, la traçabilité est alors assurée par des identifiants distincts et des fichiers séparés.

Des fichiers de consignes sont téléchargeables automatiquement ou manuellement. Ils permettent de modifier les consignes en cours de journée ou d'imposer des consignes différentes en fonction des jours. La fonction automatisable est un peu délicate à gérer et nécessite beaucoup d'attention.

Des apports de solution en quantité fixe avec ou sans pesée préalable, ou fonction d'un poids cible sont possibles. Les deux types d'apport sont complémentaires. Si les poids cibles ne sont pas encore définis ou si la balance ne peut assurer la pesée, alors on choisira un apport de solution fixe.

	Nombre de plantes	Temps de cycle estimé	Commentaire
Images Infra Rouge	504	30 min	
Irrigation	504	2h30	Dépend du % de contrôle des pots
Pesées	504	1h15	
Images de Fluorescence (F_v/F_m)	504	3h30	
Images Horizontales	504	30 min	
Images Latérales	504	1h15	
Irrigation+ ImagesV+Images IR+Images L	504	3 h	

Tableau 1. Temps d'action pour un cycle dans un PHENOPSIS de type 1 (504 pots)

Les consignes sont gérables pot à pot et/ou sur l'ensemble des pots.

Des besoins en traitement post mesure optimisés

Base de données associée : <http://bioweb.supagro.inra.fr/phenopsis/>

La base de données PHENOPSIS-DB a été conçue au LEPSE sous MySQL pour stocker toutes les informations liées aux expérimentations. Elle évolue régulièrement pour s'ajuster aux nouvelles espèces végétales étudiées ou aux développements techniques (capteurs, modules d'acquisition de données, alertes de sécurité). PHENOPSIS-DB possède une interface Web ergonomique qui établit le lien avec utilisateurs pour l'insertion et la consultation des données.



Figure 1. Interface de la base de données phenopsisDB.

La visualisation des données (météo, mesures sur les plantes, teneur en eau des pots) globales ou spatialisées est en partie automatisée à l'aide de scripts R (<https://www.r-project.org/>) disponibles dans l'interface web de la base de données.

Des macros sous Image J (<http://imagej.net/Welcome>) ont été développées pour le traitement des images et sont à la disposition des utilisateurs de la plateforme. Pour l'instant le traitement des images se fait essentiellement après l'expérimentation et est semi-automatisé. La surface foliaire projetée au cours du temps est une sortie directe des images acquises par PHENOPSIS. Un projet d'automatisation totale du traitement des images en direct avec calcul et insertion directe des surfaces de la plante et estimation du poids de la plante est actuellement à l'étude.

Une évolution de PHENOPSIS pour accueillir d'autres espèces

PHENOPSIS est aujourd'hui fortement sollicité pour permettre de cultiver d'autres espèces et répondre à des besoins plus proches de l'agronomie (espèces cultivées), de l'écologie (culture de mélange d'espèces) ou de la

génétique (autres plantes modèles). Ainsi, nous avons réalisé des expérimentations sur différentes espèces dans PHENOPSIS, telle que *Brachypodium dystachium*, la tomate, le colza, la laitue (Photos 9, 10). Selon les cas, la taille des plantes et la durée de l'expérimentation autorisent la culture dans des pots identiques à ceux utilisés pour *Arabidopsis* ou au contraire imposent de cultiver les plantes dans des pots de plus grand volume.



Photo 9. (a) Culture de *Brachypodium dystachium* dans PHENOPSIS : possible dans de petits pots, mais de plus grands volumes seraient souhaitables. (b) image latérale de *Brachypodium* prise dans phénopsis. (Photos : INRA-Lepse).

La souplesse du système initial a facilité la réalisation des modifications nécessaires aux nouvelles demandes. En effet, des essais de culture de colza (*Brassica napus*) dans les pots destinés initialement à *Arabidopsis* (250 cm³) ont montré non seulement un très fort impact mais également une très forte interaction entre taille du pot et réponses au stress (Dambreville et al., 2016, Figures 2 et 3). Une évolution de l'automate a été réalisée permettant l'utilisation de pots d'un diamètre de 19 cm, d'un volume de 7 L et pouvant peser jusqu'à 10 kg. Dans ce cas, 70 pots peuvent être embarqués dans PHENOPSIS.

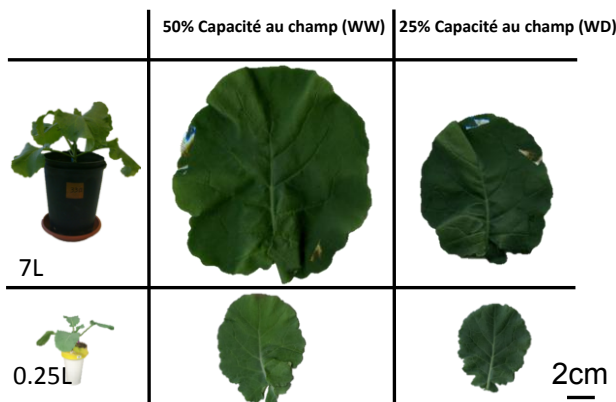


Figure 2. Surface foliaire de la troisième feuille de colza cultivé en petits pots et grands pots dans le même environnement climatique (Dambreville et al., 2016).

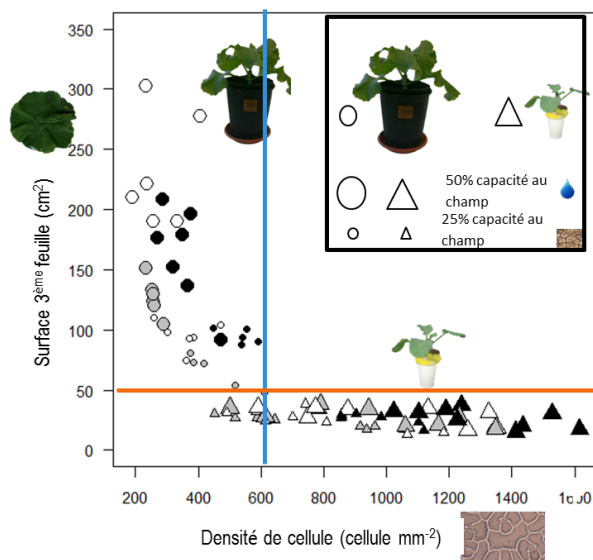


Figure 3. Surface foliaire et densité de cellules de la 3^e feuille de colza cultivé en petits pots et grands pots dans le même environnement climatique (Dambreville et al., 2016). Les différents niveaux de gris (blanc à noir, représentent trois génotypes différents).

Ces deux figures illustrent les différents phénotypes observés en fonction d'une culture en petits pots ou grands pots. L'importance de cette variable doit être prise en compte.

L'ensemble de ces modifications a été apporté et PHENOPSIS est aujourd'hui opérationnel pour fonctionner dans une gamme étendue d'espèces : de nouveaux plateaux, une balance de plus forte capacité, un vérin, et une nouvelle caméra constituent les principales modifications mécaniques pour un budget d'environ 10 k€ (modification du logiciel incluse).

La principale nouveauté est l'évolution du logiciel associé

Toutes les caractéristiques, fonctionnalités et supervision du PHENOPSIS d'origine ont été gardées. Le nouveau logiciel permet non seulement de programmer la taille de pots décrite ci-dessus, mais surtout, plusieurs autres configurations de pots. Cinq types de configurations de pots (taille et disposition) sont actuellement disponibles et modifiables dans le temps et suivant les besoins expérimentaux. Celles-ci sont gérables « en autonomie » par l'utilisateur, sans avoir recours au constructeur. Ainsi, le passage d'une configuration de 70 pots de 7 L à 504 pots de 250 mL est aujourd'hui possible en quelques clics de souris. L'étendue des possibilités est large, y compris des configurations mixtes (plateaux de types différents sur une même expérimentation).

Actuellement une nouvelle géométrie requiert seulement la fabrication de nouveaux plateaux à la dimension des pots choisis. La balance doit être adaptée au poids des pots et à la précision souhaitée. De même, le vérin et la géométrie du système de pesée doivent être dimensionnés pour s'adapter au volume et au poids des pots.

Photo 10 page suivante



Photo 10. Ici, les cultures de tomates (gauche) et de salade (droite) sont aujourd'hui possibles (Photos : INRA-Lepse).

Quelles évolutions futures ?

La recherche scientifique est soumise aux exigences sociétales et s'appuie sur les évolutions technologiques très rapides. Nous avons vu que PHENOPSIS était suffisamment flexible pour s'adapter à diverses demandes (augmentation de la taille des pots pour analyser le phénotype d'espèces végétales d'intérêt agronomique) et de nouveaux besoins (évolution/obsolescence des outils d'acquisition de données). Avec la diversification des espèces végétales d'architectures contrastées, il devient urgent de considérer la plante dans ses trois dimensions. L'addition de caméras latérales nous a déjà permis d'appréhender la croissance verticale et le mouvement des feuilles. Avec le développement des nouvelles technologies, il devient envisageable de scanner les plantes en 3D en conservant la structure initiale.

L'analyse en temps réel des données acquises pourrait permettre d'améliorer le pilotage de l'automate. Par exemple, chez les plantes en rosette comme *A. thaliana*, la surface foliaire donne une bonne estimation de la masse des plantes qui devrait être prise en compte pour ajuster l'irrigation. Cependant, l'analyse d'images en temps réel est contrainte par la qualité d'acquisition. Plusieurs méthodes (par exemple la combinaison d'images dans différents spectres lumineux, le développement de procédures informatisées) sont actuellement à l'étude pour réaliser ces développements dans les meilleures conditions.

La germination des graines reste une étape critique. Une attention particulière et une présence humaine régulière est nécessaire pour maintenir un environnement constamment humide à proximité des graines puis des plantules. L'automatisation de la brumisation au plus proche des graines est à l'étude.

Les plateaux à grands pots entraînent des effets de bordure et cet élément pourrait être amélioré. La mixité des types de plateaux implique ici une contrainte de gestion de balance due à la présence d'une poutre centrale. Celle-ci sera éliminée sur la prochaine évolution de PHENOPSIS. De plus, la balance sera soulevée par un vérin électrique et non plus pneumatique, ce qui permettra d'adapter sa course sous chacun des pots en fonction de leur dimension.

Conclusion

La conception, la sécurisation, la fiabilisation et enfin l'évolution de PHENOPSIS, ont été permis grâce à une volonté du LEPSE de conserver un outil au plus proche des questionnements scientifiques tout en s'appuyant sur

des avancées technologiques. Une attention particulière a été portée i) à la communication entre les différents acteurs, c'est-à-dire les utilisateurs, les développeurs et les constructeurs/fournisseurs, et ii) à l'anticipation des besoins futurs. Pendant les quinze années d'existence de l'automate, le constructeur est resté à disposition pour le développement des demandes successives ce qui a été et reste un facteur déterminant dans la réussite des évolutions de l'outil.

Remerciements

Nous remercions tous les utilisateurs qui ont, de près ou de loin contribué à faire de PHENOPSIS un outil efficace, simple et fiable. Toutes les idées émises ont été étudiées et le plus souvent mises en place avec l'aide d'Optimalog.

Merci à Yves Primault (www.bionef.fr) pour la société Walz pour l'application Fluorescence développée en lien avec Optimalog, ainsi que la société AM Froid pour la partie Climatisation.

Merci à Florent, Anthony, Gaëlle, Crispulo, Nicolas, Frédéric, Nathalie qui ont très largement contribué aux améliorations décrites dans cet article.

Les évolutions de PHENOPSIS décrites dans cet article ont été réalisées grâce au soutien du projet FP7-EPPN (European Plant Phenotyping Network, contrat no. 284443) dans le cadre du programme des infrastructures de recherches, du projet AgWaterBreed dans le cadre de l'EIT Climate-KIC.

Durant ce travail, François Vasseur était soutenu par un contrat CIFRE (cofinancé par l'ANRT, ministère Français de la Recherche et la société BAYER Crop Science, contrat 0398/2009 - 09 42 008), Justine Bresson était soutenue par le ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Garance Koch était soutenue par le Labex AGRO (ANR-10-LABX-001-01) et Anaëlle Dambreville était soutenue par le projet AgWaterBreed dans le cadre de l'EIT Climate-KIC.

PHENOPSIS fait partie de 'Montpellier Plant Phenotyping Platforms' (M3P, http://www6.montpellier.inra.fr/lepse_eng/M3P), composante du Projet d'Investissement d'Avenir PHENOME, labélisée IBiSA (<http://www.ibisa.net/>).

Références bibliographiques

Bresson J et al. (2013) The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytol* **200** : 558-569.

Bresson J, Vasseur F, Dauzat M, Koch G, Granier C, Vile D (2015) Quantifying spatial heterogeneity of whole-plant chlorophyll fluorescence during growth and in response to water stress. *Plant Methods* : 11:23.

Dambreville A, Giolet M, Rolland G, Dauzat M, Bédiée A, Balsera C, Muller B, Vile D, Granier C (2016) Phenotyping oilseed rape growth-related traits and their responses to water deficit: the disturbing pot size effect. *Funct Plant Biol*. DOI: 10.1071/FP16036

Dauzat M, Simon E, Granier C, Hamard P, Muller B, Christophe A, Combes D, Tardieu F, Simonneau T (2004) Un automate de phénotypage pour cultiver des plantes à des états hydriques du sol contrôlés : un outil d'aide à la caractérisation de la réponse de la croissance et de la transpiration à la sécheresse. *Cahier Tech INRA*, n° 53 ; https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques/Les-Cahiers-parus/Les-N-reguliers/2004/Cahier-N-53/Art5-ct53-2004

Dauzat M, Dominique Flura D (2008) Pratiques et outils de mesure des rayonnements naturels dans les domaines visible, solaire et infrarouge. *Cahier Tech INRA*, n° thématique

M. Dauzat, A. Dambreville, J. Bresson, D. Vile, B. Muller, V. Nègre, G. Koch, F. Vasseur, A. Bédiée, M. Desigaux, D. Fourré, C. Granier

https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques/Les-Cahiers-parus/Les-N-themathiques/Rayonnements-naturels. La mesure des rayonnements de grande longueur d'onde, p. 59.

Fabre J, Tireau A, Dauzat M, Granier C (2008) Développement d'une base de données de phénotypage *Arabidopsis thaliana* accessible via une interface web. Cahier Tech INRA, 65 ; https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques/Les-Cahiers-parus/Les-N-reguliers/2008/cahier-65-decembre-2008,

Fabre J, Dauzat M, Nègre V, Wuyts N, Tireau A, Gennari E, Neveu P, Tisé S, Massonnet C, Hummel I, Granier C (2011) PHENOPSIS DB: An Information System for *Arabidopsis thaliana* phenotypic data in an environmental context. *BMC Plant Biol* :11.

Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Dauzat M, Hamard P, Simonneau T, Tardieu F ,et al., (2006) PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytologist* **169** : 623-635.

Annexes pages suivantes

ANNEXE 1

Liste des matériels utilisés dans PHENOPSIS

Liste récapitulative des **partenaires et fournisseurs** de matériel ayant servi à la réalisation de la chambre de culture et de l'automate.

La CHAMBRE de CULTURE

	Adresse fournisseur	Tél, email ou site internet
AM Froid	Montpellier, France	0467871578
Campbell	Campbell Scientific, Shepshed, Leicester-shire, UK	http://www.campbellsci.co.uk/fr
Lampes : Philips HPI-T Plus 400W Et néons : grolux T8 36W		https://www.lampesdirect.fr/
Li-Cor	Lincoln, Ne , USA	Http://www.licor.com
Skye Instruments	Powys.LD1 6 DF U.K	http://www.skyeinstruments.com
Vaisala	Oy, Helsinki, Finlande	http://www.vaisala.com
Groupe froid	Danfoss Maneurope SA	
Humidificateur	Ambrumesnil 76550 France	http://www.devatec.com
Caillebotis	Manutan	http://www.manutan&é.com

L'AUTOMATE

Optimalog	2 rue de la Fontaine de Mié F-37540 Saint Cyr sur Loire	http://www.optimalog.com
Moteurs servomoteurs	Sanyo Denki 95958 Roissy	www.sanyodenki.co.jp
Sartorius	37075 Gottinghen, Allemagne	http://www.sartorius.com
Allied Vision: camera GC1600C	„Le Quadral“ 23 bis, rue Edouard Nieuport 92150 Suresnes France	http://www.stemmer-imaging.fr/ https://www.alliedvision.com
Electro finish (pompe)	Fontaine, France 95130 Franconville, France	Electro.finish@freesbee.fr

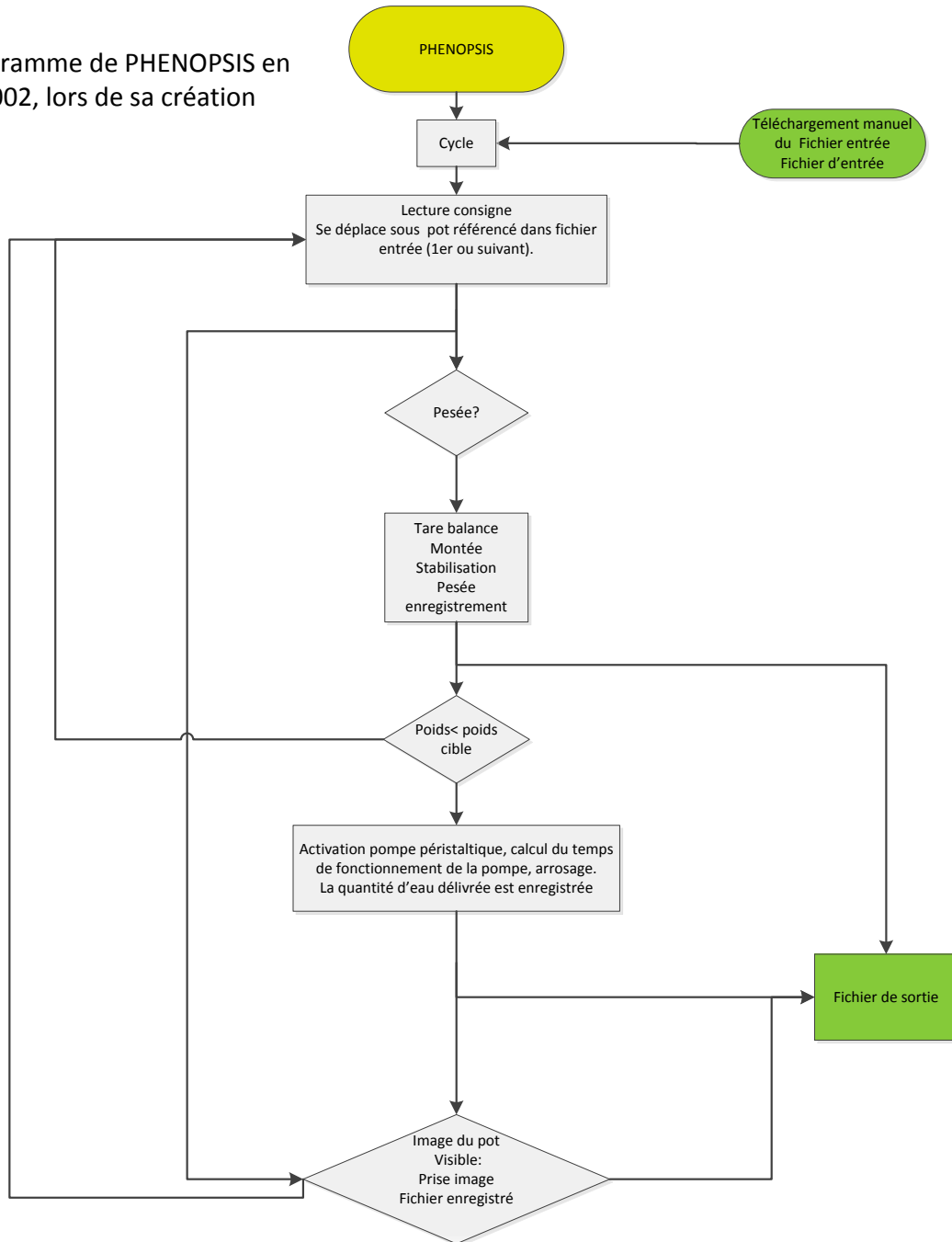
Caméras supplémentaires sur le bras ayant demandé une adaptation mécanique et logicielle particulière

Caméra IR SC645 : plage spectrale : 7,5–13 µm		http://www.flir.fr
Imaging pam, Chlorophyll Fluorescence System		http://www.walz.com http://www.bionef.fr
Camera latérale: camera Allied Vision GC1600C		http://www.stemmer-imaging.fr

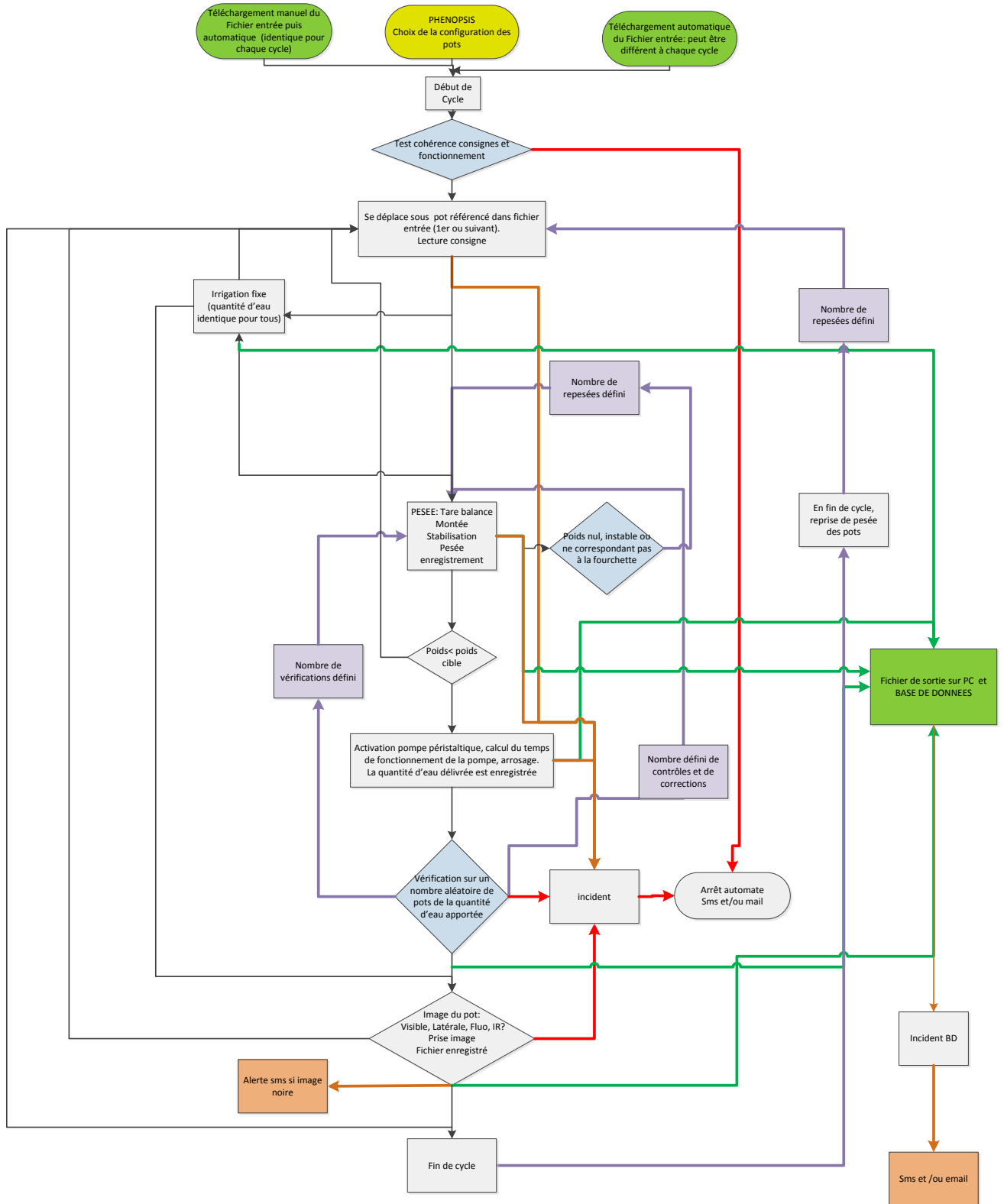
ANNEXE 2

Logigramme initial de PHENOPSIS et logigramme actuel simplifiés

Logigramme de PHENOPSIS en 2002, lors de sa création



Logigramme actuel de l'automate PHENOPSIS 2016 : le principe reste le même, il y a complexification et diversité des outils.



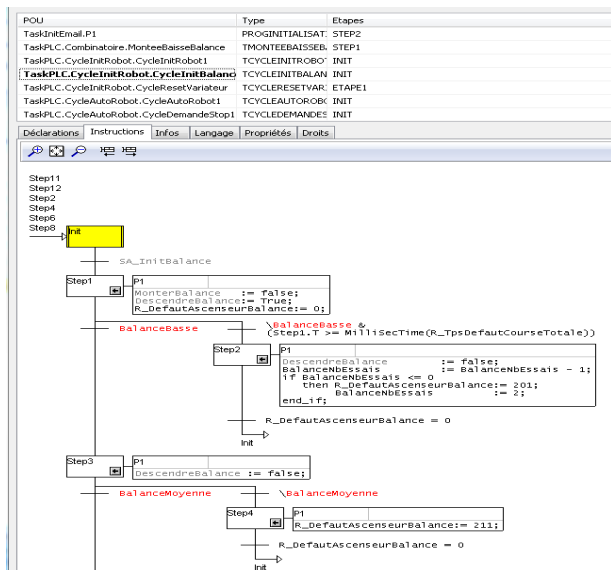
ANNEXE 3

Informations sur la partie logicielle de PHENOPSIS

L'atelier OptimaPLC, développé et commercialisé par OPTIMALOG, est un outil de développement basé sur la norme IEC61131-3. Il permet de programmer en IL, **ST**, **FBD**, **LADDER** et en diagramme **SFC** (Grafcet). **OPTIMA PLC** n'est pas un outil destiné à programmer des automates classiques, mais bien un **automate sur PC**.

Exemples de programmation :

Mode Grafcet :



Mode Tâches : **Optima PLC** est un logiciel d'automate sur PC en **temps réel** incluant un atelier logiciel convivial pour la programmation des tâches automatés.

R	RR	SA	L	A	C	I/O	AN	Debug	
Nom	Prio	Start	Run	Fault	Stop	Scrubations	Durée Min	Durée Max	Durée Moy
ThemaCamTask	8	X	X			841469175	0 µs	18482 µs	2,6 µs
TaskInit	8	OK				1	644 µs	644 µs	644,0 µs
TaskInitEmail	8	OK				10003	0 µs	75 µs	1,6 µs
TaskPLC	8	X	X			840557991	17 µs	366510 µs	44,2 µs
TaskGestionFichiers	9	X	X			13472040	0 µs	33105711 µs	106,5 µs
TaskFinEmail	8			X	0		0 µs	0 µs	0,0 µs

Expression	Valeur	Type
EN	Vrai (1)	BOOL
ENO	Faux (0)	BOOL
P1		PROGINITIALISATION
STARTPLCPHASEOK	Vrai (1)	BOOL
STOPPLCPHASEOK	Faux (0)	BOOL

Langage littéral :

```

0001 SEC
0002 STABLEMODE
0003 STEPMAN
0004 SIGNAL
0005 TARNAL
0006 TIME
0007 TAKE_RREY
0008 TAKE_RROE
0009 TLAST
0010 UNDELOAD
0011 UNDELOAD
0012 UNETS
0013 UNETS
0014 UNETS
0015 UNETS
0016 UNETS
0017 UNETS
0018 UNETS
0019 UNETS
0020 UNETS
0021 UNETS
0022 UNETS
0023 UNETS
0024 UNETS
0025 UNETS
0026 UNETS
0027 UNETS
0028 UNETS
0029 UNETS
0030 UNETS
0031 UNETS
0032 UNETS
0033 UNETS
0034 UNETS
0035 UNETS
0036 UNETS
0037 UNETS
0038 UNETS
0039 UNETS
0040 UNETS
0041 UNETS
0042 UNETS
0043 UNETS
0044 UNETS
0045 UNETS
0046 UNETS
0047 UNETS
0048 UNETS
0049 UNETS
0050 UNETS
0051 UNETS
0052 UNETS
0053 UNETS
0054 UNETS
0055 UNETS
0056 UNETS
0057 UNETS
0058 UNETS
0059 UNETS
0060 UNETS
0061 UNETS
0062 UNETS
0063 UNETS
0064 UNETS
0065 UNETS
0066 UNETS
0067 UNETS
0068 UNETS
0069 UNETS
0070 UNETS
0071 UNETS
0072 UNETS
0073 UNETS
0074 UNETS
0075 UNETS
0076 UNETS
0077 UNETS
0078 UNETS
0079 UNETS
0080 UNETS
0081 UNETS
0082 UNETS
0083 UNETS
0084 UNETS
0085 UNETS
0086 UNETS
0087 UNETS
0088 UNETS
0089 UNETS
0090 UNETS
0091 UNETS
0092 UNETS
0093 UNETS
0094 UNETS
0095 UNETS
0096 UNETS
0097 UNETS
0098 UNETS
0099 UNETS
0100 UNETS
0101 UNETS
0102 UNETS
0103 UNETS
0104 UNETS
0105 UNETS
0106 UNETS
0107 UNETS
0108 UNETS
0109 UNETS
0110 UNETS
0111 UNETS
0112 UNETS
0113 UNETS
0114 UNETS
0115 UNETS
0116 UNETS
0117 UNETS
0118 UNETS
0119 UNETS
0120 UNETS
0121 UNETS
0122 UNETS
0123 UNETS
0124 UNETS
0125 UNETS
0126 UNETS
0127 UNETS
0128 UNETS
0129 UNETS
0130 UNETS
0131 UNETS
0132 UNETS
0133 UNETS
0134 UNETS
0135 UNETS
0136 UNETS
0137 UNETS
0138 UNETS
0139 UNETS
0140 UNETS
0141 UNETS
0142 UNETS
0143 UNETS
0144 UNETS
0145 UNETS
0146 UNETS
0147 UNETS
0148 UNETS
0149 UNETS
0150 UNETS
0151 UNETS
0152 UNETS
0153 UNETS
0154 UNETS
0155 UNETS
0156 UNETS
0157 UNETS
0158 UNETS
0159 UNETS
0160 UNETS
0161 UNETS
0162 UNETS
0163 UNETS
0164 UNETS
0165 UNETS
0166 UNETS
0167 UNETS
0168 UNETS
0169 UNETS
0170 UNETS
0171 UNETS
0172 UNETS
0173 UNETS
0174 UNETS
0175 UNETS
0176 UNETS
0177 UNETS
0178 UNETS
0179 UNETS
0180 UNETS
0181 UNETS
0182 UNETS
0183 UNETS
0184 UNETS
0185 UNETS
0186 UNETS
0187 UNETS
0188 UNETS
0189 UNETS
0190 UNETS
0191 UNETS
0192 UNETS
0193 UNETS
0194 UNETS
0195 UNETS
0196 UNETS
0197 UNETS
0198 UNETS
0199 UNETS
0200 UNETS
0201 UNETS
0202 UNETS
0203 UNETS
0204 UNETS
0205 UNETS
0206 UNETS
0207 UNETS
0208 UNETS
0209 UNETS
0210 UNETS
0211 UNETS
0212 UNETS
0213 UNETS
0214 UNETS
0215 UNETS
0216 UNETS
0217 UNETS
0218 UNETS
0219 UNETS
0220 UNETS
0221 UNETS
0222 UNETS
0223 UNETS
0224 UNETS
0225 UNETS
0226 UNETS
0227 UNETS
0228 UNETS
0229 UNETS
0230 UNETS
0231 UNETS
0232 UNETS
0233 UNETS
0234 UNETS
0235 UNETS
0236 UNETS
0237 UNETS
0238 UNETS
0239 UNETS
0240 UNETS
0241 UNETS
0242 UNETS
0243 UNETS
0244 UNETS
0245 UNETS
0246 UNETS
0247 UNETS
0248 UNETS
0249 UNETS
0250 UNETS
0251 UNETS
0252 UNETS
0253 UNETS
0254 UNETS
0255 UNETS
0256 UNETS
0257 UNETS
0258 UNETS
0259 UNETS
0260 UNETS
0261 UNETS
0262 UNETS
0263 UNETS
0264 UNETS
0265 UNETS
0266 UNETS
0267 UNETS
0268 UNETS
0269 UNETS
0270 UNETS
0271 UNETS
0272 UNETS
0273 UNETS
0274 UNETS
0275 UNETS
0276 UNETS
0277 UNETS
0278 UNETS
0279 UNETS
0280 UNETS
0281 UNETS
0282 UNETS
0283 UNETS
0284 UNETS
0285 UNETS
0286 UNETS
0287 UNETS
0288 UNETS
0289 UNETS
0290 UNETS
0291 UNETS
0292 UNETS
0293 UNETS
0294 UNETS
0295 UNETS
0296 UNETS
0297 UNETS
0298 UNETS
0299 UNETS
0300 UNETS
0301 UNETS
0302 UNETS
0303 UNETS
0304 UNETS
0305 UNETS
0306 UNETS
0307 UNETS
0308 UNETS
0309 UNETS
0310 UNETS
0311 UNETS
0312 UNETS
0313 UNETS
0314 UNETS
0315 UNETS
0316 UNETS
0317 UNETS
0318 UNETS
0319 UNETS
0320 UNETS
0321 UNETS
0322 UNETS
0323 UNETS
0324 UNETS
0325 UNETS
0326 UNETS
0327 UNETS
0328 UNETS
0329 UNETS
0330 UNETS
0331 UNETS
0332 UNETS
0333 UNETS
0334 UNETS
0335 UNETS
0336 UNETS
0337 UNETS
0338 UNETS
0339 UNETS
0340 UNETS
0341 UNETS
0342 UNETS
0343 UNETS
0344 UNETS
0345 UNETS
0346 UNETS
0347 UNETS
0348 UNETS
0349 UNETS
0350 UNETS
0351 UNETS
0352 UNETS
0353 UNETS
0354 UNETS
0355 UNETS
0356 UNETS
0357 UNETS
0358 UNETS
0359 UNETS
0360 UNETS
0361 UNETS
0362 UNETS
0363 UNETS
0364 UNETS
0365 UNETS
0366 UNETS
0367 UNETS
0368 UNETS
0369 UNETS
0370 UNETS
0371 UNETS
0372 UNETS
0373 UNETS
0374 UNETS
0375 UNETS
0376 UNETS
0377 UNETS
0378 UNETS
0379 UNETS
0380 UNETS
0381 UNETS
0382 UNETS
0383 UNETS
0384 UNETS
0385 UNETS
0386 UNETS
0387 UNETS
0388 UNETS
0389 UNETS
0390 UNETS
0391 UNETS
0392 UNETS
0393 UNETS
0394 UNETS
0395 UNETS
0396 UNETS
0397 UNETS
0398 UNETS
0399 UNETS
0400 UNETS
0401 UNETS
0402 UNETS
0403 UNETS
0404 UNETS
0405 UNETS
0406 UNETS
0407 UNETS
0408 UNETS
0409 UNETS
0410 UNETS
0411 UNETS
0412 UNETS
0413 UNETS
0414 UNETS
0415 UNETS
0416 UNETS
0417 UNETS
0418 UNETS
0419 UNETS
0420 UNETS
0421 UNETS
0422 UNETS
0423 UNETS
0424 UNETS
0425 UNETS
0426 UNETS
0427 UNETS
0428 UNETS
0429 UNETS
0430 UNETS
0431 UNETS
0432 UNETS
0433 UNETS
0434 UNETS
0435 UNETS
0436 UNETS
0437 UNETS
0438 UNETS
0439 UNETS
0440 UNETS
0441 UNETS
0442 UNETS
0443 UNETS
0444 UNETS
0445 UNETS
0446 UNETS
0447 UNETS
0448 UNETS
0449 UNETS
0450 UNETS
0451 UNETS
0452 UNETS
0453 UNETS
0454 UNETS
0455 UNETS
0456 UNETS
0457 UNETS
0458 UNETS
0459 UNETS
0460 UNETS
0461 UNETS
0462 UNETS
0463 UNETS
0464 UNETS
0465 UNETS
0466 UNETS
0467 UNETS
0468 UNETS
0469 UNETS
0470 UNETS
0471 UNETS
0472 UNETS
0473 UNETS
0474 UNETS
0475 UNETS
0476 UNETS
0477 UNETS
0478 UNETS
0479 UNETS
0480 UNETS
0481 UNETS
0482 UNETS
0483 UNETS
0484 UNETS
0485 UNETS
0486 UNETS
0487 UNETS
0488 UNETS
0489 UNETS
0490 UNETS
0491 UNETS
0492 UNETS
0493 UNETS
0494 UNETS
0495 UNETS
0496 UNETS
0497 UNETS
0498 UNETS
0499 UNETS
0500 UNETS
0501 UNETS
0502 UNETS
0503 UNETS
0504 UNETS
0505 UNETS
0506 UNETS
0507 UNETS
0508 UNETS
0509 UNETS
0510 UNETS
0511 UNETS
0512 UNETS
0513 UNETS
0514 UNETS
0515 UNETS
0516 UNETS
0517 UNETS
0518 UNETS
0519 UNETS
0520 UNETS
0521 UNETS
0522 UNETS
0523 UNETS
0524 UNETS
0525 UNETS
0526 UNETS
0527 UNETS
0528 UNETS
0529 UNETS
0530 UNETS
0531 UNETS
0532 UNETS
0533 UNETS
0534 UNETS
0535 UNETS
0536 UNETS
0537 UNETS
0538 UNETS
0539 UNETS
0540 UNETS
0541 UNETS
0542 UNETS
0543 UNETS
0544 UNETS
0545 UNETS
0546 UNETS
0547 UNETS
0548 UNETS
0549 UNETS
0550 UNETS
0551 UNETS
0552 UNETS
0553 UNETS
0554 UNETS
0555 UNETS
0556 UNETS
0557 UNETS
0558 UNETS
0559 UNETS
0560 UNETS
0561 UNETS
0562 UNETS
0563 UNETS
0564 UNETS
0565 UNETS
0566 UNETS
0567 UNETS
0568 UNETS
0569 UNETS
0570 UNETS
0571 UNETS
0572 UNETS
0573 UNETS
0574 UNETS
0575 UNETS
0576 UNETS
0577 UNETS
0578 UNETS
0579 UNETS
0580 UNETS
0581 UNETS
0582 UNETS
0583 UNETS
0584 UNETS
0585 UNETS
0586 UNETS
0587 UNETS
0588 UNETS
0589 UNETS
0590 UNETS
0591 UNETS
0592 UNETS
0593 UNETS
0594 UNETS
0595 UNETS
0596 UNETS
0597 UNETS
0598 UNETS
0599 UNETS
0600 UNETS
0601 UNETS
0602 UNETS
0603 UNETS
0604 UNETS
0605 UNETS
0606 UNETS
0607 UNETS
0608 UNETS
0609 UNETS
0610 UNETS
0611 UNETS
0612 UNETS
0613 UNETS
0614 UNETS
0615 UNETS
0616 UNETS
0617 UNETS
0618 UNETS
0619 UNETS
0620 UNETS
0621 UNETS
0622 UNETS
0623 UNETS
0624 UNETS
0625 UNETS
0626 UNETS
0627 UNETS
0628 UNETS
0629 UNETS
0630 UNETS
0631 UNETS
0632 UNETS
0633 UNETS
0634 UNETS
0635 UNETS
0636 UNETS
0637 UNETS
0638 UNETS
0639 UNETS
0640 UNETS
0641 UNETS
0642 UNETS
0643 UNETS
0644 UNETS
0645 UNETS
0646 UNETS
0647 UNETS
0648 UNETS
0649 UNETS
0650 UNETS
0651 UNETS
0652 UNETS
0653 UNETS
0654 UNETS
0655 UNETS
0656 UNETS
0657 UNETS
0658 UNETS
0659 UNETS
0660 UNETS
0661 UNETS
0662 UNETS
0663 UNETS
0664 UNETS
0665 UNETS
0666 UNETS
0667 UNETS
0668 UNETS
0669 UNETS
0670 UNETS
0671 UNETS
0672 UNETS
0673 UNETS
0674 UNETS
0675 UNETS
0676 UNETS
0677 UNETS
0678 UNETS
0679 UNETS
0680 UNETS
0681 UNETS
0682 UNETS
0683 UNETS
0684 UNETS
0685 UNETS
0686 UNETS
0687 UNETS
0688 UNETS
0689 UNETS
0690 UNETS
0691 UNETS
0692 UNETS
0693 UNETS
0694 UNETS
0695 UNETS
0696 UNETS
0697 UNETS
0698 UNETS
0699 UNETS
0700 UNETS
0701 UNETS
0702 UNETS
0703 UNETS
0704 UNETS
0705 UNETS
0706 UNETS
0707 UNETS
0708 UNETS
0709 UNETS
0710 UNETS
0711 UNETS
0712 UNETS
0713 UNETS
0714 UNETS
0715 UNETS
0716 UNETS
0717 UNETS
0718 UNETS
0719 UNETS
0720 UNETS
0721 UNETS
0722 UNETS
0723 UNETS
0724 UNETS
0725 UNETS
0726 UNETS
0727 UNETS
0728 UNETS
0729 UNETS
0730 UNETS
0731 UNETS
0732 UNETS
0733 UNETS
0734 UNETS
0735 UNETS
0736 UNETS
0737 UNETS
0738 UNETS
0739 UNETS
0740 UNETS
0741 UNETS
0742 UNETS
0743 UNETS
0744 UNETS
0745 UNETS
0746 UNETS
0747 UNETS
0748 UNETS
0749 UNETS
0750 UNETS
0751 UNETS
0752 UNETS
0753 UNETS
0754 UNETS
0755 UNETS
0756 UNETS
0757 UNETS
0758 UNETS
0759 UNETS
0760 UNETS
0761 UNETS
0762 UNETS
0763 UNETS
0764 UNETS
0765 UNETS
0766 UNETS
0767 UNETS
0768 UNETS
0769 UNETS
0770 UNETS
0771 UNETS
0772 UNETS
0773 UNETS
0774 UNETS
0775 UNETS
0776 UNETS
0777 UNETS
0778 UNETS
0779 UNETS
0780 UNETS
0781 UNETS
0782 UNETS
0783 UNETS
0784 UNETS
0785 UNETS
0786 UNETS
0787 UNETS
0788 UNETS
0789 UNETS
0790 UNETS
0791 UNETS
0792 UNETS
0793 UNETS
0794 UNETS
0795 UNETS
0796 UNETS
0797 UNETS
0798 UNETS
0799 UNETS
0800 UNETS
0801 UNETS
0802 UNETS
0803 UNETS
0804 UNETS
0805 UNETS
0806 UNETS
0807 UNETS
0808 UNETS
0809 UNETS
0810 UNETS
0811 UNETS
0812 UNETS
0813 UNETS
0814 UNETS
0815 UNETS
0816 UNETS
0817 UNETS
0818 UNETS
0819 UNETS
0820 UNETS
0821 UNETS
0822 UNETS
0823 UNETS
0824 UNETS
0825 UNETS
0826 UNETS
0827 UNETS
0828 UNETS
0829 UNETS
0830 UNETS
0831 UNETS
0832 UNETS
0833 UNETS
0834 UNETS
0835 UNETS
0836 UNETS
0837 UNETS
0838 UNETS
0839 UNETS
0840 UNETS
0841 UNETS
0842 UNETS
0843 UNETS
0844 UNETS
0845 UNETS
0846 UNETS
0847 UNETS
0848 UNETS
0849 UNETS
0850 UNETS
0851 UNETS
0852 UNETS
0853 UNETS
0854 UNETS
0855 UNETS
0856 UNETS
0857 UNETS
0858 UNETS
0859 UNETS
0860 UNETS
0861 UNETS
0862 UNETS
0863 UNETS
0864 UNETS
0865 UNETS
0866 UNETS
0867 UNETS
0868 UNETS
0869 UNETS
0870 UNETS
0871 UNETS
0872 UNETS
0873 UNETS
0874 UNETS
0875 UNETS
0876 UNETS
0877 UNETS
0878 UNETS
0879 UNETS
0880 UNETS
0881 UNETS
0882 UNETS
0883 UNETS
0884 UNETS
0885 UNETS
0886 UNETS
0887 UNETS
0888 UNETS
0889 UNETS
0890 UNETS
0891 UNETS
0892 UNETS
0893 UNETS
0894 UNETS
0895 UNETS
0896 UNETS
0897 UNETS
0898 UNETS
0899 UNETS
0900 UNETS
0901 UNETS
0902 UNETS
0903 UNETS
0904 UNETS
0905 UNETS
0906 UNETS
0907 UNETS
0908 UNETS
0909 UNETS
0910 UNETS
0911 UNETS
0912 UNETS
0913 UNETS
0914 UNETS
0915 UNETS
0916 UNETS
0917 UNETS
0918 UNETS
0919 UNETS
0920 UNETS
0921 UNETS
0922 UNETS
0923 UNETS
0924 UNETS
0925 UNETS
0926 UNETS
0927 UNETS
0928 UNETS
0929 UNETS
0930 UNETS
0931 UNETS
0932 UNETS
0933 UNETS
0934 UNETS
0935 UNETS
0936 UNETS
0937 UNETS
0938 UNETS
0939 UNETS
0940 UNETS
0941 UNETS
0942 UNETS
0943 UNETS
0944 UNETS
0945 UNETS
0946 UNETS
0947 UNETS
0948 UNETS
0949 UNETS
0950 UNETS
0951 UNETS
0952 UNETS
0953 UNETS
0954 UNETS
0955 UNETS
0956 UNETS
0957 UNETS
0958 UNETS
0959 UNETS
0960 UNETS
0961 UNETS
0962 UNETS
0963 UNETS
0964 UNETS
0965 UNETS
0966 UNETS
0967 UNETS
0968 UNETS
0969 UNETS
0970 UNETS
0971 UNETS
0972 UNETS
0973 UNETS
0974 UNETS
0975 UNETS
0976 UNETS
0977 UNETS
0978 UNETS
0979 UNETS
0980 UNETS
0981 UNETS
0982 UNETS
0983 UNETS
0984 UNETS
0985 UNETS
0986 UNETS
0987 UNETS
0988 UNETS
0989 UNETS
0990 UNETS
0991 UNETS
0992 UNETS
0993 UNETS
0994 UNETS
0995 UNETS
0996 UNETS
0997 UNETS
0998 UNETS
0999 UNETS
1000 UNETS

```