

## PHENOPSIS

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

Myriam Dauzat<sup>1</sup>, Anaëlle Dambreville<sup>1</sup>, Justine Bresson<sup>1,4</sup>, Denis Vile<sup>1</sup>, Bertrand Muller<sup>1</sup>, Vincent Nègre<sup>1</sup>, Garance Koch<sup>1</sup>, François Vasseur<sup>1,3</sup>, Alexis Bédiée<sup>1</sup>, Maxence Desigaux<sup>2</sup>, Denis Fourré<sup>2</sup>, Christine Granier<sup>1</sup>

**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).

<sup>1</sup> INRA-LEPSE, 2 place Viala, 34060 Montpellier cedex, France  
[myriam.dauzat@supagro.inra.fr](mailto:myriam.dauzat@supagro.inra.fr)

<sup>2</sup> OPTIMALOG, SARL, 2 rue de la Fontaine de Mié, 37540 Saint Cyr sur Loire, France

<sup>3</sup> adresse actuelle : CEFÉ, 1919, Route de Mende, 34090 Montpellier, France

<sup>4</sup> 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 m<sup>2</sup>, 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 <sup>(1)</sup>. 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

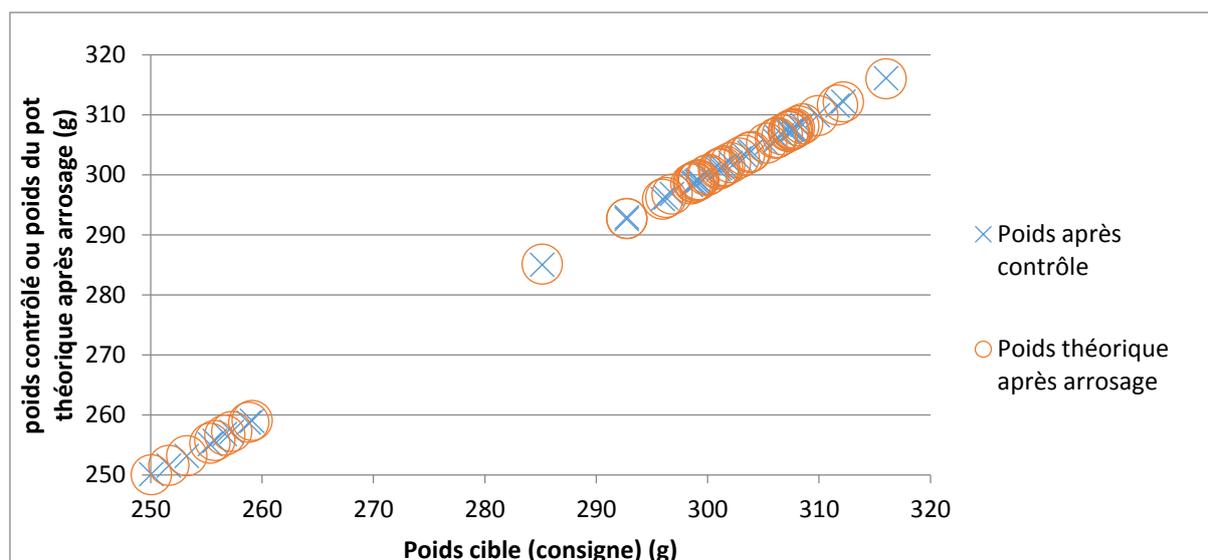
Tout comme sur les pesées, des erreurs sur les apports d'eau peuvent avoir lieu :

- ✓ 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 <sup>(3)</sup>.

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 <sup>(2)</sup>. 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).

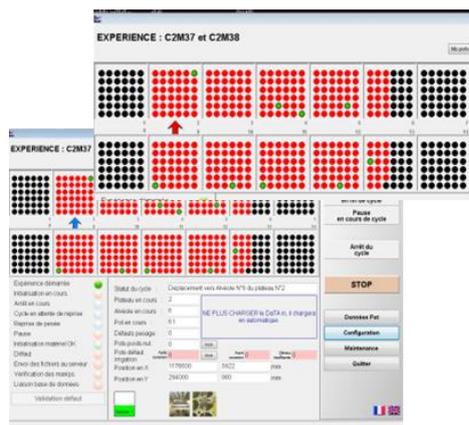
Un message est envoyé en fin de chaque cycle à une ou plusieurs adresses électroniques pour faire le bilan des défauts rencontrés en cours de cycle :

```
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.

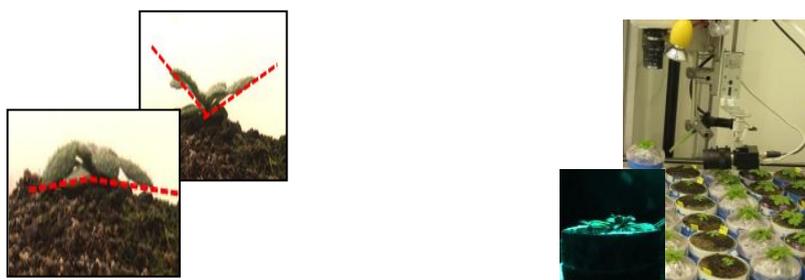
La géométrie du dispositif est souple : la position des pots est interchangeable, les capteurs sont repositionnables (caméras, goutteur, balance) physiquement et/ou via l'interface en X et Y.

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).

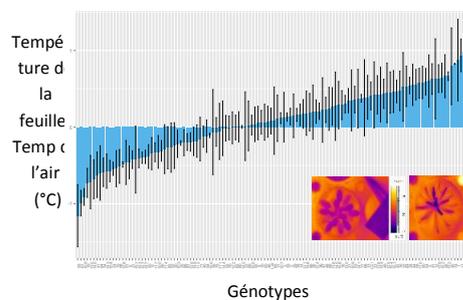
Le fluorimètre par imagerie PAM (Imaging PAM chlorophyll fluorometer, Walz, Germany ) a été adapté pour la mesure de la fluorescence de chlorophylle.

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  $F_v/F_m$  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**).

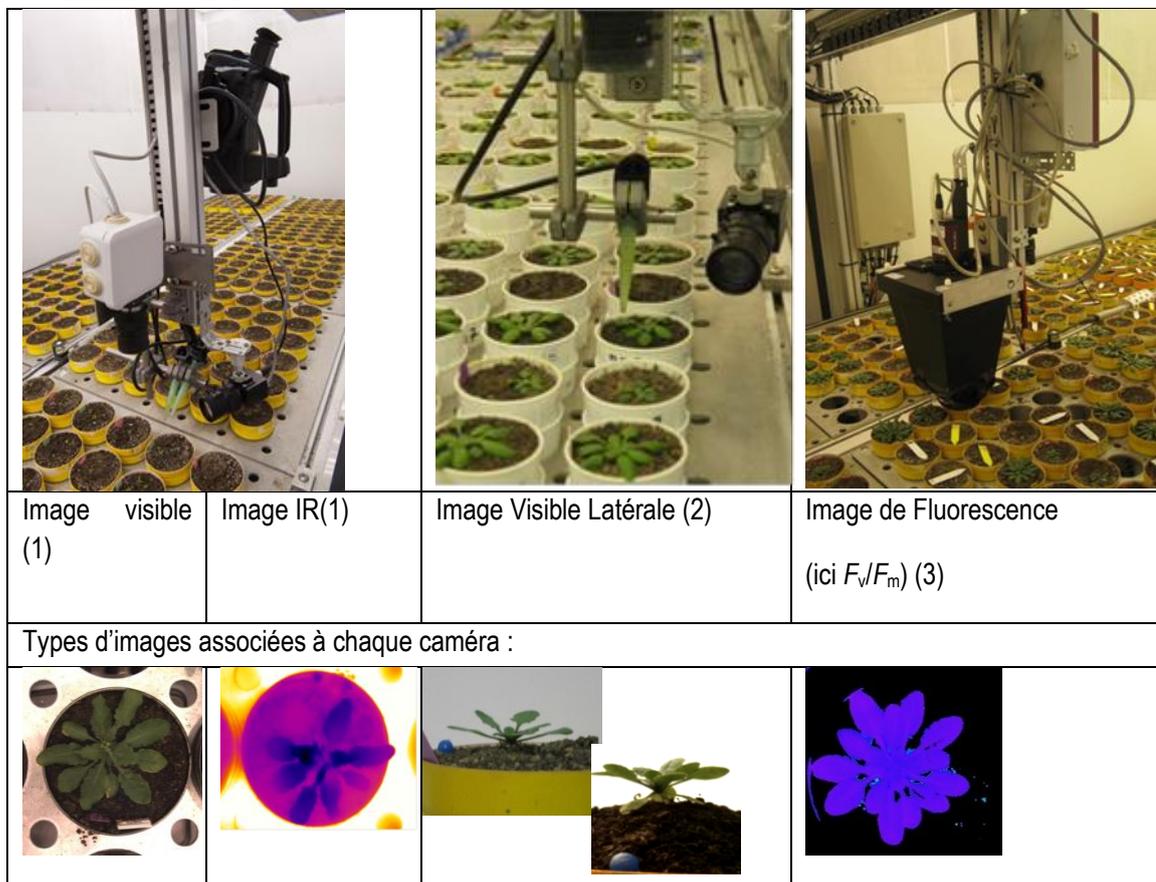


**Graphe 2.** Différence de température entre la feuille et l'air chez une population de lignées recombinantes *Ler x Cvi* chez *Arabidopsis thaliana* (Vasseur, Vile et al., non publié).

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.

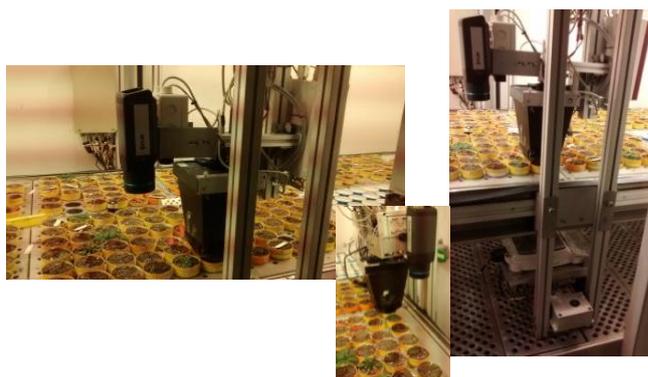
La connexion à l'ordinateur s'effectuait jusqu'à présent par câble FireWire (FLIR ThermoCAM B20HSV). Le câble étant très fragile, il était très difficile de le faire passer dans une chaîne porte câble soumise à de fortes contraintes sur une durée pluri-annuelle. La caméra IR est aujourd'hui connectée 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

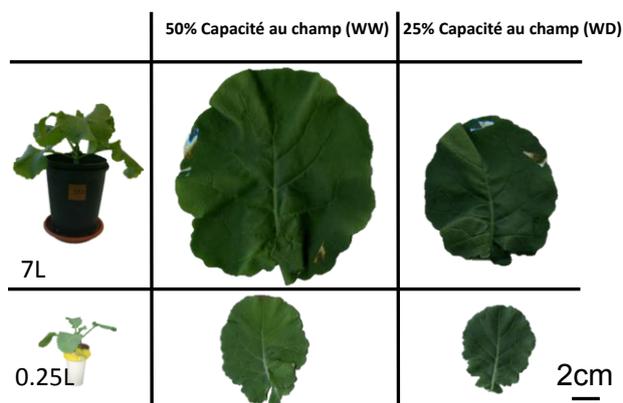
PHENOPSIS est aujourd'hui fortement sollicité pour permettre de cultiver d'autres espèces et répondre à des besoins plus proches de l'agronomie (espèces cultivées), de l'écologie (culture de mélange d'espèces) ou de la

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.

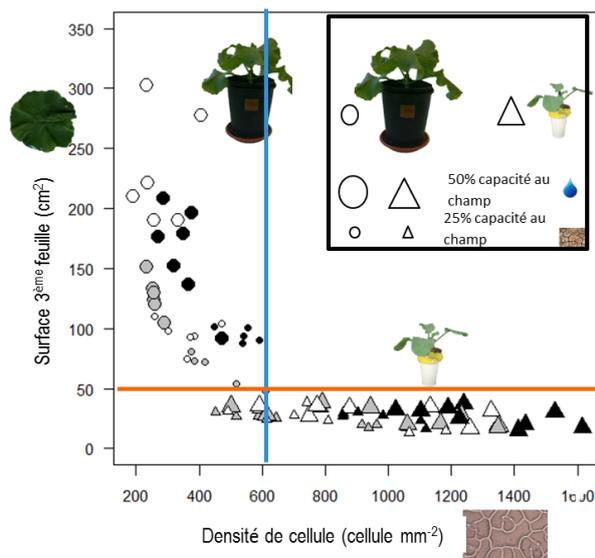


**Photo 9.** (a) Culture de *Brachypodium dystachium* dans PHENOPSIS : possible dans de petits pots, mais de plus grands volumes seraient souhaitables. (b) image latérale de *Brachypodium* prise dans phénopsis.  
(Photos : INRA-Lepse).

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 cm<sup>3</sup>) 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<sup>ème</sup> 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](http://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 Climatation.

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](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](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](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](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	<a href="http://www.campbellsci.co.uk/fr">http://www.campbellsci.co.uk/fr</a>
Lampes : Philips HPI-T Plus 400W Et néons : grolux T8 36W		<a href="https://www.lampesdirect.fr/">https://www.lampesdirect.fr/</a>
Li-Cor	Lincoln, Ne , USA	<a href="Http://www.licor.com">Http://www.licor.com</a>
Skye Instruments	Powys.LD1 6 DF U.K	<a href="http://www.skyeinstruments.com">http://www.skyeinstruments.com</a>
Vaisala	Oy, Helsinki, Finlande	<a href="http://www.vaisala.com">http://www.vaisala.com</a>
Groupe froid	Danfoss Maneurope SA	
Humidificateur	Ambrumesnil 76550 France	<a href="http://www.devatec.com">http://www.devatec.com</a>
Caillebotis	Manutan	<a href="http://www.manutan&amp;é.com">http://www.manutan&amp;é.com</a>

## L'AUTOMATE

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

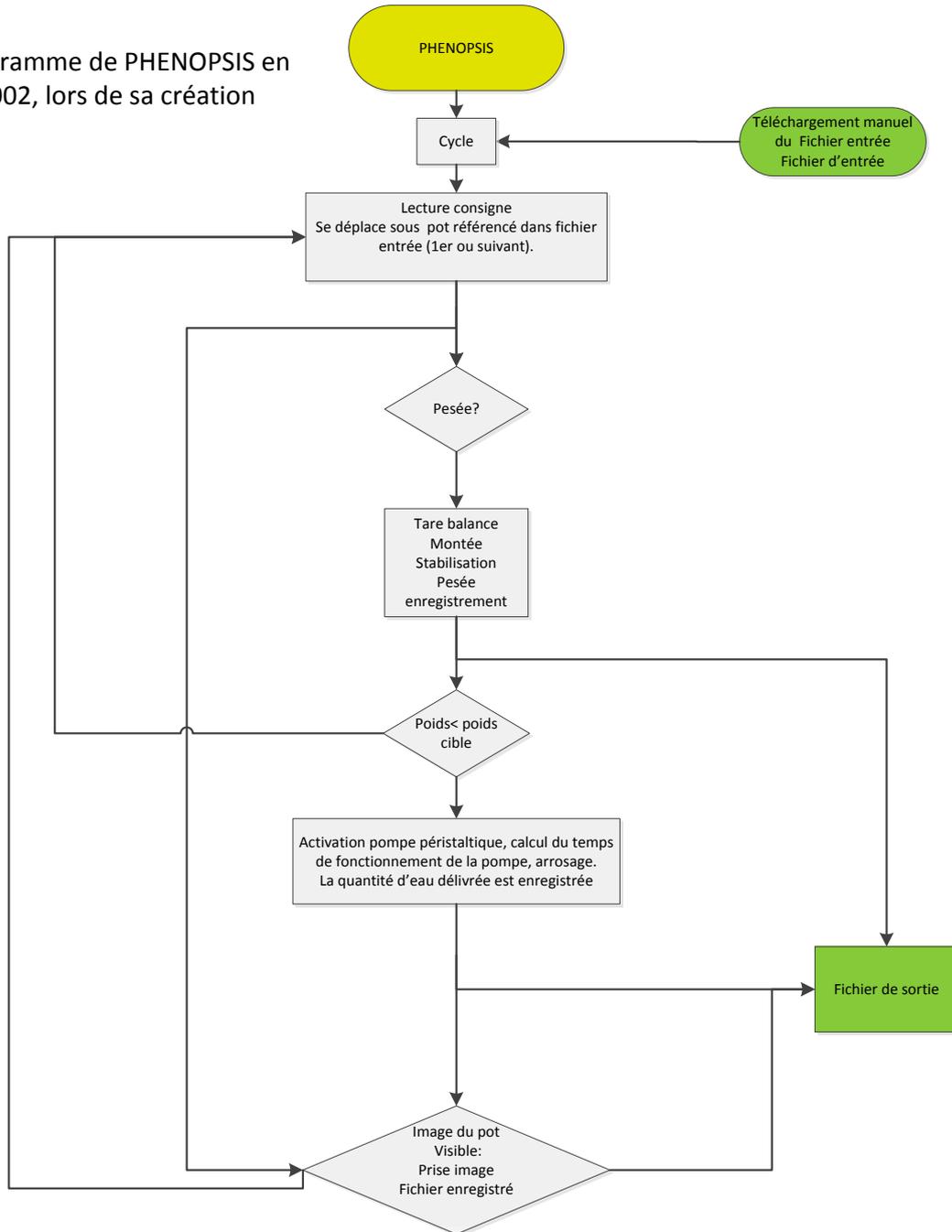
**Caméras supplémentaires sur le bras ayant demandé une adaptation mécanique et logicielle particulière**

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

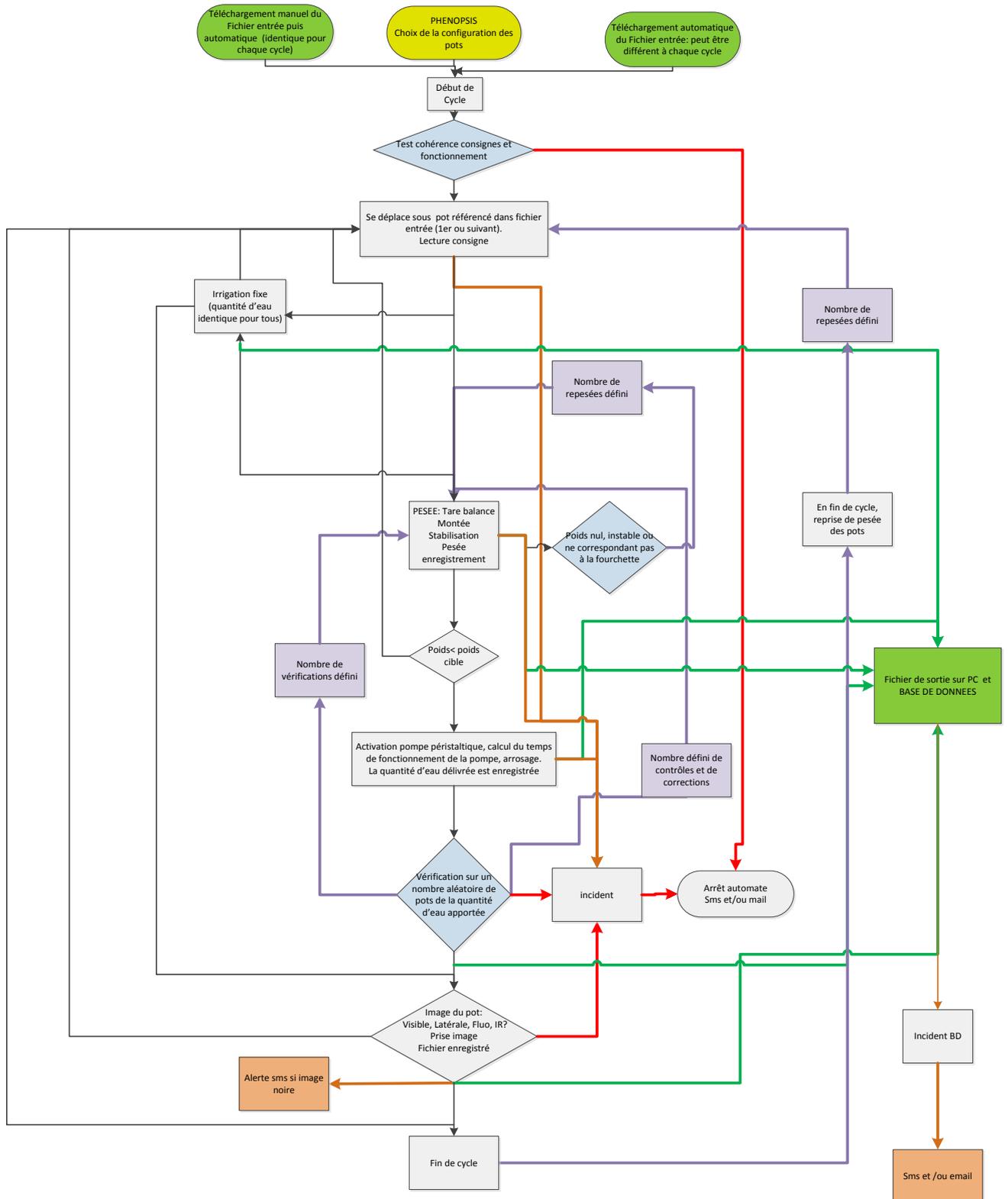
## ANNEXE 2

### 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.



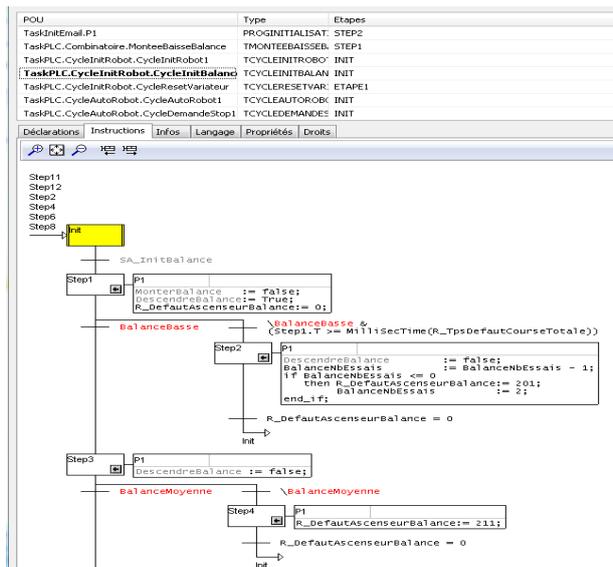
## ANNEXE 3

### 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 automates.

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
TaskInitEnMail	8	OK				10003	0 µs	75 µs	1,6 µs
TaskPLC	8	X	X			840553791	17 µs	366510 µs	44,2 µs
TaskgestionFichiers	9	X	X			13472040	0 µs	33105711 µs	106,5 µs
TaskFinEnMail	8			X	0		0 µs	0 µs	0,0 µs

Expression	Valeur	Type
EN	Vrai (1)	BOOL
ENO	Faux (0)	BOOL
P1		PROG:INITIALISATION
STARTPLCPHASEOK	Vrai (1)	BOOL
STOPPLCPHASEOK	Faux (0)	BOOL

##### Langage littéral :

```

0001 // verification du port serial
0002 IF COM1CONNECTED THEN
0003   COM1WRITE "OK"
0004 ELSE
0005   COM1WRITE "Error"
0006 ENDIF
0007 // Initialisation des variables
0008 InitBalance := FALSE;
0009 InitDescBalance := FALSE;
0010 InitR_DeFautASenseurBalance := 0;
0011 // Initialisation de la balance
0012 IF PrecisaV8_InitialiseMode(ComNum, 1) THEN
0013   ComNum := 1;
0014 ELSE
0015   ComNum := 2;
0016 ENDIF
0017 // verif de la balance
0018 IF PrecisaV8_IsStableMode(ComNum, 1) THEN
0019   ComNum := 1;
0020 ELSE
0021   ComNum := 2;
0022 ENDIF
0023 // verif de la balance
0024 IF PrecisaV8_IsStableMode(ComNum, 2) THEN
0025   ComNum := 2;
0026 ELSE
0027   ComNum := 1;
0028 ENDIF
0029 // affichage de la chaîne d'information
0030 WriteLn(Info);
0031 ENDIF
0032 ENDIF
0033 ENDIF
0034 ENDIF
0035 ENDIF
0036 ENDIF
0037 ENDIF
0038 ENDIF
0039 ENDIF
0040 ENDIF
0041 ENDIF
0042 ENDIF
0043 ENDIF
0044 ENDIF
0045 ENDIF
0046 ENDIF
0047 ENDIF
0048 ENDIF
0049 ENDIF
0050 ENDIF
0051 ENDIF
0052 ENDIF
0053 ENDIF
0054 ENDIF
0055 ENDIF
0056 ENDIF
0057 ENDIF
0058 ENDIF
0059 ENDIF
0060 ENDIF
0061 ENDIF
0062 ENDIF
0063 ENDIF
0064 ENDIF
0065 ENDIF
0066 ENDIF
0067 ENDIF
0068 ENDIF
0069 ENDIF
0070 ENDIF
0071 ENDIF
0072 ENDIF
0073 ENDIF
0074 ENDIF
0075 ENDIF
0076 ENDIF
0077 ENDIF
0078 ENDIF
0079 ENDIF
0080 ENDIF
0081 ENDIF
0082 ENDIF
0083 ENDIF
0084 ENDIF
0085 ENDIF
0086 ENDIF
0087 ENDIF
0088 ENDIF
0089 ENDIF
0090 ENDIF
0091 ENDIF
0092 ENDIF
0093 ENDIF
0094 ENDIF
0095 ENDIF
0096 ENDIF
0097 ENDIF
0098 ENDIF
0099 ENDIF
0100 ENDIF
0101 ENDIF
0102 ENDIF
0103 ENDIF
0104 ENDIF
0105 ENDIF
0106 ENDIF
0107 ENDIF
0108 ENDIF
0109 ENDIF
0110 ENDIF
0111 ENDIF
0112 ENDIF
0113 ENDIF
0114 ENDIF
0115 ENDIF
0116 ENDIF
0117 ENDIF
0118 ENDIF
0119 ENDIF
0120 ENDIF
0121 ENDIF
0122 ENDIF
0123 ENDIF
0124 ENDIF
0125 ENDIF
0126 ENDIF
0127 ENDIF
0128 ENDIF
0129 ENDIF
0130 ENDIF
0131 ENDIF
0132 ENDIF
0133 ENDIF
0134 ENDIF
0135 ENDIF
0136 ENDIF
0137 ENDIF
0138 ENDIF
0139 ENDIF
0140 ENDIF
0141 ENDIF
0142 ENDIF
0143 ENDIF
0144 ENDIF
0145 ENDIF
0146 ENDIF
0147 ENDIF
0148 ENDIF
0149 ENDIF
0150 ENDIF
0151 ENDIF
0152 ENDIF
0153 ENDIF
0154 ENDIF
0155 ENDIF
0156 ENDIF
0157 ENDIF
0158 ENDIF
0159 ENDIF
0160 ENDIF
0161 ENDIF
0162 ENDIF
0163 ENDIF
0164 ENDIF
0165 ENDIF
0166 ENDIF
0167 ENDIF
0168 ENDIF
0169 ENDIF
0170 ENDIF
0171 ENDIF
0172 ENDIF
0173 ENDIF
0174 ENDIF
0175 ENDIF
0176 ENDIF
0177 ENDIF
0178 ENDIF
0179 ENDIF
0180 ENDIF
0181 ENDIF
0182 ENDIF
0183 ENDIF
0184 ENDIF
0185 ENDIF
0186 ENDIF
0187 ENDIF
0188 ENDIF
0189 ENDIF
0190 ENDIF
0191 ENDIF
0192 ENDIF
0193 ENDIF
0194 ENDIF
0195 ENDIF
0196 ENDIF
0197 ENDIF
0198 ENDIF
0199 ENDIF
0200 ENDIF
0201 ENDIF
0202 ENDIF
0203 ENDIF
0204 ENDIF
0205 ENDIF
0206 ENDIF
0207 ENDIF
0208 ENDIF
0209 ENDIF
0210 ENDIF
0211 ENDIF
0212 ENDIF
0213 ENDIF
0214 ENDIF
0215 ENDIF
0216 ENDIF
0217 ENDIF
0218 ENDIF
0219 ENDIF
0220 ENDIF
0221 ENDIF
0222 ENDIF
0223 ENDIF
0224 ENDIF
0225 ENDIF
0226 ENDIF
0227 ENDIF
0228 ENDIF
0229 ENDIF
0230 ENDIF
0231 ENDIF
0232 ENDIF
0233 ENDIF
0234 ENDIF
0235 ENDIF
0236 ENDIF
0237 ENDIF
0238 ENDIF
0239 ENDIF
0240 ENDIF
0241 ENDIF
0242 ENDIF
0243 ENDIF
0244 ENDIF
0245 ENDIF
0246 ENDIF
0247 ENDIF
0248 ENDIF
0249 ENDIF
0250 ENDIF
0251 ENDIF
0252 ENDIF
0253 ENDIF
0254 ENDIF
0255 ENDIF
0256 ENDIF
0257 ENDIF
0258 ENDIF
0259 ENDIF
0260 ENDIF
0261 ENDIF
0262 ENDIF
0263 ENDIF
0264 ENDIF
0265 ENDIF
0266 ENDIF
0267 ENDIF
0268 ENDIF
0269 ENDIF
0270 ENDIF
0271 ENDIF
0272 ENDIF
0273 ENDIF
0274 ENDIF
0275 ENDIF
0276 ENDIF
0277 ENDIF
0278 ENDIF
0279 ENDIF
0280 ENDIF
0281 ENDIF
0282 ENDIF
0283 ENDIF
0284 ENDIF
0285 ENDIF
0286 ENDIF
0287 ENDIF
0288 ENDIF
0289 ENDIF
0290 ENDIF
0291 ENDIF
0292 ENDIF
0293 ENDIF
0294 ENDIF
0295 ENDIF
0296 ENDIF
0297 ENDIF
0298 ENDIF
0299 ENDIF
0300 ENDIF
0301 ENDIF
0302 ENDIF
0303 ENDIF
0304 ENDIF
0305 ENDIF
0306 ENDIF
0307 ENDIF
0308 ENDIF
0309 ENDIF
0310 ENDIF
0311 ENDIF
0312 ENDIF
0313 ENDIF
0314 ENDIF
0315 ENDIF
0316 ENDIF
0317 ENDIF
0318 ENDIF
0319 ENDIF
0320 ENDIF
0321 ENDIF
0322 ENDIF
0323 ENDIF
0324 ENDIF
0325 ENDIF
0326 ENDIF
0327 ENDIF
0328 ENDIF
0329 ENDIF
0330 ENDIF
0331 ENDIF
0332 ENDIF
0333 ENDIF
0334 ENDIF
0335 ENDIF
0336 ENDIF
0337 ENDIF
0338 ENDIF
0339 ENDIF
0340 ENDIF
0341 ENDIF
0342 ENDIF
0343 ENDIF
0344 ENDIF
0345 ENDIF
0346 ENDIF
0347 ENDIF
0348 ENDIF
0349 ENDIF
0350 ENDIF
0351 ENDIF
0352 ENDIF
0353 ENDIF
0354 ENDIF
0355 ENDIF
0356 ENDIF
0357 ENDIF
0358 ENDIF
0359 ENDIF
0360 ENDIF
0361 ENDIF
0362 ENDIF
0363 ENDIF
0364 ENDIF
0365 ENDIF
0366 ENDIF
0367 ENDIF
0368 ENDIF
0369 ENDIF
0370 ENDIF
0371 ENDIF
0372 ENDIF
0373 ENDIF
0374 ENDIF
0375 ENDIF
0376 ENDIF
0377 ENDIF
0378 ENDIF
0379 ENDIF
0380 ENDIF
0381 ENDIF
0382 ENDIF
0383 ENDIF
0384 ENDIF
0385 ENDIF
0386 ENDIF
0387 ENDIF
0388 ENDIF
0389 ENDIF
0390 ENDIF
0391 ENDIF
0392 ENDIF
0393 ENDIF
0394 ENDIF
0395 ENDIF
0396 ENDIF
0397 ENDIF
0398 ENDIF
0399 ENDIF
0400 ENDIF
0401 ENDIF
0402 ENDIF
0403 ENDIF
0404 ENDIF
0405 ENDIF
0406 ENDIF
0407 ENDIF
0408 ENDIF
0409 ENDIF
0410 ENDIF
0411 ENDIF
0412 ENDIF
0413 ENDIF
0414 ENDIF
0415 ENDIF
0416 ENDIF
0417 ENDIF
0418 ENDIF
0419 ENDIF
0420 ENDIF
0421 ENDIF
0422 ENDIF
0423 ENDIF
0424 ENDIF
0425 ENDIF
0426 ENDIF
0427 ENDIF
0428 ENDIF
0429 ENDIF
0430 ENDIF
0431 ENDIF
0432 ENDIF
0433 ENDIF
0434 ENDIF
0435 ENDIF
0436 ENDIF
0437 ENDIF
0438 ENDIF
0439 ENDIF
0440 ENDIF
0441 ENDIF
0442 ENDIF
0443 ENDIF
0444 ENDIF
0445 ENDIF
0446 ENDIF
0447 ENDIF
0448 ENDIF
0449 ENDIF
0450 ENDIF
0451 ENDIF
0452 ENDIF
0453 ENDIF
0454 ENDIF
0455 ENDIF
0456 ENDIF
0457 ENDIF
0458 ENDIF
0459 ENDIF
0460 ENDIF
0461 ENDIF
0462 ENDIF
0463 ENDIF
0464 ENDIF
0465 ENDIF
0466 ENDIF
0467 ENDIF
0468 ENDIF
0469 ENDIF
0470 ENDIF
0471 ENDIF
0472 ENDIF
0473 ENDIF
0474 ENDIF
0475 ENDIF
0476 ENDIF
0477 ENDIF
0478 ENDIF
0479 ENDIF
0480 ENDIF
0481 ENDIF
0482 ENDIF
0483 ENDIF
0484 ENDIF
0485 ENDIF
0486 ENDIF
0487 ENDIF
0488 ENDIF
0489 ENDIF
0490 ENDIF
0491 ENDIF
0492 ENDIF
0493 ENDIF
0494 ENDIF
0495 ENDIF
0496 ENDIF
0497 ENDIF
0498 ENDIF
0499 ENDIF
0500 ENDIF
0501 ENDIF
0502 ENDIF
0503 ENDIF
0504 ENDIF
0505 ENDIF
0506 ENDIF
0507 ENDIF
0508 ENDIF
0509 ENDIF
0510 ENDIF
0511 ENDIF
0512 ENDIF
0513 ENDIF
0514 ENDIF
0515 ENDIF
0516 ENDIF
0517 ENDIF
0518 ENDIF
0519 ENDIF
0520 ENDIF
0521 ENDIF
0522 ENDIF
0523 ENDIF
0524 ENDIF
0525 ENDIF
0526 ENDIF
0527 ENDIF
0528 ENDIF
0529 ENDIF
0530 ENDIF
0531 ENDIF
0532 ENDIF
0533 ENDIF
0534 ENDIF
0535 ENDIF
0536 ENDIF
0537 ENDIF
0538 ENDIF
0539 ENDIF
0540 ENDIF
0541 ENDIF
0542 ENDIF
0543 ENDIF
0544 ENDIF
0545 ENDIF
0546 ENDIF
0547 ENDIF
0548 ENDIF
0549 ENDIF
0550 ENDIF
0551 ENDIF
0552 ENDIF
0553 ENDIF
0554 ENDIF
0555 ENDIF
0556 ENDIF
0557 ENDIF
0558 ENDIF
0559 ENDIF
0560 ENDIF
0561 ENDIF
0562 ENDIF
0563 ENDIF
0564 ENDIF
0565 ENDIF
0566 ENDIF
0567 ENDIF
0568 ENDIF
0569 ENDIF
0570 ENDIF
0571 ENDIF
0572 ENDIF
0573 ENDIF
0574 ENDIF
0575 ENDIF
0576 ENDIF
0577 ENDIF
0578 ENDIF
0579 ENDIF
0580 ENDIF
0581 ENDIF
0582 ENDIF
0583 ENDIF
0584 ENDIF
0585 ENDIF
0586 ENDIF
0587 ENDIF
0588 ENDIF
0589 ENDIF
0590 ENDIF
0591 ENDIF
0592 ENDIF
0593 ENDIF
0594 ENDIF
0595 ENDIF
0596 ENDIF
0597 ENDIF
0598 ENDIF
0599 ENDIF
0600 ENDIF
0601 ENDIF
0602 ENDIF
0603 ENDIF
0604 ENDIF
0605 ENDIF
0606 ENDIF
0607 ENDIF
0608 ENDIF
0609 ENDIF
0610 ENDIF
0611 ENDIF
0612 ENDIF
0613 ENDIF
0614 ENDIF
0615 ENDIF
0616 ENDIF
0617 ENDIF
0618 ENDIF
0619 ENDIF
0620 ENDIF
0621 ENDIF
0622 ENDIF
0623 ENDIF
0624 ENDIF
0625 ENDIF
0626 ENDIF
0627 ENDIF
0628 ENDIF
0629 ENDIF
0630 ENDIF
0631 ENDIF
0632 ENDIF
0633 ENDIF
0634 ENDIF
0635 ENDIF
0636 ENDIF
0637 ENDIF
0638 ENDIF
0639 ENDIF
0640 ENDIF
0641 ENDIF
0642 ENDIF
0643 ENDIF
0644 ENDIF
0645 ENDIF
0646 ENDIF
0647 ENDIF
0648 ENDIF
0649 ENDIF
0650 ENDIF
0651 ENDIF
0652 ENDIF
0653 ENDIF
0654 ENDIF
0655 ENDIF
0656 ENDIF
0657 ENDIF
0658 ENDIF
0659 ENDIF
0660 ENDIF
0661 ENDIF
0662 ENDIF
0663 ENDIF
0664 ENDIF
0665 ENDIF
0666 ENDIF
0667 ENDIF
0668 ENDIF
0669 ENDIF
0670 ENDIF
0671 ENDIF
0672 ENDIF
0673 ENDIF
0674 ENDIF
0675 ENDIF
0676 ENDIF
0677 ENDIF
0678 ENDIF
0679 ENDIF
0680 ENDIF
0681 ENDIF
0682 ENDIF
0683 ENDIF
0684 ENDIF
0685 ENDIF
0686 ENDIF
0687 ENDIF
0688 ENDIF
0689 ENDIF
0690 ENDIF
0691 ENDIF
0692 ENDIF
0693 ENDIF
0694 ENDIF
0695 ENDIF
0696 ENDIF
0697 ENDIF
0698 ENDIF
0699 ENDIF
0700 ENDIF
0701 ENDIF
0702 ENDIF
0703 ENDIF
0704 ENDIF
0705 ENDIF
0706 ENDIF
0707 ENDIF
0708 ENDIF
0709 ENDIF
0710 ENDIF
0711 ENDIF
0712 ENDIF
0713 ENDIF
0714 ENDIF
0715 ENDIF
0716 ENDIF
0717 ENDIF
0718 ENDIF
0719 ENDIF
0720 ENDIF
0721 ENDIF
0722 ENDIF
0723 ENDIF
0724 ENDIF
0725 ENDIF
0726 ENDIF
0727 ENDIF
0728 ENDIF
0729 ENDIF
0730 ENDIF
0731 ENDIF
0732 ENDIF
0733 ENDIF
0734 ENDIF
0735 ENDIF
0736 ENDIF
0737 ENDIF
0738 ENDIF
0739 ENDIF
0740 ENDIF
0741 ENDIF
0742 ENDIF
0743 ENDIF
0744 ENDIF
0745 ENDIF
0746 ENDIF
0747 ENDIF
0748 ENDIF
0749 ENDIF
0750 ENDIF
0751 ENDIF
0752 ENDIF
0753 ENDIF
0754 ENDIF
0755 ENDIF
0756 ENDIF
0757 ENDIF
0758 ENDIF
0759 ENDIF
0760 ENDIF
0761 ENDIF
0762 ENDIF
0763 ENDIF
0764 ENDIF
0765 ENDIF
0766 ENDIF
0767 ENDIF
0768 ENDIF
0769 ENDIF
0770 ENDIF
0771 ENDIF
0772 ENDIF
0773 ENDIF
0774 ENDIF
0775 ENDIF
0776 ENDIF
0777 ENDIF
0778 ENDIF
0779 ENDIF
0780 ENDIF
0781 ENDIF
0782 ENDIF
0783 ENDIF
0784 ENDIF
0785 ENDIF
0786 ENDIF
0787 ENDIF
0788 ENDIF
0789 ENDIF
0790 ENDIF
0791 ENDIF
0792 ENDIF
0793 ENDIF
0794 ENDIF
0795 ENDIF
0796 ENDIF
0797 ENDIF
0798 ENDIF
0799 ENDIF
0800 ENDIF
0801 ENDIF
0802 ENDIF
0803 ENDIF
0804 ENDIF
0805 ENDIF
0806 ENDIF
0807 ENDIF
0808 ENDIF
0809 ENDIF
0810 ENDIF
0811 ENDIF
0812 ENDIF
0813 ENDIF
0814 ENDIF
0815 ENDIF
0816 ENDIF
0817 ENDIF
0818 ENDIF
0819 ENDIF
0820 ENDIF
0821 ENDIF
0822 ENDIF
0823 ENDIF
0824 ENDIF
0825 ENDIF
0826 ENDIF
0827 ENDIF
0828 ENDIF
0829 ENDIF
0830 ENDIF
0831 ENDIF
0832 ENDIF
0833 ENDIF
0834 ENDIF
0835 ENDIF
0836 ENDIF
0837 ENDIF
0838 ENDIF
0839 ENDIF
0840 ENDIF
0841 ENDIF
0842 ENDIF
0843 ENDIF
0844 ENDIF
0845 ENDIF
0846 ENDIF
0847 ENDIF
0848 ENDIF
0849 ENDIF
0850 ENDIF
0851 ENDIF
0852 ENDIF
0853 ENDIF
0854 ENDIF
0855 ENDIF
0856 ENDIF
0857 ENDIF
0858 ENDIF
0859 ENDIF
0860 ENDIF
0861 ENDIF
0862 ENDIF
0863 ENDIF
0864 ENDIF
0865 ENDIF
0866 ENDIF
0867 ENDIF
0868 ENDIF
0869 ENDIF
0870 ENDIF
0871 ENDIF
0872 ENDIF
0873 ENDIF
0874 ENDIF
0875 ENDIF
0876 ENDIF
0877 ENDIF
0878 ENDIF
0879 ENDIF
0880 ENDIF
0881 ENDIF
0882 ENDIF
0883 ENDIF
0884 ENDIF
0885 ENDIF
0886 ENDIF
0887 ENDIF
0888 ENDIF
0889 ENDIF
0890 ENDIF
0891 ENDIF
0892 ENDIF
0893 ENDIF
0894 ENDIF
0895 ENDIF
0896 ENDIF
0897 ENDIF
0898 ENDIF
0899 ENDIF
0900 ENDIF
0901 ENDIF
0902 ENDIF
0903 ENDIF
0904 ENDIF
0905 ENDIF
0906 ENDIF
0907 ENDIF
0908 ENDIF
0909 ENDIF
0910 ENDIF
0911 ENDIF
0912 ENDIF
0913 ENDIF
0914 ENDIF
0915 ENDIF
0916 ENDIF
0917 ENDIF
0918 ENDIF
0919 ENDIF
0920 ENDIF
0921 ENDIF
0922 ENDIF
0923 ENDIF
0924 ENDIF
0925 ENDIF
0926 ENDIF
0927 ENDIF
0928 ENDIF
0929 ENDIF
0930 ENDIF
0931 ENDIF
0932 ENDIF
0933 ENDIF
0934 ENDIF
0935 ENDIF
0936 ENDIF
0937 ENDIF
0938 ENDIF
0939 ENDIF
0940 ENDIF
0941 ENDIF
0942 ENDIF
0943 ENDIF
0944 ENDIF
0945 ENDIF
0946 ENDIF
0947 ENDIF
0948 ENDIF
0949 ENDIF
0950 ENDIF
0951 ENDIF
0952 ENDIF
0953 ENDIF
0954 ENDIF
0955 ENDIF
0956 ENDIF
0957 ENDIF
0958 ENDIF
0959 ENDIF
0960 ENDIF
0961 ENDIF
0962 ENDIF
0963 ENDIF
0964 ENDIF
0965 ENDIF
0966 ENDIF
0967 ENDIF
0968 ENDIF
0969 ENDIF
0970 ENDIF
0971 ENDIF
0972 ENDIF
0973 ENDIF
0974 ENDIF
0975 ENDIF
0976 ENDIF
0977 ENDIF
0978 ENDIF
0979 ENDIF
0980 ENDIF
0981 ENDIF
0982 ENDIF
0983 ENDIF
0984 ENDIF
0985 ENDIF
0986 ENDIF
0987 ENDIF
0988 ENDIF
0989 ENDIF
0990 ENDIF
0991 ENDIF
0992 ENDIF
0993 ENDIF
0994 ENDIF
0995 ENDIF
0996 ENDIF
0997 ENDIF
0998 ENDIF
0999 ENDIF
1000 ENDIF

```