

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE  
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PAR ARTICLES PRÉSENTÉ À  
L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
À L'OBTENTION DE LA  
MAÎTRISE EN GÉNIE ÉLECTRIQUE  
M. Ing.

PAR  
Talal ABBOUD

SYSTÈMES D'IMAGERIE POUR L'ÉTUDE DE LA SANTÉ DES PLANTES ET LA  
BIOLOGIE SPATIALE

MONTREAL, LE 11 JUIN 2013



Talal Abboud 2013



Cette licence [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de mentionner l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

**PRÉSENTATION DU JURY**  
CETTE MÉMOIRE A ÉTÉ ÉVALUÉE  
PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

Mme Rita Noumeir directeur de mémoire  
Département de génie électrique à l'École de technologie supérieure

M. Alain Berinstain, examinateur externe et codirecteur de mémoire  
Agence Spatiale Canadienne

M. Mohamed Cheriet président du jury  
Département de génie de la production automatisée à l'École de technologie supérieure

M. Sylvain Cloutier membre du jury  
Département de génie électrique à l'École de technologie supérieure

IL A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 30 MAI 2013

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE



## REMERCIEMENTS

J'adresse ma reconnaissance à l'Agence Spatiale Canadienne, pour le soutien financier, sans lequel ce travail n'aurait pu être réalisé.

Je tiens à remercier ma directrice de recherche Rita Noumeir Ph.D. pour son suivi, son soutien et ses précieux conseils tout au long de ma maîtrise.

Il est aussi important pour moi de remercier tous les professeurs de l'ÉTS qui m'ont transmis un enseignement de qualité au cours des quatre années de mon BAC ainsi que mes deux années de maîtrise.

Je remercie mon superviseur à l'Agence Spatial Canadienne, Alain Berinstain Ph.D. et mes chers collègues Matthew Bamsey Ph.D. et Myriam Lemelin pour tous leurs aides, supports et bonnes idées qu'ils m'ont apportées et sans lesquels ce projet n'aurait pu être accompli.

Je désire remercier Robert Ferl Ph.D. et Anna-Lisa Paul Ph.D. de l'Université de Floride pour toute l'information fournit sur les plantes, ainsi les concepts et exigences pour la conception des prototypes décrits dans ce document.

Je remercie Tom, Mike Dixon Ph.D. et Demos Ph.D. de l'Université de Guelph, pour leur aide et contribution avec les chambres hypobarique.

Je remercie également Pierre Lortie, Ralph Nolting et Maxime Pépin-Thivierge du laboratoire de fabrication mécanique pour avoir contribué à la conception mécanique et à la construction des prototypes.

Merci à Rémy Grenier, Diane Leduc et Jean-Étienne Lavallée des Laboratoires des charges utiles spatiales, pour leur sympathie et leur gentillesse.

Enfin, je dédie ce travail ma mère Iman El-Jabi, mon père Mohammad Salim Abboud, ma conjointe Dalia El-Charif ainsi à toute ma famille pour leurs patience, soutien et encouragement. Que ces lignes leur témoignent toute ma reconnaissance.



# SYSTÈMES D'IMAGERIE POUR L'ÉTUDE DE LA SANTÉ DES PLANTES ET LA BIOLOGIE SPATIALE

Talal Abboud

## RÉSUMÉ

L'utilisation des plantes comme partie intégrante des systèmes de soutien de la vie fait partie des stratégies pour rendre possible l'habitation humaine dans l'espace, les voyages de longue durée et la colonisation extraterrestre. L'Agence spatiale canadienne étudie la possibilité de permettre la présence humaine sur la Lune et/ou Mars en implantant des serres, agissant comme un système de recyclage en boucle fermée, qui fournirait les éléments essentiels (O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et nourriture) et assurerait la survie des astronautes. En ce sens, il est important de développer un système de surveillance permettant d'observer l'état des cultures en temps réel et d'agir immédiatement avant que la situation des plantes ne devienne critique. L'analyse de fluorescence de la chlorophylle des plantes est devenue l'une des techniques les plus puissantes et les plus utilisées par les physiologistes des végétaux et les écophysiologistes. La mesure de l'intensité de cette fluorescence pour examiner le rendement photosynthétique des plantes est maintenant répandue dans l'étude de leur santé. En plus de la fluorescence naturelle, des plants génétiquement modifiés contenant des gènes de protéine verte fluorescente (PVF) fusionnés à leurs gènes révélateurs ont été développés afin de servir de capteurs biologiques pour la surveillance de plusieurs sources de stress.

Dans ce mémoire, nous proposons deux prototypes d'imagerie qui examinent la santé des plantes et un algorithme de segmentation d'image de plantes capturées par les prototypes. Chaque prototype a été conçu selon des prérequis spécifiques aux besoins de l'étude et de l'environnement où le système est déployé. Le premier prototype conçu pour la capture de la PVF a été déployé à la station de recherche Haughton Mars, dans le Haut-Arctique Canadien (île Devon, au Nunavut), où la seule source d'énergie fournit du courant continu et vient d'un système d'énergie renouvelable (éoliennes, panneaux solaires et un jeu de batteries). Sur l'île Devon, le soleil est absent vingt-quatre heures par jour en hiver et les températures varient entre moins cinquante et moins soixante-dix degrés Celsius. L'objectif de capturer la fluorescence des plantes a été accompli avec succès de façon autonome pendant une année entière et en absence d'humain. Les commandes et les données ont été envoyées à travers le système de communication par satellite de la serre. Le deuxième prototype est un système multispectral conçu pour capturer la PVF et autres, comme la fluorescence naturelle, chlorophylles rouges et proches de l'infrarouge. Le système a été déployé dans une chambre hypobarique à l'Université de Guelph, en Ontario. Il a réussi à capturer les différentes fluorescences émises par les plantes en temps réel à une pression de 5 kPa à des intervalles définis et de façon autonome. Finalement, l'objectif de simplifier l'analyse des images capturées par les systèmes en discriminant les différentes parties de la plante a été accompli avec un taux d'erreur de 8.75% et un temps de classification de seulement 35 sec.

**Mots-clés :** Système d'imagerie multispectral, santé des plantes, segmentation, classification, reconnaissance de forme, soutien de vie dans l'espace, exploration Lune/Mars.





# PLANT HEALTH IMAGING SYSTEMS FOR SPACE BIOLOGY AND PLANT GROWTH STUDIES

Talal Abboud

## ABSTRACT

The use of plants as part of life support systems remains the basis of strategies for sustained human presence in space. The fundamental concept is the use of plants to regenerate air, water and food. The Canadian Space Agency has been involved in assessing the possibility of supporting human presence on the Moon and Mars by deploying greenhouses as plant production system test-beds. There originates the importance of understanding the metabolic issues that can influence plant growth and development in space. Plant monitoring systems with the capacity to observe the condition of the crop in real-time within these systems would permit operators to take immediate action to ensure optimum system yield and reliability. This work involved the design and development of two independent fluorescence plant health imager systems with one deployed into an Arctic greenhouse and the second within hypobaric plant growth chambers. In addition, an algorithm that segments the different parts of the plant images captured by the imagers was developed. Plant monitoring systems with the capacity to observe the condition of the crop, using biological sensors, in real-time such as those presented in this thesis would permit space-based or terrestrial greenhouse growers to take immediate action to ensure optimum system plant yields and reliability. The first imager was designed to capture genetically modified plants containing green fluorescent proteins fused to their revealing genes that have been developed as biological sensors for monitoring multiple sources of crop stress. The imager hardware included the custom designed LED grow and excitation light boards, filters, data acquisition, control system, basic sensing and environmental control are tested at the duplicated greenhouse and subsequently was deployed in the High Arctic in 2010. The imager ran autonomously in the un-crewed greenhouse with commanding through satellite control system, images were saved locally in high resolution and sent telemetrically south in low resolution. A second imager was deployed and collected fluorescence imaging data during several plant growth trials within in hypobaric chambers at the University of Guelph. The second prototype is a multispectral imaging system able to capture several wavelengths using a liquid crystal tunable filter; the main advantage is the ability to capture not only the green fluorescent protein, but also the natural red and near infrared chlorophyll fluorescence. The second improvement is the independently variables photosynthesis wavelengths lights that provide the biosensor the appropriate dose and ratio of lights. This system has been deployed in a hypobaric chamber to analyze plant gene expression at low pressure (5kPa) hypobaric environment simulating space. Furthermore, an algorithm was written using pattern recognition technique that segments the different parts of the plant and was successfully able to distinguish each image pixel between the leaves, stems, roots and the image background.

**Keywords:** plant health imaging, multispectral imaging, remote sensor, biological life support, space analogue, segmentation, classification, pattern recognition.



## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION .....	1
REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	9
CHAPITRE 1      DEPLOYMENT OF A FULLY-AUTOMATED GREEN FLUORESCENT PROTEIN IMAGING SYSTEM IN A HIGH ARCTIC AUTONOMOUS GREENHOUSE.....	13
1.1      Abstract.....	14
1.2      Introduction.....	14
1.3      Materials and Methods.....	17
1.3.1      Fundamental Excitation System Requirements .....	18
1.3.2      Fundamental Emission Image Capture Requirements.....	18
1.3.3      Arthur Clarke Mars Greenhouse.....	19
1.4      GFP Imager.....	20
1.4.1      Hardware.....	21
1.4.2      Software .....	24
1.4.3      Grow Lights .....	26
1.4.4      Fluorescent Excitation Lights .....	29
1.5      Results and Discussion .....	30
1.6      Conclusions.....	36
1.7      Acknowledgements.....	37
CHAPITRE 2      MULTISPECTRAL PLANT HEALTH IMAGING SYSTEM FOR SPACE BIOLOGY AND HYPOBARIC PLANT GROWTH STUDIES	39
2.1      Abstract.....	39
2.2      Introduction.....	40
2.3      Materials and Methods.....	42
2.3.1      Excitation, Emission and Imaging Capture Requirements .....	42
2.3.2      Hypobaric Plant Growth Chambers.....	43
2.4      Multispectral Plant Health Imaging System .....	44
2.4.1      Hardware.....	45
2.4.2      Grow Lights .....	48
2.4.3      Fluorescent Excitation Lights .....	56
2.4.4      M-PHIS Software.....	57
2.4.5      Multispectral Plant Health Imaging System to Low-Pressure Chamber Interface .....	60
2.5      Results and Discussion .....	60
2.5.1      Short Duration Low Pressure Run .....	61
2.5.2      Long Duration Low Pressure Run .....	62
2.6      Conclusions.....	64
2.7      Acknowledgements.....	65

CHAPITRE 3	SEGMENTATION D'IMAGES DE PLANTES CAPTURÉES PAR UN SYSTÈME D'IMAGERIE FLUORESCENTE.....	67
3.1	Résumé.....	67
3.2	Introduction.....	68
3.3	Méthodologie.....	69
3.4	Validation.....	71
3.5	Bayes quadratique.....	71
3.6	Algorithme du KPPV.....	73
3.7	Machines à vecteurs de support.....	74
3.8	Comparaison des trois classifieurs.....	77
3.9	Conclusion.....	78
3.10	Remerciements.....	78
	CONCLUSION.....	79
	LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	85

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Table 1.1	TIS-III power budget.....23
Table 1.2	Selected Roithner Lasertechnik LEDs utilized in the developed grow light boards and their respective wavelength ranges.....27
Table 1.3	LED distribution and voltages.....28
Table 2.1	Power consumption of Multispectral Plant Health Imaging System components.....46
Table 2.2	Selected Roithner Lasertechnik grow and excitation LEDs, top-level specifications and their quantity within the developed Multispectral Plant Health Imaging System (M-PHIS) LED board.....51
Table 2.3	Grow light power consumption if the PWM is set to 100% .....56
Table 3.1	Valeur des k testés et résultats.....74
Table 3.2	Taux d'erreur en variant $\gamma$ et C.....76
Table 3.3	Comparaison des classifieurs .....77



## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1	The controller setup as deployed within the ACMG on Devon Island. Shown are cFP-2120 (1), cFP-PWM-520 (2), cFP-RLY-421 (3) and cFP-CB-1 connector blocks (4) .....22
Figure 1.2	Side view of the TIS-III as installed. Grow lights and fan inputs (1), camera Ethernet connection (2), camera power cable (3), cooling pipe (4) .....23
Figure 1.3	Top view of the installed TIS-III NI-1744 Camera (1), Computer M1214-MP lens (2), camera guide bracket (3), camera Light control connector (4), excitation light board (5), cooling fan (6) .....23
Figure 1.4	LabView TIS-III control panel.....24
Figure 1.5	VBAI Inspection State Diagram (TIS-III capture sequence logic).....24
Figure 1.6	Grow lights boards and positioning within the TIS-III .....27
Figure 1.7	Grow light distribution pattern, size and installation angle .....28
Figure 1.8	TIS-III excitation LEDs behind a band-pass filter .....30
Figure 1.9	ACMG (A) and the CSA development greenhouse (B).....31
Figure 1.10	CSA validation phase within the CSA development greenhouse (A), nominal operations within the ACMG (B).....33
Figure 1.11	Automated 2010 fall operations run showing captured TIS-III and remotely downloaded plants expressing GFP and regular white light images. Images were cropped and processed to adjust contrast and brightness for publishing and printing purposes. Images were captured every 6 hours and the presented images reflect 35 days of growth with an interval of five days.....34
Figure 1.12	Spring season repair confirmation images downloaded south via satellite link.....35

Figure 1.13	2011 Automated spring run showing captured and remotely downloaded plants expressing GFP and regular white light images. Images were cropped and processed to adjust contrast and brightness for publishing and printing purposes. Images were captured every six hours and the presented images reflect approximately six days of growth with an interval of two days.....	36
Figure 2.1	Canopy-scale hypobaric chambers at the Controlled Environment Systems Research Facility (CESRF), University of Guelph: A) Exterior showing lighting canopy, irrigation and nutrient control system, B) M-PHIS deployed in a CESRF hypobaric plant growth chamber.....	44
Figure 2.2	Multispectral Plant Health Imaging System (M-PHIS) Front (A), Back (B)....	47
Figure 2.3	NI-1744 Camera (left), bracket attachment and LCTF (right).....	47
Figure 2.4	White LEDs and biological sample holder showing installed Petri dish with calibration targets.....	47
Figure 2.5	Multispectral Plant Health Imaging System (M-PHIS) with top cover removed and internal items shown.....	48
Figure 2.6	<i>Arabidopsis thaliana</i> seeds containing reporter genes growing vertically in a 10 cm <sup>2</sup> plates.....	49
Figure 2.7	Distribution of grow lights (exterior rectangular region) and excitation lights (interior rectangular region). The centre hole is aligned in front of the LCTF and camera to permit imaging through the LED board.....	50
Figure 2.8	Relative irradiance spectra of the Multispectral Plant Health Imaging System (M-PHIS) primary LED board.....	51
Figure 2.9	Grow / excitation light board in operation. A) All grow lights activated at 5% intensity. B) Upper section, all grow light enabled at 10%. C) Excitation lights activated at 25% D) 470 nm LEDs activated at 5%.....	52
Figure 2.10	Demonstrating Multispectral Plant Health Imaging System (M-PHIS) grow light board parabolic angle that aids in focusing the energy emitted on the desired target.....	54
Figure 2.11	Electrical schematic for B5b-435-TL. Each 33 ohm resistor dissipates 82.5 mW. Together, all resistors dissipate 1072.5 mW (577.5 mW up & 495 mW dw). Together, the diodes dissipate 14625 mW (7875 mW up & 6750 mW dw). Total power dissipated by the array is 15697.5 mW (8452.5 mW up & 7245 mW dw). The array draws current of 650 mA from the source. (350 mA up & 300 mAdw). Where up and dw (down) represent the LED circuits for the upper and lower half of the PCB respectively.....	55



Figure 2.12	LabVIEW Multispectral Plant Health Imaging System control panel.....	58
Figure 2.13	VBAI Inspection State Diagram .....	59
Figure 2.14	Capture sequences of the calibration plate at ambient pressure (top row) and at 5 kPa (bottom row). These images confirm that reduced atmospheric pressure did not influence overall image quality, LCTF or other imager optics.....	62
Figure 2.15	Images sets from the first 5 kPa hypobaric experiment. The sequence on the top is images captured at the beginning of the experiment where the pressure was still at ambient (~100 kPa). The series on the bottom were taken at 5 kPa four hours later.....	64
Figure 3.1	Arabidopsis, visible.....	69
Figure 3.2	Arabidopsis, GFP .....	69
Figure 3.3	Segmentation des feuilles GFP avec seuil.....	70
Figure 3.4	Segmentation des tiges GFP avec seuil.....	70
Figure 3.5	Les valeurs moyennes d'intensité des différents parties de la plante sont montrées pour les deux types d'image; image dans le spectre visible et image GFP.....	71
Figure 3.6	Segmentation, Bayes Quadratique .....	73
Figure 3.7	KNN avec $k = 5$ .....	74
Figure 3.8	KNN avec $k = 11$ .....	74
Figure 3.9	SVM $C= 100$ , $\gamma= 0.01$ .....	76
Figure 3.10	SVM $C= 10k$ , $\gamma= 0.01$ .....	76



## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

$\lambda$	Longueur d'onde
$x$	Échantillon à classer
$\Sigma_j$	Matrice de covariance
$\mu_j$	Vecteur moyen
$\omega_j$	Classes
$x_i$	Échantillons d'apprentissage
$d$	Dimension des vecteurs de caractéristiques
$y_i$	Classe des échantillons d'apprentissage $x_i$
$\alpha_i$	Coefficient de séparation
$b$	Constante de séparation
$n$	Nombre d'échantillons
$i$	Valeurs des échantillons d'apprentissage
$j$	Valeurs des échantillons de tests
<b>ACMG</b>	Arthur Clarke Mars Greenhouse
<b>ASC</b>	Agence spatiale canadienne
<b>Bayes-Q</b>	Bayes quadratique
<b>CA</b>	Courant alternatif
<b>CaMV</b>	Cauliflower Mosaic Virus
<b>CC</b>	Courant continu
<b>CCD</b>	Charge-coupled device
<b>CESRF</b>	Controlled Environment Systems Research Facility
<b>DC</b>	Direct Courant
<b>DEL</b>	Diodes électroluminescentes
<b>ESA</b>	European Space Agency
<b>ÉTS</b>	École de technologie supérieure
<b>FWHM</b>	Full width at half maximum
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>HMP</b>	Haughton-Mars Project
<b>JPEG</b>	Joint Photographic Experts Group
<b>KNN</b>	k-nearest neighbor algorithm
<b>KPPV</b>	K du plus proches voisins
<b>KSC</b>	Kennedy Space Center
<b>LED</b>	Light-emitting diode
<b>LMH</b>	Largeur à mi-hauteur
<b>MELiSSA</b>	Micro-Ecological Life Support System Alternative
<b>M-PHIS</b>	Multispectral Plant Health Imaging System
<b>MVS</b>	Machines à Vecteurs de Support
<b>NASA</b>	National Aeronautics and Space Administration
<b>NI</b>	National Instruments
<b>NIR</b>	Near Infra-Red
<b>OCE</b>	Ontario Centers of Excellence
<b>PCB</b>	printed circuit boards
<b>PVF</b>	Protéine Verte Fluorescente

<b>PWM</b>	Pulse width modulation
<b>RPM</b>	Rotation par minute
<b>SFU</b>	Simon Fraser University
<b>SVM</b>	Support vector machine
<b>TAGES</b>	Transgenic Arabidopsis Gene Expression System
<b>TIFF</b>	Tagged Image File Format
<b>VBAI</b>	Vision Builder for Automated Inspection

## LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

<b>Aire</b>		<b>Fréquence</b>	
m <sup>2</sup>	mètre carré	kHz	kilohertz
cm <sup>2</sup>	centimètre carré	Hz	Hertz
		nm	Nanomètre
<b>Vitesse</b>		<b>Différence de potentiel (ou tension)</b>	
m/s	mètre par seconde	kV	kilovolt
km/h	kilomètre par heure	V	volt
<b>Accélération</b>		<b>Résistance</b>	
m/s <sup>2</sup>	mètre par seconde carré	kΩ	kilo ohm
<b>Angle plan</b>		Ω	ohm
rad	radian	<b>Intensité de courant électrique</b>	
r	Tour (rotation)	A	ampère
°	degré	mA	milliampère
<b>Masse</b>		<b>Puissance</b>	
g	gramme	kW	kilowatt
kg	kilogramme	W	watt
<b>Vitesse angulaire</b>		<b>Contrainte, pression</b>	
r/s	tour par seconde	atm	Atmosphère
r/min	tour par minute	Pa	Pascal
		kPa	Kilopascal

**Source :** Bureau de normalisation du Québec (1977), *Système international d'unités (SI) principes d'écriture des unités et des symboles* (BNQ 9990-911) Québec : ministère de l'Industrie et du Commerce.



## INTRODUCTION

Comme les humains continuent à explorer au-delà des confins de notre propre planète, nous sommes confrontés à une variété de défis afin de faciliter ces explorations. Parmi ces défis, le génie de l'environnement qui inclut le maintien des humains dans des habitats extraterrestres. L'utilisation des plantes comme partie intégrante des systèmes de soutien de la vie demeure la base des stratégies des voyages de longue durée, de l'habitation humaine dans l'espace et de la colonisation extraterrestre. L'agence spatiale canadienne étudie la possibilité de maintenir la présence humaine sur la Lune et/ou Mars en implantant des serres. L'avantage de ces serres réside dans leur capacité à fournir, dans une boucle fermée, un système de régénération des trois piliers de soutien de la vie, comme (1) la provision de biomasses comestibles (2) la gestion de l'atmosphère, principalement CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>, et (3) la production d'eau potable (Bamsey et al., 2009b). D'où l'importance de bien comprendre les enjeux métaboliques qui peuvent influencer la croissance des plantes et leur développement dans l'espace.

Les vols spatiaux et des environnements extraterrestres fournissent des défis uniques pour la vie végétale. Ces défis nécessitent souvent des changements au niveau de l'expression des gènes pour s'adapter et survivre à ces nouvelles conditions. L'avantage de cette adaptation est que les plantes possèdent des systèmes de détection moléculaire très sophistiquée qui surveillent leur physiologie et les situations de stress potentielles. Comme tous organismes vivants, les plantes observent en permanence leur environnement et font des ajustements à leur physiologie en fonction de leurs besoins environnementaux. De nombreux ajustements sont effectués au niveau de leurs gènes. Les modifications des conditions environnementales, presque uniformément, conduisent à des changements dans la régulation des gènes. Ces ajustements réglementaires fournissent l'état moléculaire altéré au sein de la cellule végétale qui permet à la plante de survivre, et même de prospérer, dans les nouvelles conditions environnementales. Ce procédé de surveillance de l'environnement a été le sujet de plusieurs études en biologie moléculaire végétale (Manak et al., 2002; Paul et al., 2011). L'inductibilité de ce procédé causé par l'environnement offre un interrupteur manipulable, une poignée qui

permet au chercheur d'activer ou de désactiver un gène de stress particulier (Manak et al., 2002). En marquant ces gènes avec un marqueur, l'activité des gènes peut être suivie et évaluée.

Bien que plusieurs catégories de marqueurs se soient révélées précieuses pour une variété d'applications, la protéine fluorescente verte (PFV) est utilisée de plus en plus fréquemment. L'avantage principal du PFV est que la procédure de dosage n'affecte pas la croissance des plantes et leur développement, tandis que d'autres méthodes nécessitent l'ajout d'un substrat et souvent sacrifient les plantes (Paul et al., 2008). Le *Green Fluorescent Protein* (GFP) ou PFV en français a un énorme potentiel pour devenir le système idéal de marqueur des gènes, en particulier dans les environnements orbitaux et extraterrestres, où le retour d'échantillons est extrêmement difficile. Pour visualiser la PFV, les plantes doivent être excitées avec une longueur d'onde spécifique et leur diffusion doit être détectée à une autre longueur d'onde distincte. La plante n'est pas endommagée au cours du processus.

Nous arrivons de mieux en mieux à caractériser les gènes et les conditions environnementales qui affectent l'expression de ces gènes. Les marqueurs peuvent être déployés, d'une façon efficace, en positionnant sur les gènes ces marqueurs pour qu'ils réagissent à leur environnement. Les plantes deviennent alors des capteurs vivants. Par exemple, des gènes exprimés par le froid, la chaleur, la sécheresse, les inondations, le toucher, les métaux lourds, les nutriments, la qualité de la lumière et la composition des gaz atmosphériques ont tous été bien caractérisés (Paul et al., 2008). Lorsque ces gènes sont couplés avec la PFV, ces plantes deviennent des capteurs incroyablement efficaces dans des conditions environnementales hostiles. Une fois bien caractérisées en conditions environnementales contrôlées, les plantes avec des marqueurs génétiques (biocapteur) peuvent être déployées dans des environnements inconnus ou mal caractérisés afin d'étudier la réponse biologique à ces environnements.

Le *Transgenic Arabidopsis Gene Expression System* (TAGES) est un type de biodétecteur de l'état des plantes. Le TAGES utilise des *Arabidopsis thaliana*, avec des des marqueurs



génétiqes modifiés avec des PFV. Cela permet d'utiliser les plantes comme biocapteurs (Manak et al., 2002). Il s'agit d'un organisme utilisé pour déterminer la qualité de l'environnement. Des expériences pendant des vols spatiaux ont permis de définir le matériel nécessaire pour cultiver des plantes en orbite basse. Ces expériences ont mis en lumière des questions fondamentales concernant les effets des vols spatiaux sur la croissance des plantes et leur développement (Paul et al., 2001).

En plus des plantes génétiquement modifiées avec du PFV, la capture de la fluorescence naturelle de la chlorophylle est devenue omniprésente dans les études écophysiologies des plantes. Aucune recherche sur la performance photosynthétique des plantes dans des conditions de stress ne semble complète sans des données sur la fluorescence naturelle (Maxwell et Johnson, 2000). Semblable au PVF, le principe de l'analyse de la fluorescence de la chlorophylle est relativement simple. L'énergie lumineuse qui est absorbée par les molécules de chlorophylle de la plante peut provoquer l'une de ces trois réactions : elle peut être utilisée dans le processus de photosynthèse, l'excès d'énergie peut être dissipé sous forme de chaleur ou elle peut être réémise sous forme de lumière de fluorescence chlorophyllienne. Ainsi, nous pouvons caractériser les trois réactions possibles en mesurant l'intensité de fluorescence de la chlorophylle, de l'information sur les changements dans l'efficacité de la photochimie et la dissipation de la chaleur (Maxwell et Johnson, 2000). Cette information peut être utilisée pour l'étude de la santé des plantes pour une approche générale et pour une approche plus précise. Mais l'avantage de taguer les gènes avec de la PVF est que les chercheurs peuvent identifier distinctement le stress qui a déclenché la fluorescence.

De nombreux systèmes commerciaux sont disponibles pour l'imagerie et la capture de la fluorescence. Mais la plupart des procédures analytiques impliquent un examen en laboratoire. Cependant, les premières expériences biologiques en orbite terrestre élevée, sur la Lune et sur Mars sont des missions robotiques autonomes et exigent que les renseignements soient transmis sur Terre par télémétrie. En outre, un compromis entre la pression atmosphérique de l'environnement des astronautes, la structure, la gestion du temps de l'équipage, etc. dictera si l'élément humain dans les futurs systèmes de biorégénération de

soutien de la vie est envisageable Avec l'avènement du PFV comme biocapteur et de la fluorescence naturelle, il est devenu possible d'analyser la santé des plantes par télémétrie. Les informations d'expression des gènes et de la fluorescence chlorophyllienne de la plante livrée à l'enquêteur sur de grandes distances tout simplement comme des images bien traitées.

Ce mémoire présente deux articles de revue qui décrivent la conception, le développement et le déploiement de deux prototypes d'imagerie de la santé des plantes ainsi qu'un article de conférence qui expose le développement d'un algorithme de segmentation d'image des plantes capturées par les prototypes.

Le premier prototype, qui est détaillé dans l'article présenté au premier chapitre, est un système d'imagerie de plante avec des gènes génétiquement marqués avec du PVF. Ce système a été déployé et a été intégré dans la serre d'*Arthur Clarke Mars Greenhouse* (ACMG) à la station de recherche *Haughton Mars Project Research Station* sur l'île Devon, Nunavut dans le Haut-Arctique Canadien (Bamsey et al., 2009a). Le projet a été conçu et a été réalisé afin de prendre un concept d'imagerie éprouvé en laboratoire et de développer le matériel et logiciel nécessaire ainsi que le système de communication pour passer ce concept un niveau de maturité de la technologie pratique plus. Le déploiement du système dans un environnement opérationnel éloigné et isolé simule les difficultés de communication et du contrôle d'une serre dans l'espace. L'article décrit la conception et le développement du matériel et logiciel, y compris les lumières de la photosynthèse et d'excitation conçue sur mesure, les filtres, le système d'acquisition de données, le système de communication par satellite, le système de contrôle et système d'alimentation à courant continu. Durant la conception, il a fallu prendre en considération plusieurs contraintes, pour en nommer quelques-unes, la nécessité d'avoir un système à faible consommation d'énergie puisqu'il devait être déployé dans une région éloignée avec source d'énergie renouvelable limitée. De plus, une seule source de 24V en courant continu était disponible pour alimenter tous les éléments du système. Une deuxième contrainte est l'intégration du système d'imagerie aux systèmes de contrôle, communication et acquisition de données de la serre. Alors il fallait concevoir le matériel et logiciel du système d'imagerie complètement compatible aux

systemes de la serre, qui avait été déjà développé il y a plus de dix ans, avec des mises à niveaux toutes les années. Il est aussi important de souligner une contrainte stricte, les longueurs d'onde produites par le système d'excitation ne devraient pas se chevaucher avec l'émission de fluorescence capturée par le système d'imagerie. La contamination des lumières d'émission par la source d'excitation peut entraîner une grande perte d'informations avec d'importantes répercussions négatives sur la production scientifique qui en résulte. Le prototype d'imagerie a été déployé et intégré à la serre de l'île Devon. Il a fonctionné avec succès de façon autonome pendant une année entière en absence d'humain et a été commandé à travers le système de communication par satellite de la serre. Le système a capturé la fluorescence des plantes génétiquement modifiées contenant la PFV fusionnée à leurs gènes révélateurs pour simuler le suivi de multiples sources de stress. Les images ont été enregistrées localement en haute résolution et envoyées en basse résolution par télémétrie vers le sud à un serveur situé à PolyLAB à l'université de Simon Fraser. Pendant le printemps, une anomalie a été détectée. Un effort a été fait pour identifier le mode de défaillance suspectée et un plan simplifié a été élaboré pour résoudre le problème. Il a été donné aux premiers scientifiques qui ont débarqué sur l'île. Cette expérience a servi d'analogie utile pour expérimenter des réparations sur la Station Spatiale Internationale.

Le deuxième article décrit la conception et le développement d'un prototype d'imagerie multispectral fluorescente déployé dans une chambre hypobare à l'Université de Guelph. Un système de santé végétale multispectral, constituerait un pas considérable dans la capacité de surveiller les cultures des systèmes de soutien de la vie d'une manière plus autonome (Manak et al., 2002), (Wheeler, 2010), (Bamsey et al., 2009a). La considération principale pour la conception du système multispectral était de construire un prototype à servir dans plusieurs environnements où les chercheurs sont intéressés à étudier comment les plantes réagissent à eux (Paul et al., 2001), (Paul et al., 2004). Comparables et compatibles avec les exigences du système d'imagerie TAGES mais avec des fonctionnalités supplémentaires importantes, notamment des lumières de photosynthèse variables (Folta et al., 2005) et la capacité de capturer la fluorescence chlorophyllienne (Maxwell et Johnson, 2000). Plus particulièrement, un dispositif d'imagerie multimodal et multifonction qui non seulement est capable de

réaliser des expériences autonomes et de collecter des données en temps réel, mais a également la capacité de capturer des variétés de longueurs d'onde qui peut couvrir un spectre de 420 à 730 nm. Un multi-imageur qui, en plus de capter une expression de GFP, peut être utilisé pour capturer des protéines fluorescentes jaune, rouge et la fluorescence naturelle des chlorophylles rouges, proche de l'infrarouge et autres. Le système ne s'arrête pas à la capacité de saisir la longueur d'onde de la bande passante voulue, mais le système a aussi la possibilité de régler la largeur de bande passante en ajustant la largeur à mi-hauteur (LMH) nommée en anglais "Full width at half maximum" (FWHM) du filtre. Une deuxième caractéristique est l'introduction de lumière pour la photosynthèse à des longueurs d'onde indépendamment variable qui peuvent être ajusté pour fournir le biocapteur la dose de lumière appropriée. Avec cet avantage, l'utilisateur peut régler les intensités des différentes longueurs d'onde de la lumière et ratio aux valeurs optimales, en fonction du type, statut et nécessité du capteur biologique, pour le garder sain et fonctionnel. En outre, il peut être utilisé dans des études mesurant l'influence de différente intensité et ratio de lumières sur la croissance des plantes. Une recherche intensive a été menée pour construire à partir de la base le matériel et le logiciel de l'imageur. Les exigences fondamentales du système d'excitation ont été étudiées et ont été testées pour fournir aux biocapteurs avec les longueurs d'onde les plus appropriées pour l'excitation de la PVF et de la chlorophylle naturelle afin de recueillir la fluorescence émise. Ensuite, une recherche a été menée afin de déterminer les longueurs d'onde optimales pour la croissance des plantes et différentes diodes électroluminescentes (DEL) de couleur rouge et bleu ont été sélectionnées selon la suggestion de la littérature actuelle (West-Eberhard, Smith et Winter, 2011), (Folta et al., 2005), (Schurr, Walter et Rascher, 2006), (Goins et al., 1997), (Porra, Thompson et Kriedemann, 1989). De plus, des tests en laboratoire de la répartition des différentes DEL ont été menés pour trouver un motif d'éclairage équitable qui fournit au plant les longueurs d'onde voulues. Les tests et les recherches ont permis la conception et la construction d'un circuit imprimé avec des DEL de photosynthèse intégrées et d'excitation avec un contrôle indépendant sur les intensités. Une combinaison de filtres a été utilisée et a été placée dans des endroits stratégiques pour s'assurer qu'aucune lumière produite par le système d'excitation ne se chevauche avec la lumière captée par le système d'imagerie. La fonction multispectrale est réalisée à l'aide d'un

filtre variable à cristaux liquides placé devant le capteur d'image. Après l'achèvement et la validation, le système a été déployé dans une chambre hypobarique de l'Université de Guelph. Le système a saisi avec succès les lumières de fluorescences des PVF, de la chlorophylle rouge et proche de l'infrarouge en temps réel dans un environnement qui simule la basse pression de la planète Mars.

La dernière publication est l'article de conférence qui présente l'algorithme de segmentation conçu et développé pour distinguer les pixels des différentes parties d'une image de plante. Notamment les feuilles, les tiges, les racines et le fond des images capturées par les prototypes mentionnés précédemment. L'objectif est de simplifier l'analyse du grand nombre d'images capturées par les systèmes en discriminant les différentes parties de la plante. Après une mission ou une expérience à l'aide des systèmes d'imagerie phytosanitaire, il y a des centaines d'images à analyser. C'est une tâche qui prend beaucoup de temps et d'énergie pour les astronautes et/ou les scientifiques. De plus, il est très difficile de pouvoir analyser tous les paramètres à l'œil nu avec une grande précision. Finalement, un des plus grands défis est d'envoyer les images en haute résolution par télémétrie si le système se trouve dans un endroit lointain et isolé, comme pour le système déployé sur l'île Devon ou sur la station spatiale internationale. La stabilité et la vitesse du lien de communication satellite entre la serre de l'île Devon ou la station spatiale sont très mauvaises pour envoyer de gros fichiers d'images, et ce, même lorsque les images sont compressées. De plus, la compression n'est pas une option valable puisqu'il peut y avoir une grande perte d'information. Alors pour simplifier l'analyse un algorithme de caractérisation a été conçu pour discriminer les différentes parties de la plante. Trois différentes méthodes de classification ont été implantées, testées et comparées. La méthode du Bayes quadratique (Bayes-Q), la méthode du K plus proches voisins (K-PPV), la méthode de la machine à vecteurs de support (MVS).

Le présent mémoire est organisé de la façon suivante :

En premier lieu, nous avons une revue de la littérature générale.

Le chapitre 1 présente le déploiement d'un système d'imagerie de la protéine fluorescente verte entièrement automatisé dans une serre autonome dans l'extrême arctique (Abboud et al., 2013a). Article publié le 13 mars 2013 dans une revue scientifique anglaise et intitulé *Deployment of a fully-automated green fluorescent protein imaging system in a high arctic autonomous greenhouse*.

Le chapitre 2 présente un système d'imagerie multispectral phytosanitaire conçu pour l'étude de la santé de la biologie spatiale et de la croissance des plantes dans un environnement hypobare (Abboud et al., 2013b). Article publié le 03 Juin 2013 dans une revue scientifique anglaise et intitulé *Multispectral plant health imaging system for space biology and hyperbaric plant growth studies*.

Le chapitre 3 présente un algorithme de segmentation d'images de plante capturées par les systèmes présentés dans le chapitre 1 et 2 (Abboud et al., 2012). Un article de conférence arbitré soumis et accepté en avril 2012. L'article est intitulé *Segmentation d'images de plantes capturées par un système d'imagerie fluorescente*.

Enfin, ce mémoire se termine par une conclusion générale.

## REVUE DE LA LITTÉRATURE

Les astronautes continuent à s'aventurer de plus en plus loin dans l'espace et demeurent de plus en plus longtemps loin de la Terre. Le recyclage des matériaux (par exemple une boucle fermée, de leur air, eau et nourriture) devient une nécessité (Barta et Henninger, 1994). Actuellement les systèmes de régénération de support à la vie sont à base physico-chimique, ils n'ont pas la capacité de produire de la nourriture et ne fournissent pas en boucle fermée ou quasi fermée des entrées et des sorties du cycle de soutien à la vie de l'équipage. Les missions de longue durée rendent le réapprovisionnement ou l'arrimage de tous les consommables nécessaire de plus en plus difficile et l'exigence d'un système alimentaire en boucle fermée devient encore plus nécessaire. Un système de support de vie biologique qui utilise les plantes fournit les moyens de fermer les trois boucles de la vie biologique : l'air, l'eau et nutriments (Wheeler, 2010). Les systèmes de support de vie pour une mission spatiale doivent fonctionner avec une masse, une puissance, un volume, une durée de mission limitée et ils nécessitent une grande fiabilité. Une erreur peut signifier l'échec de la mission et potentiellement la perte de l'équipage (Levri et al., 2003). Ces exigences sont la base du développement de systèmes de production à haut rendement contenant un vaste réseau de capteurs pour la surveillance des plantes en temps réel ou en temps quasi réel.

Depuis longtemps, les systèmes de survie biologique pour les vols spatiaux humains ont été proposés et étudiés (Myers, 1954). Plusieurs excellentes critiques de l'histoire de systèmes biorégénératifs de soutien à la vie existent (Chamberland et al., 1992; Tibbits et Alford, 1982; Wheeler, 2010). Leur avantage est basé sur leur capacité à fournir une production de biomasse comestible, l'absorption du dioxyde de carbone, la production d'oxygène, le recyclage de l'eau et la dégradation des déchets organiques (Binot, Tamponnet et Lasseur, 1994; Galston, 1992). Des données indiquent également que l'utilisation de plantes aurait des bénéfices psychologiques sur l'équipage lors de missions spatiales de longue durée (Bringslimark, Hartig et Patil, 2009). Donc, les systèmes de soutien de la vie biorégénératifs deviennent plus avantageux par rapport aux solutions traditionnelles physico-chimiques pour

les missions lointaines de longue durée, où l'approvisionnement devient trop coûteux et complexe.

Plusieurs pays et agences spatiales sont actifs dans la recherche sur le support à la vie biologique. Les États-Unis ont plusieurs bancs d'essai sur terre ou ont des projets qui incluent des chambres de production de biomasse (Wheeler et al., 2003), le projet Biosphere-2 (Nelson et al., 1993), les concepts et les technologies des sous-systèmes de la Machine à salade "Salad-Machine" (Kliss et al., 2000) et beaucoup d'autres. En Europe, il existe plusieurs projets comme l'*Alternative Micro-Ecological Life Support System Alternative* (MELiSSA) ou le projet *plant pilot* (Turc et al., 1999). Le Canada est actif dans le domaine du soutien à la vie biologique depuis le début des années 1990 (Bamsey et al., 2009b).

Il y a aussi des bénéfices sur Terre de ces programmes. Les technologies nécessaires à un approvisionnement alimentaire sûr et fiable dans des endroits difficiles et éloignés qui requièrent des pertes minimum sont plus que nécessaires pour les Canadiens et la société en général. L'industrie serricole canadienne contribue de façon significative à l'économie du pays. En 2010, les ventes de produits de serre du Canada s'élevaient à environ 2,5 milliards de dollars (une hausse de 3% par rapport à 2009), mais c'est un secteur souvent négligé, en particulier lorsque le développement des technologies de pointe est concerné (Canada, 2011).

Par conséquent, une bonne compréhension de la santé des plantes dans des environnements extraterrestres ou contrôlés n'est pas seulement une étude intéressante sur les limites de la biologie dans le système solaire, mais aussi un impératif stratégique pour les systèmes de support à la vie humaine.

Ce mémoire contient trois articles qui présentent les deux prototypes d'imagerie conçus pour la surveillance et l'étude de la santé des plantes qui se trouve dans des systèmes biorégénératifs de support de vie. Un algorithme de segmentation des images de plants capturées par les prototypes pour faciliter l'analyse des données est également présenté. En effet, le but est de prendre un concept d'imagerie éprouvé en laboratoire et de développer le



matériel nécessaire, ainsi que les logiciels, pour passer ce concept à un niveau de maturité technologique et pratique plus élevé pour l'utiliser dans des environnements éloignés et hostiles.

Le premier article expose un système d'imagerie de la PVF dénommée *TAGES imaging system-III* (TIS-III), déployé en 2010 dans la serre *d'Arthur Clarke Mars Greenhouse* sur l'île Devon dans l'extrême nord du Canada. L'expérience du premier déploiement du système d'imagerie TAGES (TIS-II) à l'ACMG (Paul et al., 2008) en 2006 a mené à la conception et au déploiement du système TIS-III. Plusieurs améliorations ont été nécessaires avant de pouvoir déployer le nouveau système d'imagerie. Pour en nommer quelques une, TIS-II a des lumières de photosynthèse placées derrière la boîte à Pétri qui contient les capteurs biologique. En raison de la quantité considérable de chaleur émise par ces DEL, de la condensation se forme sur le devant de la boîte à Pétri ce qui opacifie la zone d'imagerie. Un autre exemple est que tout au long de l'année, l'instrumentation du l'ACMG est alimenté par un système d'énergie renouvelable à courant continu. Puisque les différents voltages requis pour alimenter TIS-II ne sont pas disponibles dans la serre de l'ACMG, le système a roulé pendant quelques jours seulement en présence d'humains et il était alimenté seulement par une génératrice à carburant. De plus, la boîte à contrôle du TIS-II n'est pas compatible avec le système de contrôle de la serre et des autres instruments. En raison de ces problèmes plus d'autres mentionnés plus en détail dans l'article, il n'a pas été faisable de laisser TIS-II fonctionner de façon autonome et d'envoyer les commandes et les données par télémétrie via une liaison satellite.

Le deuxième article présente un système qui ressemble à celui du premier article, mais avec de nombreuses améliorations et de nouvelles fonctionnalités très utiles. C'est un système multispectral nommé *Multispectral Plant Health Imaging System* (M-PHIS). L'imageur a été conçu principalement pour faire de l'imagerie multibande de la fluorescence des chlorophylles naturelles et des protéines rapporteuses. La conception étant motivée par des considérations de fonctionnalité de portabilité et d'autonomie. La nécessité de la fonctionnalité multispectral est montrée dans beaucoup d'études comme les études de (Baker

et Rosenqvist, 2004; Ehlert et Hinch, 2008; Galston, 1992; Lichtenthaler et Babani, 2000; Manak et al., 2002). De plus, un circuit imprimé a été développé sur mesure et des DEL ont été intégrées pour fournir de la lumière de photosynthèses aux plantes basées sur des études antérieures (Goins et al., 1997; Porra, Thompson et Kriedemann, 1989; Schurr, Walter et Rascher, 2006; West-Eberhard, Smith et Winter, 2011). La nouveauté principale de ce circuit est dans sa capacité à exercer un contrôle indépendant sur les intensités de chaque longueur d'onde, ce qui est une fonctionnalité importante comme le démontre l'étude suivante (Folta et al., 2005). Le même circuit contient une sélection variée et contrôlable de lumières d'excitation (Heim et Tsien, 1996; Manak et al., 2002) ce qui permet le ciblage des fluorochromes voulus.

L'algorithme de segmentation d'images de plantes capturées par les systèmes présentés au chapitre 3 est un nouvel outil et un progrès essentiels pour les systèmes de support à la vie. L'objectif est de simplifier l'analyse des images capturées pour diminuer le temps que les scientifiques ou l'équipage passent à observer l'état des plantes, (Levri et al., 2003) et ce, en discriminant automatiquement les différentes parties de la plante.

Dans ce qui suit, chaque article dans ce document contient une revue de la littérature plus complète et spécifique à l'étude présentée.

## CHAPITRE 1

### DEPLOYMENT OF A FULLY-AUTOMATED GREEN FLUORESCENT PROTEIN IMAGING SYSTEM IN A HIGH ARCTIC AUTONOMOUS GREENHOUSE

Talal Abboud<sup>1,5</sup>, Matthew Bamsey<sup>2</sup>, Anna-Lisa Paul<sup>2</sup>, Thomas Graham<sup>4</sup>, Stephen Braham<sup>6</sup>,  
Rita Noumeir<sup>5</sup>, Alain Berinstain<sup>1</sup>, Robert Ferl<sup>2,3</sup>.

1. Space Science and Technology, Canadian Space Agency, 6767 route de l'aéroport, Longueuil QC J3Y 8Y9, Canada; E-Mails: alain.berinstain@asc-csa.gc.ca; talal.abboud@asc-csa.gc.ca
2. Horticultural Sciences, University of Florida, Gainesville FL 32601 USA; E-Mails: matthew.bamsey@ufl.edu; alp@ufl.edu
3. Interdisciplinary Center for Biotechnology Research, University of Florida, Gainesville FL 32610, USA; E-Mail: robferl@ufl.edu
4. Controlled Environment Systems Research Facility, School of Environmental Sciences, University of Guelph, 50 Stone Road East, Guelph ON N1G 2W1, Canada; E-Mail: tgraham@uoguelph.ca
5. École de technologie supérieure, 1100 rue Notre-Dame O, Montréal QC H3C 1K3, Canada; E-Mails: talal.abboud.1@ens.etsmtl.ca; rita.noumeir@etsmtl.ca
6. PolyLAB, Simon Fraser University, 515 W. Hastings Street, Vancouver BC V6B 5K3, Canada; E-Mail: sbraham@sfu.ca

Article publié à la revue « Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) » dans la section « Sensors » le 13 Mars 2013.

## 1.1 Abstract

Higher plants are an integral part of strategies for sustained human presence in space. Space-based greenhouses have the potential to provide closed-loop recycling of oxygen, water and food. Plant monitoring systems with the capacity to remotely observe the condition of crops in real-time within these systems would permit operators to take immediate action to ensure optimum system yield and reliability. One such plant health monitoring technique involves the use of reporter genes driving fluorescent proteins as biological sensors of plant stress. In 2006 an initial prototype green fluorescent protein imager system was deployed at the Arthur Clarke Mars Greenhouse located in the Canadian High Arctic. This prototype demonstrated the advantageous of this biosensor technology and underscored the challenges in collecting and managing telemetric data from exigent environments. We present here the design and deployment of a second prototype imaging system deployed within and connected to the infrastructure of the Arthur Clarke Mars Greenhouse. This is the first imager to run autonomously for one year in the un-crewed greenhouse with command and control conducted through the greenhouse satellite control system. Images were saved locally in high resolution and sent telemetrically in low resolution. Imager hardware is described, including the custom designed LED growth light and fluorescent excitation light boards, filters, data acquisition and control system, and basic sensing and environmental control. Several critical lessons learned related to the hardware of small plant growth payloads are also elaborated.

**Keywords:** Green Fluorescent Protein, remote sensor, telemetry, plant health, life support, Mars, astrobiology, analogue environments, imaging.

## 1.2 Introduction

The use of plants as part of life support systems remains the basis of strategies for sustained human presence in space. Bio-regenerative life support systems have been studied since the early 20<sup>th</sup> century (Wheeler, 2010). The fundamental concept is the use of plants to regenerate air and water while producing food for the crew. The Canadian Space Agency has been involved

in assessing the possibility of supporting human presence on the Moon and Mars by deploying greenhouses as plant production system test-beds. There originates the importance of understanding the metabolic issues that can influence plant growth and development in space. Biology is uniquely challenged when exposed to spaceflight and other extraterrestrial environments. These evolutionarily novel environments often require biological organisms to undergo changes in their gene expression to adapt and survive. Like all living organisms, plants continuously perceive their environment and make physiological adjustments based upon that environment. Many adjustments are made at the level of gene expression, thereby enabling an accurate molecular detection system to monitor adjustments to physiology according to environmental needs (Cushman et Bohnert, 2000; Ishita et al., 2010; Sultan, 2010). These adjustments provide the molecular adaptations within the plant cell that allows the plant to survive and even flourish in their new environment. Monitoring the patterns of gene expression to evaluate the response of a plant to a particular environment is an approach used in many studies. (Chen et al., 2002; Kant et al., 2008; Kilian et al., 2007). Coupling these genes with a visible reporter protein permits monitoring of the environment in real-time (Plautz et al., 1996; Stewart, 2001). The reporter protein Green Fluorescent Protein (GFP) is very well suited to be utilized as an environmental monitor (Manak et al., 2002; Sheen et al., 1995). In the orbital and planetary surface environments, where the return of samples is extremely difficult, GFP monitoring can be accomplished via telemetry. In addition, the imaging process does not affect plant growth and development, nor does it compromise plant health (Manak et al., 2002; Paul et al., 2003).

The Transgenic Arabidopsis Gene Expression System (TAGES) was developed as a set of biosensor plants engineered with reporter gene constructs developed for evaluating the biological response of Arabidopsis to spaceflight and other novel environments (Manak et al., 2002; Paul et al., 2003; Paul et al., 2004). This is an example of the direct use of an organism to determine the quality of its environment. Many commercial systems are available for imaging and capturing fluorescence, however none are available for data capture and transmission in space-related systems. Near term biological experiments in space are likely to be autonomous or robotic missions that would require information to be transmitted to Earth by telemetry (Paul et

al., 2008). In addition, compromises among internal atmospheric pressure, structure, associated infrastructure and crew-time, will likely require autonomous telemetric monitoring.

Experience from a second generation TAGES imaging system (TIS-II) and the first deployed within the Arthur Clarke Mars Greenhouse (ACMG) (Paul et al., 2008), led to the redesign and deployment of the imaging system described here (TIS-III). The TIS-II deployed in 2006, had plant growth lights that were positioned behind the Petri dish. Due to the considerable amount of heat emitted from these LEDs, condensation was formed on the Petri dish that subsequently obstructed the imaging area. The TIS-II had a power and control box that was separate from the nominal greenhouse power controllers. In addition, several of the imager components required different voltages as well AC current input, which conflicted with the greenhouse renewable energy system. Furthermore, only manual controls were available to adjust growth / excitation light intensity and power the system on or off. A computer connected to the imager controlled and commanded the system which made it complicated and power intensive. TIS-II captured a maximum of 250, non-compressed,  $1280 \times 1280$  pixel GFP images. Due to these described issues it was not possible to leave the imager to run autonomously and to send commands and data telemetrically via satellite link after the field season.

This article describes the design and development of a second generation prototype fluorescent imager (TIS-III) deployed in the ACMG at the Mars Institute's Haughton Mars Project Research Station on Devon Island, Nunavut in the Canadian High Arctic (Bamsey et al., 2009a; Giroux et al., 2006; Lee et al., 2007) . The project was initiated to take a demonstrated laboratory imaging system and advance the necessary software, hardware and communication system to permit the use of this technology in an extreme, operational environment. The study is intended not as a biological test of the environment, but as a test of the imaging hardware in that environment. In comparison to the described TIS-II imager, TIS-III included modified and repositioned grow lights to improve plant growth and limit condensation. The GFP LED board was redesigned; the control box and camera were replaced by a National Instrument Compact FieldPoint controller and camera that could be connected and

controlled via the greenhouse software and communication systems. The imager used a 24VDC connected to the readily available and compatible greenhouse renewable energy system.

### 1.3 Materials and Methods

*Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) is a model organism studied in biology laboratories and has strong spaceflight heritage. *Arabidopsis* has many advantages for genomic studies; the genome has been fully sequenced, the plants are small in stature with a rapid life cycle (about 6 weeks from seed to seed) and produce abundant progeny. There is also a wealth of mutant lines and *Arabidopsis* can be easily transformed through the use of *Agrobacterium tumefaciens* (Koornneef et Meinke, 2010). These benefits make it the best understood candidate with respect to the reactions and adaptation to environmental stresses, and when transformed with reporter genes, *Arabidopsis* has proven a useful tool for the development and deployment of biological sensors to evaluate patterns of gene expression in response to remote and novel environments (Manak et al., 2002; Paul et al., 2001; Paul et al., 2004).

The green fluorescent protein (GFP), used as a tag, is a protein that emits bright green fluorescence when exposed to blue light. The term GFP stems from the protein first isolated from jellyfish (Sheen et al., 1995). The TAGES reference GFP, entitled S65T, has a primary excitation peak at 488 nm. Its emission peak is at 512 nm, which is in the lower green wavelength portion of the visible spectrum (Manak et al., 2002; Stewart, 2001). The main advantage of GFP is that the excitation, imaging and labeling procedure does not affect plant growth and development, while other methods require the addition of a substrate and often sacrifice the plant (Paul et al., 2008). The GFP reporter used in imager calibration was CaMV35s::GFP. The 35s promoter from the Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) is constitutively expressed in plants and provides a brightly fluorescing positive control. The 35S promoter is not influenced by the environments presented in this study, and this GFP construct was used strictly as a fluorescent marker to evaluate the hardware and fluorescent data collection. For the purposes of this test, the CaMV35s::GFP construct was inserted into the WS *Arabidopsis* ecotype (Manak et al., 2002). The purpose of the present experiments is

strictly an analysis of the imaging hardware and its capabilities. Therefore only this one GFP reporter was used to characterize the imager and no data are presented that seek to evaluate the physiological response of the plants.

### **1.3.1 Fundamental Excitation System Requirements**

A wide range of incident radiation wavelengths ( $300 < \lambda < 500$ ) will result in energy transfer and can drive GFP excitation resulting in emission of green fluorescent light; however, the greatest quantitative fluorescence response occurs when the incident excitation  $\lambda = 488\text{nm}$ . Although 488 nm light has the biggest quantitative effect of fluorescence transfer, wavelengths below this peak will also be absorbed. This knowledge leads to the selection of excitation sources, taking into account all wavelengths that produce light at or below 488 nm and keeping the power efficiency in the equation of the excitation source. The excitation is greatest at 488 nm but also very close to the short end of the emission spectrum of the green GFP at 502 nm. This means that to capture the emission of GFP the excitation source should be totally blocked from entering the imaging system. The excitation system should not emit light with wavelengths higher than 493 nm. This can be accomplished either by selecting lights that will not illuminate, or by filtering all wavelengths, above 493 nm.

### **1.3.2 Fundamental Emission Image Capture Requirements**

GFP emission occurs within the green portion of the visible spectrum with peak emission at approximately 512 nm. However, the fluorescence emitted by S65T covers a considerable bandwidth, meaning that valuable information is collected not only at 511 nm, but at a wide range surrounding this peak. The system should have an image sensor capable of capturing wavelengths of 502 nm and longer. Wavelengths longer than 502 nm allow the use of yellow and red fluorescent proteins, and also the potential to capture natural chlorophyll fluorescence. It is important to point out that there is a strict constraint that the wavelengths



produced by the excitation system do not overlap with the emission of fluorescence captured by the imaging system. Contamination of the emission light by the excitation source can result in considerable loss of information with significant negative implications for the resulting science output.

### **1.3.3 Arthur Clarke Mars Greenhouse**

The Arthur Clarke Mars Greenhouse (ACMG) is a biological life support systems test facility developed to study and understand automated greenhouse production in extreme environments. Established in 2002, the ACMG became part of the Haughton-Mars Project (HMP), which is an international field research project that participates in numerous disparate studies. Located on Devon Island close to the Haughton crater in the Canadian High Arctic, HMP uses the remote polar desert and uninhabited island as a terrestrial environmental analogue for Mars and Moon. The site's geologic topography and biological aspects promote a distinctive research and operations environment suitable to the elaboration of knowledge, technologies, and field based operational methodologies that could be a significant step to successful long duration human space missions. The ACMG does not have all the functionality of a replicated closed loop life support system to be deployed on Mars or the Moon. On the other hand, it supports extreme environment related scientific and operational research, providing an improved understanding of how remote and semi-autonomous plant production systems could one day be operated. The ACMG is composed of a DC power system, plant growth system, environmental control system, local network, communication system, data acquisition and control system (Bamsey et al., 2009a; Giroux et al., 2006). The greenhouse operates autonomously throughout the year, with the researchers only on-site during the month of July when the crops are harvested and reseeded (Bamsey et al., 2009b). The ACMG was the test bed for the TIS-II GFP imager deployed in 2006 and the TIS-III GFP imager in 2010.

The ACMG power comes from a DC renewable energy system composed of six solar panels of 110 W [peak] each and can provide a total of 660 W during a sunny day in the summer. In addition, the greenhouse is powered with two wind turbines, each with a peak output of 400 W. The solar panels and wind turbines are connected to a battery bank through a set of charge controllers. The greenhouse power consumption varies between 150 W, during the spring / fall season, and 10 to 25 W when the greenhouse is in idle mode. All greenhouse sensors, relays, Ethernet cameras and the TIS-III imager are controlled and synchronized by a programmable logic controller with an intelligent Ethernet control interface. The information collected by the controllers, sensors and cameras is accessed by an independent embedded Linux command and control computer and sent via satellite to an autonomous missions operations computer server system at Simon Fraser University (SFU). Upon reception of the data, the information is processed and stored, and then made available to the researchers through the Internet (Giroux et al., 2006). The autonomous mission operations server at SFU can determine failure modes from received data and provide basic autonomous commanding via satellite to the embedded computer in the ACMG, which can further command the controllers, and/or power distribution system. Also, the operations center can send commands to the data acquisition and control system via the SFU missions operations server to modify the mode of operation of the greenhouse and the TIS-III imager.

#### **1.4 GFP Imager**

The TAGES Imaging System-III (TIS-III) is a modified and upgraded version of TIS-II, a second generation fluorescent imaging payload that was designed to collect GFP expression data in real-time, during a spaceflight experiment (Paul et al., 2008; Paul et al., 2003). The main objective of TIS-III was to design an imaging device to conduct remote, semi-autonomous experiments, within the extreme environment of a High Canadian Arctic planetary analogue site. The TIS-III was developed as an autonomous, remotely operated and controlled plant GFP imaging system connected to the communications infrastructure of the ACMG to manage dataflow from the imaging device. The upgrades were necessary to

resolve several issues: (1) The need to reduce energy consumption was required as the imager was to be deployed in a remote area with a limited energy source. The excitation lights required 4 A of current and needed 10.5 VDC so each image capture sequence demanded 42 W. In addition, laboratory tests showed that the grow lights were consuming over 3 A at their max potential of 24 V which is over 72 W; (2) The earlier TIS-II imager power supply was large, heavy and in some instances unreliable as many of the components utilized differing voltages and those voltages were not directly available through the nominal ACMG power system; (3) The camera could not be controlled remotely and without a computer connected to it. In addition, only one image resolution/compression could be set for capturing. The power supply, grow lights and excitation lights were all controlled with mechanical switches or knobs and required human presence to make any changes; (4) The grow light board behind the sample tray generated too much heat, and thus was having a negative influence on plant growth and the imaging target was often obstructed due to condensation forming on the front end of the sample tray. To solve these constraints with the TIS-II, many parts had to be designed and built new.

#### **1.4.1 Hardware**

The greenhouse has a local network that links different components through an Ethernet hub. The control of systems, namely the plant growth system, the environment control system, the power system, the communication system, and the data acquisition system, are performed by National Instruments (NI) Field Point controllers (cFP-2120) through Ethernet ports and coded with LabVIEW. To ensure compatibility, autonomy and simple integration to the ACMG, all TIS-III components were chosen and designed to be powered with 24 VDC. In addition, a cFP-2120 controller (Figure 1.1), LabVIEW programmed, is used to control and collect data from the imager. For the same reasons, the NI-1744 smart camera was selected as the capturing device. It has spot on features needed, that is, could be powered with a 24 VDC power supply, monochrome 1280 × 1024 CCD 8 bit pixel depth image sensor, built-in lighting controller, Ethernet ports and programmable with LabVIEW Real-Time Module or

with Vision Builder AI. NI extension modules cFP-PWM-520 and cFP-RLY-421 (Figure 1.2) served as intensity and relay controllers for the grow lights, camera and cooling fan (Figure 1.2 and Figure 1.3). A 1.44 W (24 VDC  $\times$  0.06 A) cooling fan was positioned behind the Petri dish to keep the plants cool and avoid image obstructions due to condensation on the front face of sample Petri plates. To further reduce the possibility of condensation on this front face, a pipe bringing cooler air from the exterior of the greenhouse to the integrated TIS-III fan was also deployed (Figure 1.2). The power budget of every component that constitutes the TIS-III is displayed in Table 1.1. Since not all components are active at the same time, power consumption depends on the state of the imager. Typically, the grow lights are on for eight hours per day and with them total power consumption equals 17.62 W (6.1 W + 10.08 W + 1.44 W). During an image capture sequence, the camera is powered on for approximately five minutes, the excitation LEDs for two minutes and two of the three grow light boards for one minute (sequence is set every six hours).

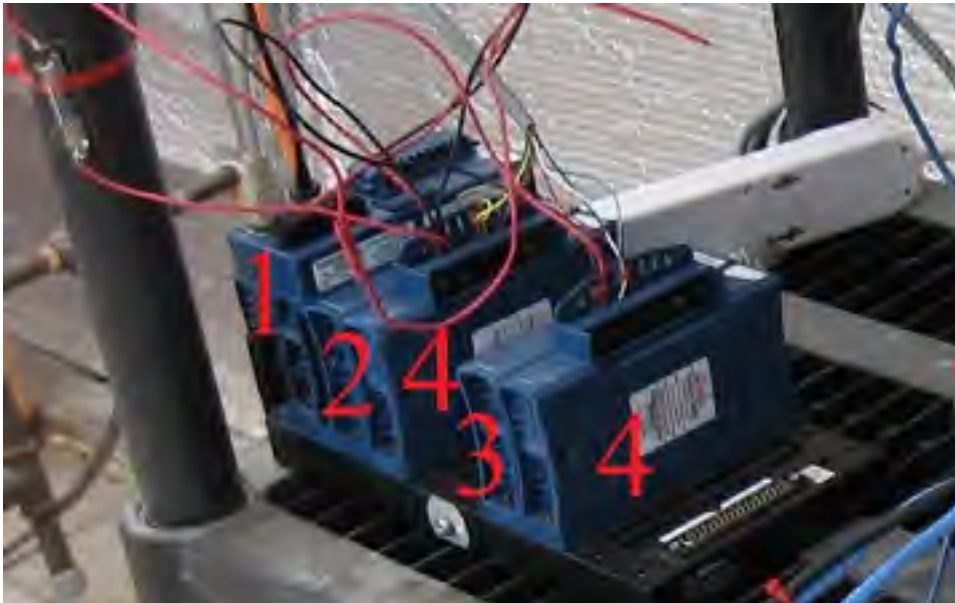


Figure 1.1 The controller setup as deployed within the ACMG on Devon Island. Shown are cFP-2120 (1), cFP-PWM-520 (2), cFP-RLY-421 (3) and cFP-CB-1 connector blocks (4)



Figure 1.2 Side view of the TIS-III as installed. Grow lights and fan inputs (1), camera Ethernet connection (2), camera power cable (3), cooling pipe (4)



Figure 1.3 Top view of the installed TIS-III NI-1744 Camera (1), Computer M1214-MP lens (2), camera guide bracket (3), camera Light control connector (4), excitation light board (5), cooling fan (6)

Table 1.1 TIS-III power budget

NI-1744 Camera	cFP-2120 Controller	PWM-520 Module	RLY-421 Module	Grow Lights	Excitation Lights	Cooling Fan
6.48 W	6.1 W	~0 W	~0 W	10.08 W	9.12 W	1.44 W

## 1.4.2 Software



Figure 1.4 LabView TIS-III control panel

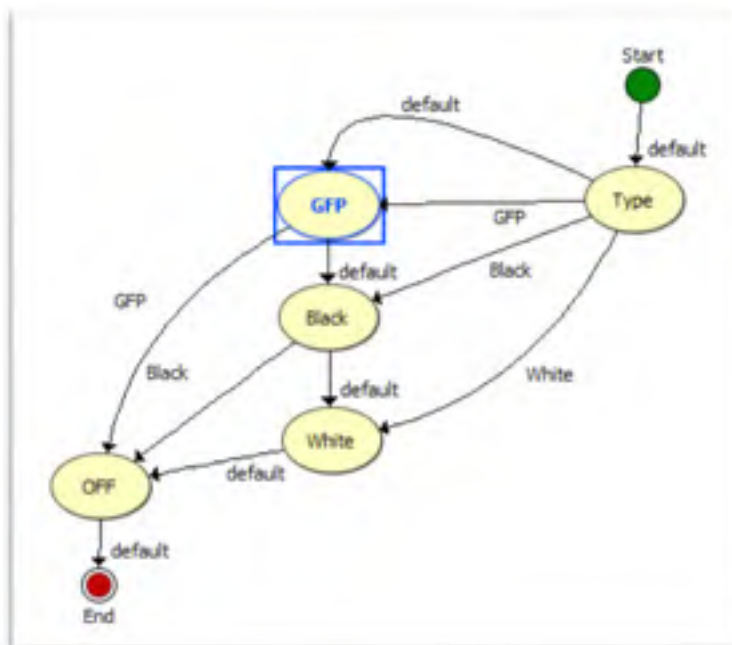


Figure 1.5 VBAI Inspection State Diagram (TIS-III capture sequence logic)

Communication with other parts of greenhouse is via Ethernet and IP protocols. The Linux-based embedded computer communicates with the controllers and cameras and uses an SDX-1100 modem that communicates with an MSAT satellite to transmit information south to the autonomous mission operations server at SFU, while commands are sent north. The TIS-III program was directly integrated in the ACMG software, both coded with LabVIEW, which made the imager part of the green house by receiving commands and sending information via the same communication system. Figure 1.4 presents the TIS-III software control panel: grow light intensity is controlled by setting the PWM value (0 to 100%), the light scheduling can be set to start and end twice any time during the day or stay on for 24 h. The time and frequency of the image capture sequence can also be set and sent by the user via satellite link. For compatibility with the green house software, all inputs are integer values. The capture sequences and excitation lighting control are controlled by the NI-1744 smart camera and coded with Vision Builder for Automated Inspection (VBAI). Figure 1.5 shows the VBAI Inspection State Diagram. The controller and camera communicate via shared variables through the network. When the Capture Sequence variable is set to Full, as in Figure 1.4, the VBAI State Diagram will follow the default path (Figure 1.5) and the camera will capture three types of images:

- 1) GFP: The grow lights are off and excitation lights are on. This image captures only the fluorescence emitted from the sample.
- 2) Black: All lights are off. This image is subtracted from the GFP image to remove any imperfections the CCD (e.g., bad pixels).
- 3) White: The two grow light boards are on. This image produces a regular 'white light' image.

All images files are saved in two formats. The Tagged Image File Format (TIFF) (Wikipedia, 2005) is a flexible format that normally saves 8 bits or 16 bits per color (8 bits equal 256 level of gray in our case) and uses a lossless compression. For the implemented camera the file size of 1.25 MB per image when the resolution is set to 1280 x 1024. The second format is JPEG (Joint Photographic Experts Group) (Wikipedia, 2007), a "lossy" compression method that compresses data by discarding (losing) some of it. The process aims to minimize

the amount of data that needs to be sent via satellite. The camera stores the data on the cFP-2120 controller's 4 GB compact flash card and named using the following format; ddmmyy-HHMMSS-type-Image.tif (or jpg). Due to the low speed of the communication link between the greenhouse and the satellite, only the JPEG images are transmitted over the satellite link for an initial review and to confirm plant status. The TIFF images are collected the next year field season for a full science study.

### 1.4.3 Grow Lights

To redesign the grow light board, different red and blue LEDs were selected based on recent studies (Goins et al., 1997; Porra, Thompson et Kriedemann, 1989; Schurr, Walter et Rascher, 2006; West-Eberhard, Smith et Winter, 2011) and the two types of red and blue LEDs were chosen based on the peak absorption wavelengths for chlorophyll *a* measured around 430 nm and 660 nm and for chlorophyll *b* around 454 nm and 643 nm. Since green light is primarily reflected by plants, only a small number of green LEDs were incorporated into the grow light board so as to permit more nominal 'white light' imaging and to complete the photosynthesis spectra. Laboratory light distribution tests were conducted to find a pattern that was considered to best illuminate the plant with all the needed light. Table 1.2 presents the LEDs selected and their specified wavelength outputs.



Table 1.2 Selected Roithner Lasertechnik LEDs utilized in the developed grow light boards and their respective wavelength ranges

Color	Item #	Range (nm)	Peak (nm)
○	ELD-670-524	660-680	670
●	ELD-650-523	640-660	650
○	LED450-06	430-450	445
●	5B4HCA-H	460-470	465
○	B5-433-B505	490-510	500
●	5G4HCA-H	520-530	525

To not obstruct the camera and the excitation lights, three small grow light boards were placed inside the TIS-III, in front of the Petri dish, two on the sides and one on the top. The lights rays focussed on the plants by lifting one end of each board by one cm, as shown in Figure 1.6.



Figure 1.6 Grow lights boards and positioning within the TIS-III

To minimise the complexity of the grow light printed circuit boards (PCB), LEDs of each row were connected in series and designed to use a 24 VDC power source, a voltage source readily available in the ACMG. The current in each row is limited by the LED that has the lowest maximum current. A ballast resistor for each row was added to limit the current to the maximum allowed in that row. The full red LED maximum current is 40 mA and all the

others are above that. From Ohm’s law the appropriate resistance was calculated to be  $R = 0.7V / 40 \text{ mA} = 17.5 \text{ Ohms}$  or higher. In addition, a potentiometer was added in case a higher voltage is needed. Each grow light board draws 140 mA, and thus the three consume approximate 10.08 W ( $420 \text{ mA} \times 24 \text{ V}$ ) at full intensity. Table 1.3 presents the voltage and distribution of LEDs of a single grow light board. The color pattern was distributed in such a way to cover all the plant area with the entire range of required wavelengths and angle was added to maximize the incident light on plants as shown in Figure 1.7.

Table 1.3 LED distribution and voltages

	Voltage of row 1	Voltage of row 2	Voltage of row 3	Voltage of row 4
<b>LED 1</b>	3.2	2.3	1.9	2.3
<b>LED 2</b>	1.9	3.3	2.3	1.9
<b>LED 3</b>	2.3	1.9	3.2	3.0
<b>LED 4</b>	1.9	2.3	1.9	3.3
<b>LED 5</b>	2.3	1.9	2.3	1.9
<b>LED 6</b>	1.9	2.3	1.9	2.3
<b>LED 7</b>	2.3	1.9	2.3	3.2
<b>LED 8</b>	3.0	2.3	3.3	1.9
<b>LED 9</b>	2.3	3.2	1.9	2.3
<b>LED 10</b>	3.3	1.9	2.3	1.9
<b>V Total</b>	<b>24.4</b>	<b>23.3</b>	<b>23.3</b>	<b>24</b>

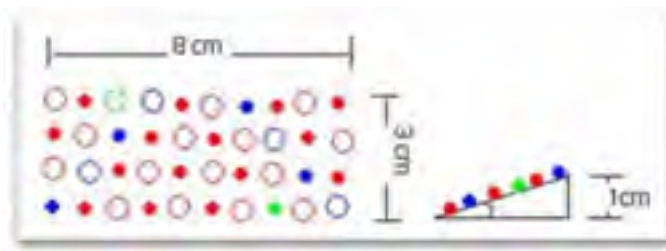


Figure 1.7 Grow light distribution pattern, size and installation angle

Being able to control the grow light intensity is a necessity; too much light will result in increased heat dissipation leading to heat stress responses in plants; too little light and the plants won’t grow properly. Two types of dimming are available: analog and by PWM. With

analog dimming, X% brightness is achieved by applying X% of the maximum current to the LED. The main downside to this process is LED color shifting, in which the emitted wavelengths are different depending on the applied current. This shift results in a failure to achieve the objective of emitting the desired wavelength. PWM dimming is accomplished by applying full current to the LED at a reduced duty cycle. For X% brightness, full current is applied at an X% duty cycle. The frequency of the PWM signal must be above 100 Hz to ensure that the PWM pulsing is not visible to the human eye. The TIS-III grow light intensity is controlled by PWM using an NI extension module cFP-PWM-520 module. Each grow light board is connected to a channel that can supply up to 1 A.

#### **1.4.4 Fluorescent Excitation Lights**

The excitation light board was also designed to use a 24 VDC power supply even though it's powered and controlled using the NI-1744 smart camera current source output. LEDs are current-driven devices whose illumination is proportional to their current. Their current can be controlled in two ways. The first method, which was used to control the grow light board, is to use the LED V-I curve to determine what voltage needs to be applied to the LED to generate the desired current. This is usually achieved by applying a voltage source and using a ballast resistor. However, this method has a major drawback especially for the excitation source. Any change in LED forward voltage generates a change in LED current. The need to be consistent is essential since the board is designed to excite the green fluorescent proteins and subsequently capture their fluorescence. Changes in the LED current will produce changes in the LED intensity, therefore variations in the captured fluorescence intensity. The preferred method of regulating LED current is to drive the LED with a constant-current source which is readily available on the NI-1744 smart camera. The current source is constant and eliminates changes in current due to variations in voltage, which translates into a constant LED brightness. The excitation board has 8 parallel rows of 6 LEDs in series. The Roithner LED (B56L5111P) sustains a voltage of 3.8 V at a current of 50 mA. The camera current source is set to a maximum of 400 mA (8 rows x 50 mA) which dissipate a total of

9.12 W during an excitation sequence. Figure 1.8 shows the powered excitation light board, behind a narrow band-pass filter to avoid any overlap and contamination of the emitted fluorescence, which would contaminate the resulting science. The TIS-II salvaged filter has a spectrum spread of 470 nm to 488 nm, with a band-pass mid-point of 475 nm. In addition, another recovered long pass filter (over 500 nm) was modified to fit in the TIS-III camera above the CCD and behind the optical lens.



Figure 1.8 TIS-III excitation LEDs behind a band-pass filter

## 1.5 Results and Discussion

All TIS-III hardware and software went through a month of verification and validation prior to the deployment to the Arctic greenhouse (Figure 1.9A). The output of the excitation lights (filtered light) and grow lights was verified using a USB4000 spectrometer, CC-3 cosine corrector, one meter QP400-1-UV-VIS optical fiber and SpectraSuite software from Ocean Optics (Longueuil, Quebec Canada). Measurements were taken using a calibrated FLUKE multimeter to verify the excitation lights current source output. An oscilloscope (Tektronix TDS3054B) was used to verify the PWM grow light voltage frequency, ratios and voltage output. After calibrating the lens to focus on the biological sensor and adjusting the camera

settings to capture the maximum amount of fluorescence (without saturation), tests were conducted to verify that only the emission lights were captured. The described validation process was implemented to confirm that the developed imaging system met all the initial design requirements. The process confirmed that all the components were communicating and performing nominally. In addition, to minimize technology deployment risk, maximize confidence in any new modifications and to improve researchers work efficiency, every new or improved system was validated at a replica of the ACMG greenhouse at the Canadian Space Agency (CSA) headquarters in Longueuil, Quebec (Figure 1.9B) (Paul et al., 2008). A simulated deployment was performed for the TIS-III at the CSA greenhouse and confirmed compatibility.



Figure 1.9 ACMG (A) and the CSA development greenhouse (B)

Upon arrival on Devon Island, several functional tests were conducted at HMP, before connecting TIS-III to the ACMG system, to ensure that nothing was damaged during shipping and handling of the system. In addition, the image sensor and lens were recalibrated using a calibration plate designed and fabricated by NASA Kennedy Space Center (KSC). During installation, it was realized that, unlike the CSA development greenhouse, the ACMG did not have a properly regulated 24 VDC output. The 24 VDC was connected directly to the DC renewable energy system battery bank. By examining the data collected by the greenhouse sensors of the previous year, it indicated that the 24 VDC unregulated line varies between  $\sim 23.5$  V to peaks of  $\sim 33$  V. The imager hardware was examined to study the possibility of modifying parts not capable of withstanding the high voltage peaks. The cFP-

2120 controller data sheet indicated that the power supply range was 11–30 VDC and since similar controllers were used from the beginning of the greenhouse deployment in 2002 (Giroux et al., 2006), it was concluded that it was safe to use the unregulated 24 VDC line on the TIS-III controller. The NI-1744 camera data sheet specified that the smart camera accepted power within the range of the industry standard IEC 1311 input power specification (24 V +20%/–15% with an additional allowance for an AC peak of +5%), at 33 V (short and infrequent peaks), it's slightly above that specified by the manufacturer. In addition, the camera was powered for only a few minutes every few hours. With this information it was also decided that it was safe to connect the camera directly to the unregulated line. Since the excitation board was connected to the camera current source (direct drive), not only the lights were safe, but their intensity would not fluctuate in the event of power variation as the camera would adjust to apply the same current set by the user. The only element that had to be further developed due to the issue of unregulated power was the grow light board and this was accomplished by increasing the ballast resistor values that limit the current. It was mentioned previously that a resistor for each row was added to limit the current to the maximum allowed in that row. Using this information, the specifications of the LEDs that limited the current in each row were consulted to determine the new ballast resistor values. It was also considered that since the voltage peaks are in bursts of short periods and as LED specifications indicated that they would withstand a higher current in short duty cycles, the new ballast resistor values were calculated using the higher current limits. This solution decreased the maximum grow light intensity, but the intensity was still maintained within the range of the Arabidopsis requirements. After the changes were implemented, the imager was connected to the greenhouse Ethernet hub, powered by the 24 V unregulated line and became part of the greenhouse sensor suite. Instructions and information were controlled by the greenhouse computer system. Images were stored on-site in the TIS-III controller and only JPEG files were sent via satellite with the rest of the ACMG data stream. Figure 1.10 shows TIS-III during the test phase conducted at the CSA (A) development greenhouse and during actual ACMG deployment (B).



Figure 1.10 CSA validation phase within the CSA development greenhouse (A), nominal operations within the ACMG (B)

TIS-III was deployed in the ACMG in July 2010 to help understand the operational constraints and to experiment with the integration of a fully automated imaging sensor within the ACMG system for a full year without any on-site human intervention. After deployment of the imager and departure of the field crew, TIS-III was set to capture a set of images (GFP, Black, and White) every six hours and the grow lights were operated at 100% intensity for 24 h a day. From July 10 to September 24 low resolution images were collected and transferred via the greenhouse satellite connection to Simon Fraser University. During this period, the greenhouse operated in its nominal fall operations mode where only the fall crop trays were watered (spring crop trays were inactive) (Giroux et al., 2006). Figure 1.11 shows a set of images taken during the fall run from July 11 to August 15, when the plants are in full growth and with a chosen interval of five days between images to better visualize the demonstrated growth.

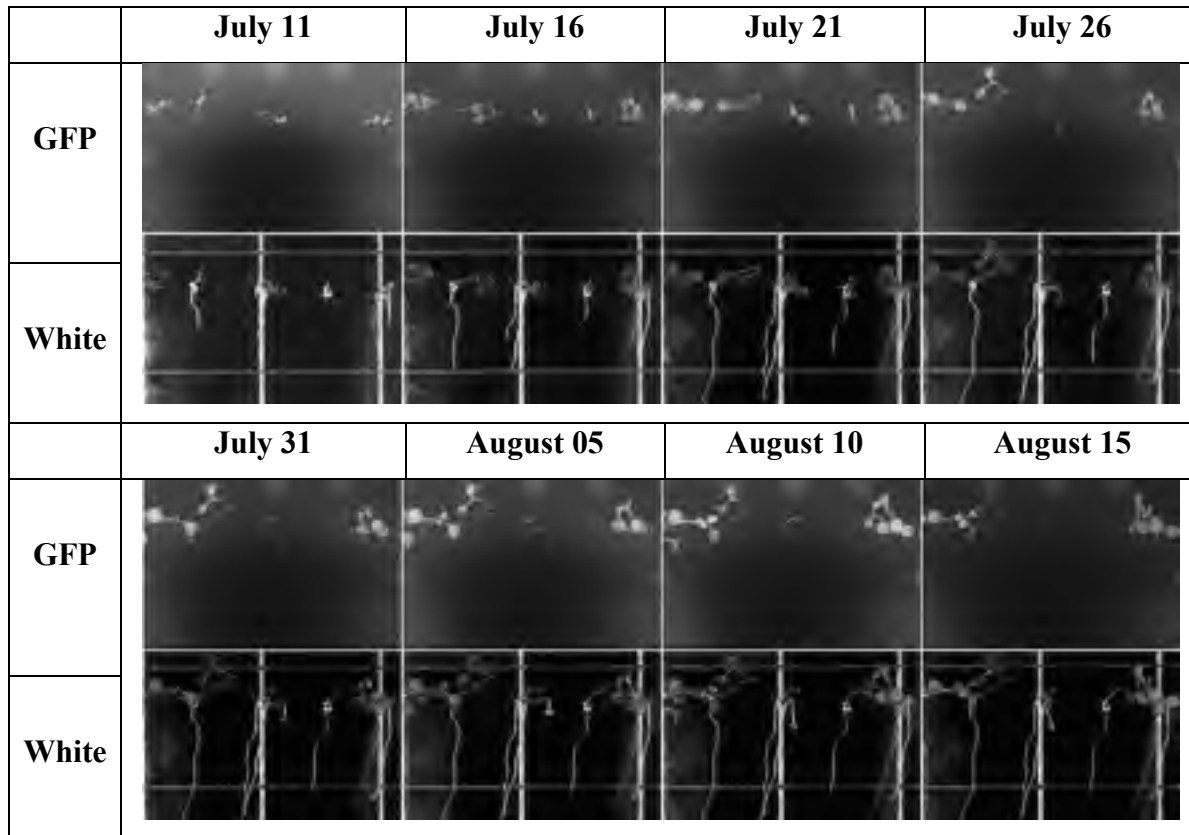


Figure 1.11 Automated 2010 fall operations run showing captured TIS-III and remotely downloaded plants expressing GFP and regular white light images. Images were cropped and processed to adjust contrast and brightness for publishing and printing purposes. Images were captured every 6 hours and the presented images reflect 35 days of growth with an interval of five days

Following the successful operation of the imager during fall 2010, ACMG commands were sent on September 24, via satellite link, to put the greenhouse into dormant mode, which allows the system to survive over the dark and cold season (Bamsey et al., 2009a). All systems, including TIS-III, were shutdown to conserve power, with the exception of the communication system to conserve energy. On May 1st 2011, greenhouse power was restored and TIS-III was reactivated. Still, with no human presence, TIS-III resumed collecting data and images and this information was sent south. It was then discovered that something was not operating nominally, in particular while the GFP images were fine, the regular white images were black. Following an extensive troubleshooting effort conducted



over the communications link it was concluded that a remote recovery was not likely. The research team determined that a small pre-field season visit would be conducted to repair the imager while at the same time replacing the biological sample contained within. This would permit a spring operations period to be conducted with the imager during the nominal ACMG spring operations phase. The imager recovery visit permitted the scientific principle investigators of the imager, who have themselves had substantial Shuttle and ISS payload experience, the opportunity to act in a contrasting role and in this instance, implement the overall research team's developed crew and imager repair procedures (cf. the investigators aiding in directing astronauts to conduct their developed on-orbit science/hardware operations). The repair deployment was conducted by a team of two and the conducted over a one day period (early July). The deployment team carried with them procedures for troubleshooting a suite of potential failure modes, tools and hardware for these repairs and a satellite phone to communicate with the ACMG operations team in the south. During this visit the crew traced the imager failure to a blown PWM module and in tandem to its replacement, installed a 24 VDC regulator on the line feeding the imager. Confirmation of the repair Figure 1.12 was soon obtained by the operations team when imaging data was successfully downloaded over the satellite link and nominal operations subsequently recommenced as shown in Figure 1.13.

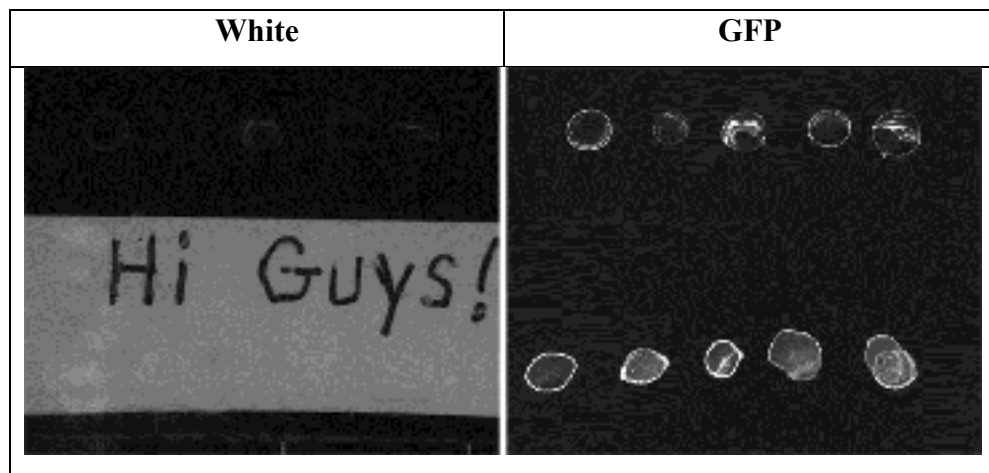


Figure 1.12 Spring season repair confirmation images downloaded south via satellite link

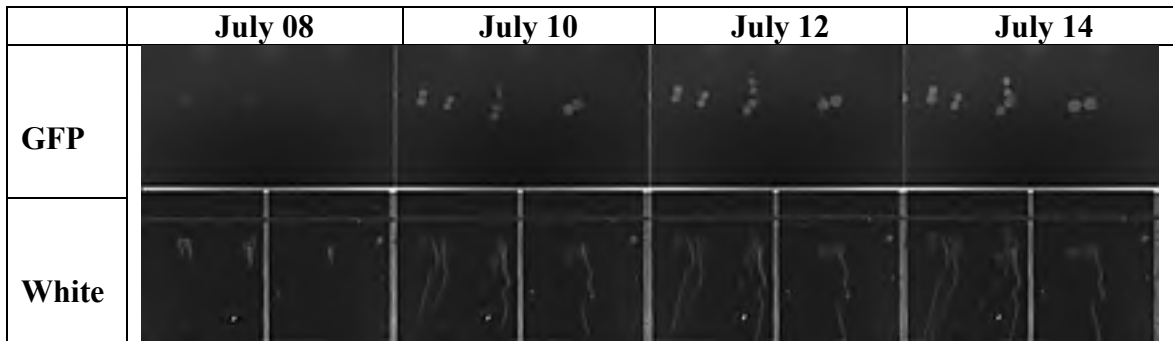


Figure 1.13 2011 Automated spring run showing captured and remotely downloaded plants expressing GFP and regular white light images. Images were cropped and processed to adjust contrast and brightness for publishing and printing purposes. Images were captured every six hours and the presented images reflect approximately six days of growth with an interval of two days

## 1.6 Conclusions

An imaging device that captures *in situ* biological signals and translates these signals into measures of plant stress would be a valuable diagnostic tool for bio-regenerative life support systems. Numerous systems are available for capturing fluorescence in the laboratory but are restricted to the collection of data locally. However, biological experiments in space or in remote regions will likely be autonomous and include robotic operations where telemetric commands and data collection is a necessity because of crew unattainability and safety. The development of the fully integrated imaging system that captures fluorescence images is a significant step that stretches the technical capability of sending diagnostics in a telemetric fashion from an extra-terrestrial location. TIS-III was developed with new features including the custom designed LED grow and excitation light boards, filters, data acquisition, control system and basic environmental control, all powered with a single power source readily available at the northern greenhouse. In addition, TIS-III software was coded and integrated to the ACMG operating system, which made imager hardware and software fully compatible with the ACMG systems and contributed to the successful imager deployment as part of the sensor suite in the ACMG. Also contributing to the successful deployment was the test and simulated operations of the imager within the CSA development greenhouse. The usefulness of such an integrated test, one that included both validation of hardware as well as validation

of science output is one that other such remote/extreme environment hardware deployments should consider.

TIS-III was the first imager that ran autonomously in the un-crewed greenhouse, its deployment in the ACMG and its subsequent full year of operations have demonstrated the feasibility of plant diagnostic systems that transmit and receive data by satellite link allowing near-real time monitoring and control of space biology experiments and bio-regenerative life support systems.

## **1.7 Acknowledgements**

The Houghton Mars Project Arthur Clarke Mars Greenhouse shell was donated by SpaceRef Interactive Inc. and established at the project's Base Camp (now Houghton Mars Project Research Station) with initial sponsorship support from the Ontario Centers of Excellence (OCE) and NASA. The greenhouse facility is currently managed and operated by the Mars Institute, in partnership with the SETI Institute and Simon Fraser University. Alain Berinstain of the Canadian Space Agency was the Principal Investigator in the Arthur Clarke Mars Greenhouse from 2002 – 2011. During this time the greenhouse was supported by the Canadian Space Agency, the University of Guelph, Simon Fraser University and the SETI Institute. We thank Martin Bergeron of the Canadian Space Agency, for his help, support and valuable manuscript suggestions. We also thank Pierre Lortie, Ralph Nolting and Maxime Pepin-Thivierge of the Canadian Space Agency machine shop for contributing to the mechanical design and for aiding in prototype construction. The authors recognize and thank Trevor Murdoch for the design of the original GIS imaging system, the shell of which formed the basis of the imager in this article. This work was supported in part by NASA grants NNX09AO78G and NNX09AL96G to Robert Ferl and Anna-Lisa Paul.



## CHAPITRE 2

### MULTISPECTRAL PLANT HEALTH IMAGING SYSTEM FOR SPACE BIOLOGY AND HYPOBARIC PLANT GROWTH STUDIES

Talal Abboud<sup>1,2</sup>, Alain Berinstain<sup>1</sup>, Matthew Bamsey<sup>3</sup>, Robert Ferl<sup>3,6</sup>, Anna-Lisa Paul<sup>3</sup>,  
Thomas Graham<sup>4</sup>, Mike Dixon<sup>4</sup>, Demos Leonardos<sup>4</sup>, Michael Stasiak<sup>4</sup> and Rita Noumeir<sup>2</sup>,

- <sup>1</sup> Space Science and Technology, Canadian Space Agency, 6767 route de l'aéroport,  
Longueuil, QC J3Y8Y9, Canada; E-Mail: alain.berinstain@asc-csa.gc.ca
- <sup>2</sup> École de technologie supérieure, 1100 rue Notre-Dame O, Montréal, QC H3C1K3, Canada;  
E-Mail: rita.noumeir@etsmtl.ca
- <sup>3</sup> Horticultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL 32601, USA;  
E-Mails: matthew.bamsey@ufl.edu; alp@ufl.edu; robferl@ufl.edu
- <sup>4</sup> Controlled Environment Systems Research Facility, School of Environmental Sciences,  
University of Guelph, 50 Stone Road East, Guelph, ON N1G2W1, Canada; E-Mails:  
tgraham@uoguelph.ca; mdixon@uoguelph.ca; mstasiak@uoguelph.ca;  
dleonard@uoguelph.ca
- <sup>5</sup> Interdisciplinary Center for Biotechnology Research, University of Florida, Gainesville, FL  
32610, USA

Article publié à la revue « Insciences » dans la section « Sensors » le 03 Juin 2013.

#### 2.1 Abstract

Ensuring high plant yields is critical for the application of higher plants to space-based biological life support systems. An imager capable of monitoring several fluorescent biological markers in real-time would provide a robust health monitoring system and allow growers to minimize environmental stressors. This article reports the results of the design and development of a multispectral plant health imager prototype, employed in a low-pressure plant growth chamber as a test of its functionality in spaceflight systems. Images were collected every four hours with a monochromatic camera and a commercial liquid crystal tunable filter. This arrangement permitted the monitoring of emission from introduced green

fluorescent proteins as well as chlorophyll fluorescence. Data were saved locally and accessed in real-time from the exterior of the chamber.

**Keywords:** plant health imaging, multispectral imaging, remote sensor, biological life support, space analog.

## 2.2 Introduction

Humans face a variety of challenges as they continue to explore beyond the frontiers of planet Earth. Exploration missions are often severely constrained by launch mass and resupply considerations. The use of plants as part of life support systems continues to be explored as an approach for more sustained human presence in space. In particular, bioregenerative life support systems have been considered since the early 20<sup>th</sup> century (Wheeler, 2010). The Canadian Space Agency, University of Florida and University of Guelph have been involved in assessing the possibility of supporting human presence on the Moon and Mars by deploying greenhouses as plant production system test-beds (Bamsey et al., 2009a; Bamsey et al., 2009b). The main concept is the use of plants to regenerate the three cornerstones of human consumable requirements; air, water and food (Tamponnet et Savage, 1994). Spaceflight and other extraterrestrial environments provide unique challenges for plant life. There originates the importance of understanding the metabolic issues that can influence plant growth and development in space. Plant monitoring systems with the capacity to observe the condition of the crop in real-time within these systems would permit operators to take immediate action to ensure optimum system yield and reliability. In addition to the utilization of chlorophyll fluorescence, specific stress response genes can be tagged with reporter genes encoding a variety of fluorescent proteins, allowing gene activities, and by extension plant health, to be monitored through the fluorescence of these gene products (Plautz et al., 1996). The Transgenic Arabidopsis Gene Expression System (TAGES) is a biosensor that uses *Arabidopsis thaliana* fluorescence information from both naturally occurring chlorophyll red/near infrared fluorescence, as well as green fluorescence originating from the gene products of green fluorescent protein (GFP) reporter genes (Manak

et al., 2002; Paul et al., 2003). Several commercial systems are available for imaging and capturing plant fluorescence, but most analytical procedures involve laboratory examination and human input. However, advanced biological experiments on orbit, the Moon, and Mars are likely to be autonomous, precluding any direct human control over the monitoring/imaging systems. Furthermore, if a mission does include a physical human presence, there are still system trade-off considerations between internal greenhouse/growth chamber operating pressure, up-mass and crew time requirements that may still dictate completely robotic and/or autonomous bioregenerative life support systems (Paul et Ferl, 2006).

A Multispectral Plant Health Imaging System (M-PHIS) would provide a considerable step forward in our capacity to monitor advanced life support crops in an autonomous manner (Baker et Rosenqvist, 2004; Ehlert et Hinch, 2008; Galston, 1992; Lichtenthaler et Babani, 2000; Manak et al., 2002). This article describes the design and development of a prototype multispectral fluorescent imaging system deployed in a hypobaric plant growth chamber at University of Guelph. The imager was designed primarily for multiband imaging of chlorophyll and protein fluorescence with the design being driven by portability and autonomous functionality considerations. The design was also novel in that it employed a commercially available liquid crystal tunable filter (LCTF) and a custom developed LED board with an independently variable grow light LED array. This prototype imager provided real-time data while it was operated within a low pressure chamber through the use of a controller, a smart camera, and a custom designed and variable outputs grow and excitation light emitting diode (LED) light array. The deployment in a low-pressure chamber represents one of a number of possible space analogue and on orbit deployment scenarios. The results of this work will direct future efforts in this area of research and drive further design improvements.

## **2.3 Materials and Methods**

The primary improvement of the M-PHIS over previously developed space analogue plant health imagers employed by this research team is its ability to selectively detect fluorescence at user selectable center wavelengths and bandwidths. In particular, the LCTF permits the ability to monitor plant-emitted light at any wavelength between 420 and 730 nm and at varied bandwidths. A custom developed LED board furthers the imager selectivity through highly controllable grow light output and selection of varied excitation energy and center wavelengths and thus better permits the targeting of individual fluorophores [compounds that can re-emit light upon excitation] of interest.

### **2.3.1 Excitation, Emission and Imaging Capture Requirements**

Green fluorescent protein fluoresces in the green waveband when exposed to light in the blue through ultraviolet wavebands. Many GFP variants exist; however, the S65T variant is utilized in this hardware demonstration and characterization study (the S65T variant will be referred to simply as GFP for the remainder of this paper). GFP emission arises within the green portion of the visible spectrum with a peak at approximately 512 nm (Manak et al., 2002; Stewart, 2001). However, fluorescence emitted by GFP covers a considerable bandwidth, meaning that useful data is also available on either side of this  $\lambda = 512$  nm emission peak. It is important to note that GFP's excitation peak is at approximately  $\lambda = 488$  nm and that this wavelength is very close to the short end of the GFP emission spectrum (Heim et Tsien, 1996; Manak et al., 2002). This small separation implies that care must be taken to ensure that the excitation light is sufficiently filtered to guarantee no overlap with the emitted light from the sample. This can be achieved by selecting excitation lights that do not radiate above some specified wavelength, or more easily, by filtering all wavelengths above the selected wavelength; in this case, approximately 493 nm. For GFP fluorescence the image sensor must then be capable of monitoring wavelengths between 502 and 550 nm. Chlorophyll autofluorescence e.g. red (630 – 680 nm) and NIR (>680 nm) can be excited



across a broad wavelength region spanning 250 to 675 nm with excitation peaks at 430 nm, 470 nm, 600 nm and 660 nm (Corp et al., 1996).

### **2.3.2 Hypobaric Plant Growth Chambers**

In order to simulate spaceflight deployment conditions that the imager may be expected to perform under, a hypobaric chamber was used to isolate the imager and to serve as a platform for long duration operational tests. A canopy scale hypobaric plant growth chamber (Figure 2.1) at the University of Guelph's (Ontario, Canada) Controlled Environment Systems Research Facility (CESRF) was utilized for the test. The CESRF maintains and operates 20 sealed environment chambers including 14 variable pressure chambers capable of sustaining a near vacuum (<1 kPa) (Bamsey et al., 2009b). Of these 20 chambers, five are fully automated canopy-scale hypobaric chambers and measure 1.0 x 1.8 x 2.5 m with a total volume of approximately 4500 liters and providing a plant growth area of 1.5 m<sup>2</sup> (Wehkamp et al., 2012). The light canopy, irrigation and nutrient control system is outlined in Figure 2.1A, while the M-PHIS is shown deployed inside the chamber in Figure 2.1B.



Figure 2.1 Canopy-scale hypobaric chambers at the Controlled Environment Systems Research Facility (CESRF), University of Guelph: A) Exterior showing lighting canopy, irrigation and nutrient control system, B) M-PHIS deployed in a CESRF hypobaric plant growth chamber

## 2.4 Multispectral Plant Health Imaging System

The M-PHIS (Figure 2.2) is a modified version of the TAGES Imaging System-III (TIS-III), which was deployed in the Arthur Clarke Mars Greenhouse in the High Arctic on Devon Island (Abboud et al., 2013a). TIS-III was a modified version of TIS-II, a second generation imaging payload that was designed to collect GFP data in real-time during a spaceflight experiment (Paul et al., 2008; Paul et al., 2003). The M-PHIS boasts several new features including the capacity to capture images a variety of wavelengths. In addition to capturing GFP expression, M-PHIS could be employed to capture yellow and red fluorescent proteins as well as chlorophyll's red/near infrared fluorescence and more. In addition, the filter bandwidth could be set by adjusting the LTCCF's full width at half max (FWHM). The FWHM is the range of wavelengths (bandwidth) where a filter passes at least 50% of the light intensity that it passes at the central wavelength. For example, a 510 nm band-pass

filter with a FWHM of 20 nm will transmit at least 50% of the light intensity it transmits at this central wavelength between the range 500 to 520 nm. The second most important feature is the independently controllable plant grow light wavelengths. The user has the capacity to set the grow light intensity and the ratio between red and blue wavelengths to match the requirements of the test plants in the system. Given the control over grow light intensity, M-PHIS can also be used to study the influence of different light intensities and red/blue ratio on plant growth.

#### **2.4.1 Hardware**

The multispectral imaging system uses a National Instruments (NI) NI-1744 smart camera as an image capture device (Figure 2.3). The camera includes a 1280 x 1024 monochrome 8-bit pixel depth CCD, built-in lighting controller, Ethernet ports, and is programmable with NI LabVIEW Real-Time Module or with Vision Builder for Automated Inspection (VBAI). Excitation light is generated by a set of blue LEDs and subsequently filtered by custom sized (65 x 65 mm with 30 mm diameter central hole) a 490 nm short pass filter (Omega Optical) before being incident on the biological sample as shown in Figure 2.5. Emission filtering is conducted through the application of a Meadowlark TOF-SB-VIS LCTF. By utilizing multiple liquid crystal variable retarders and polarizers, the tunable filter is able to select any central wavelength for the passband from 420 to 730 nm. In addition, it permits three different bandwidth sizes to be chosen: narrow, medium and wide. To avoid Kalnienk vision (circular tunnel-like field of vision), due to the physical dimensions of the LCTF (nine centimeter length), a Computar M2514-MP lens with a long focal length of  $f = 25$  mm was needed and attached to the camera. This explains the requirement for the long 30 cm distance between the end of the LCTF and the sample holder, since a closer target resulted in an out-of-focus image. A custom designed bracket attachment held the three elements (camera, lens and LCTF) in line as shown in Figure 2.3. A local network links different components through an Ethernet hub. These components, namely the imaging system, tunable filter controller, grow lights, white lights, cooling fans, power systems and the data acquisition system, are controlled through NI Compact FieldPoint modules (cFP-2120). NI pulse width

modulation (PWM) modules (cFP-PWM-520) controlled the different grow light wavelength intensities, a relay module served as a switch for the camera, cooling fans, white lights and tunable filter controller, and a thermocouple input module acquired temperatures in front and behind the biological sample holder. To simplify the design, 24 VDC components were selected for the build since the NI controller and camera utilized a 24 VDC power supply. The LCTF (Figure 2.3) is the only component requiring a different voltage. LabVIEW code provided by Meadowlark was integrated into the main imager control software program to permit control of the LCTF through a serial connection to the Compact FieldPoint controller. In addition, a hardware connection was made between the NI-relay and the LCTF controller to control the tunable filter power feed. A small printed circuit board (PCB) containing only white LEDs was positioned directly in front of the biological sample tray, was utilized to illuminate the samples when capturing normal (non-fluorescent) images (Figure 2.4). The other optical elements of the imager and their respective positions are provided in Figure 2.5.

The power budget for each component of M-PHIS is displayed in Table 2.1. As not all components are active at the same time, actual instantaneous power consumption depends on the current state or operational mode of the imager. When the full grow light board is set at 100% intensity, the total power consumption is approximately 68.12 W (54.7 W + 6.1 W + 3 W (max) + 4.32 W). During a typical capture sequence, which in nominal operations mode occurs once every four hours, the camera and LCTF are powered on for approximately twenty minutes, the excitation LEDs for three minutes and the white light board for one minute.

Table 2.1 Power consumption of Multispectral Plant Health Imaging System components

<b>Component</b>	<b>Power</b>	<b>Component</b>	<b>Power</b>
NI-1744 Camera	6.48 W	Ethernet Switch	~3 W (Max)
cFP-2120 Controller	6.1 W	Grow Lights	See Table 2.3
cFP-PWM-520 Modules	0 – 1 W (Max)	Excitation Lights	9.64 W
cFP-RLY-421 Module	0 – 2.5 W (Max)	White Light	~3 W
cFP-TC-120 Module	0.35 W	Cooling Fans	4.32 W
LCTF	~6 W		

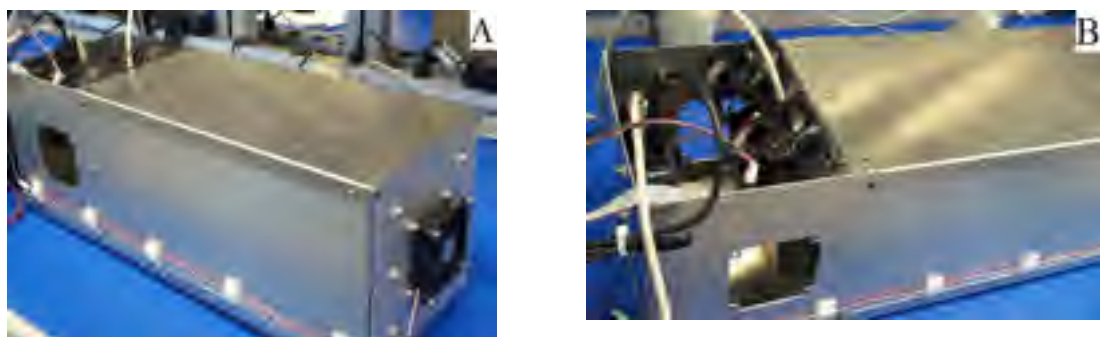


Figure 2.2 Multispectral Plant Health Imaging System (M-PHIS) Front (A), Back (B)

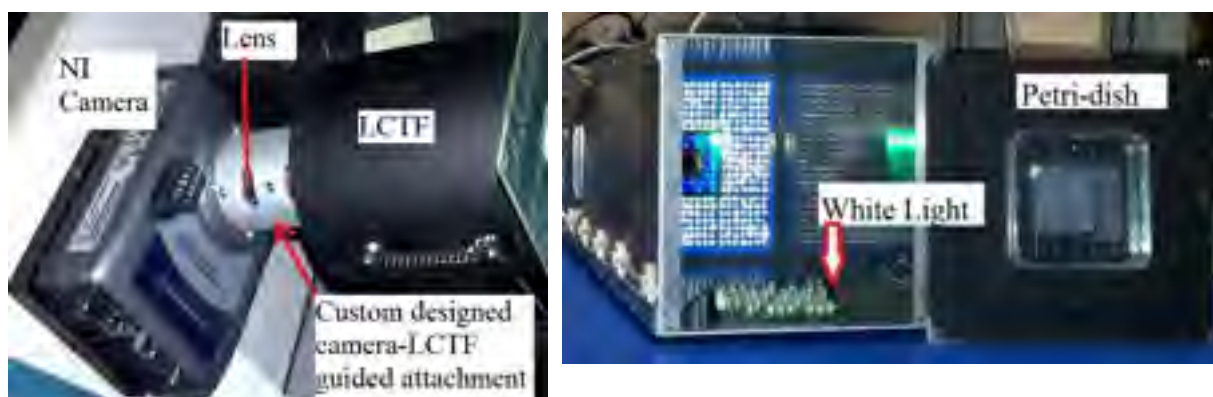


Figure 2.3 NI-1744 Camera (left), bracket attachment and LCTF (right)

Figure 2.4 White LEDs and biological sample holder showing installed Petri dish with calibration targets

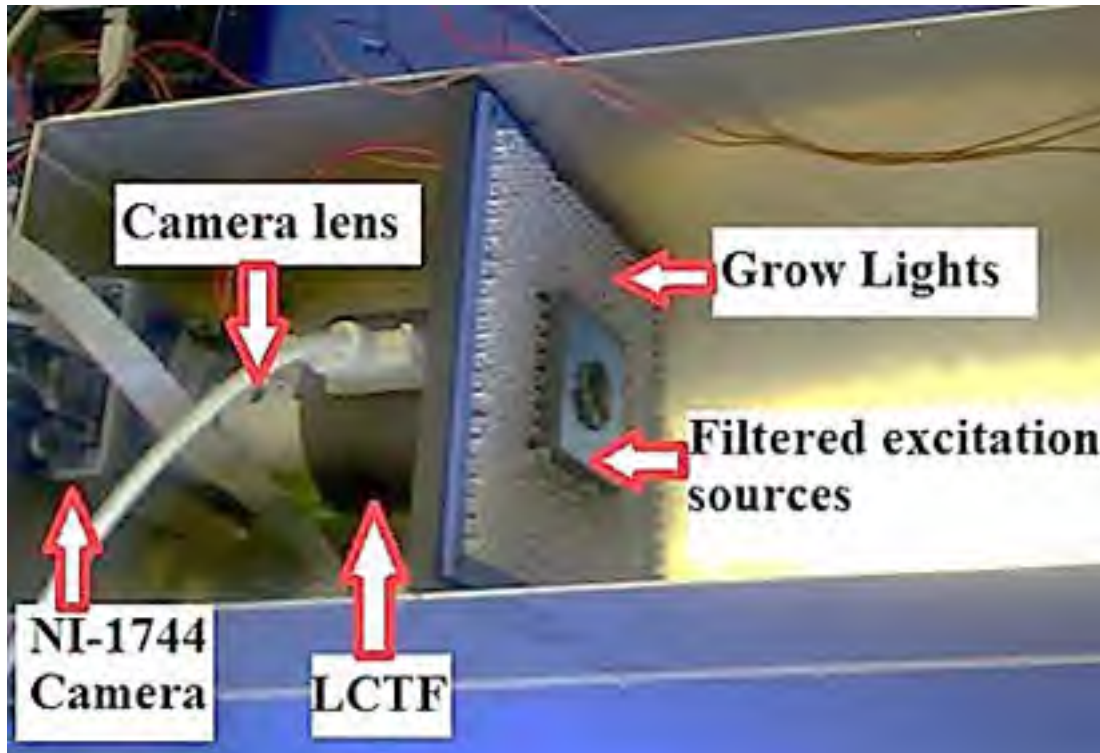


Figure 2.5 Multispectral Plant Health Imaging System (M-PHIS) with top cover removed and internal items shown

#### 2.4.2 Grow Lights

The design of an LED grow light / excitation light board built from the ground up was novel in its ability to have independent control over the intensities of each wavelength. LEDs have long lifetimes, require little maintenance, are relatively energy efficient and are a rapidly advancing technology area. These features make LEDs an increasingly advantageous technology for artificial lighting in plant growth systems (Folta et al., 2005) and the preferred lighting technology for M-PHIS. Different red and blue LEDs were selected based upon previous studies of their application to plant growth (Goins et al., 1997; Porra, Thompson et Kriedemann, 1989; Schurr, Walter et Rascher, 2006; West-Eberhard, Smith et Winter, 2011). Three types of red and blue LEDs were chosen based on the peak absorption wavelengths of chlorophyll *a* and *b*; 430 to 470 nm and from 630 to 680 nm respectively. Since green light is

primarily reflected by plants, only a small number of green LEDs were incorporated into the grow light board (Folta et al., 2005). Laboratory light distribution tests were conducted to find an illumination pattern that was considered the best at illuminating the entire plant growth area when utilizing plants grown in a standard 10 cm x 10 cm rectangular Petri dish as shown in Figure 2.6 (note: the imager can be modified to incorporate plant samples of other sizes and orientations). Figure 2.7 and Table 2.2 present the distribution of M-PHIS's primary LED board incorporating both the growth and excitation LED sets. The measured relative irradiance spectra of M-PHIS's LED grow lights with all grow LEDs activated is shown in Figure 2.8.

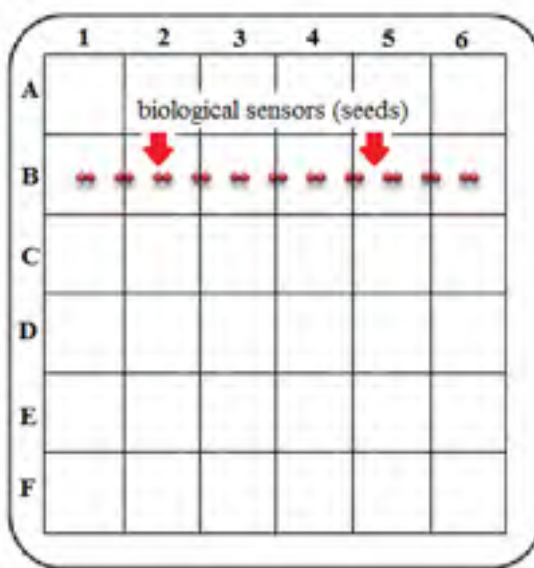


Figure 2.6 *Arabidopsis thaliana* seeds containing reporter genes growing vertically in a 10 cm<sup>2</sup> plates

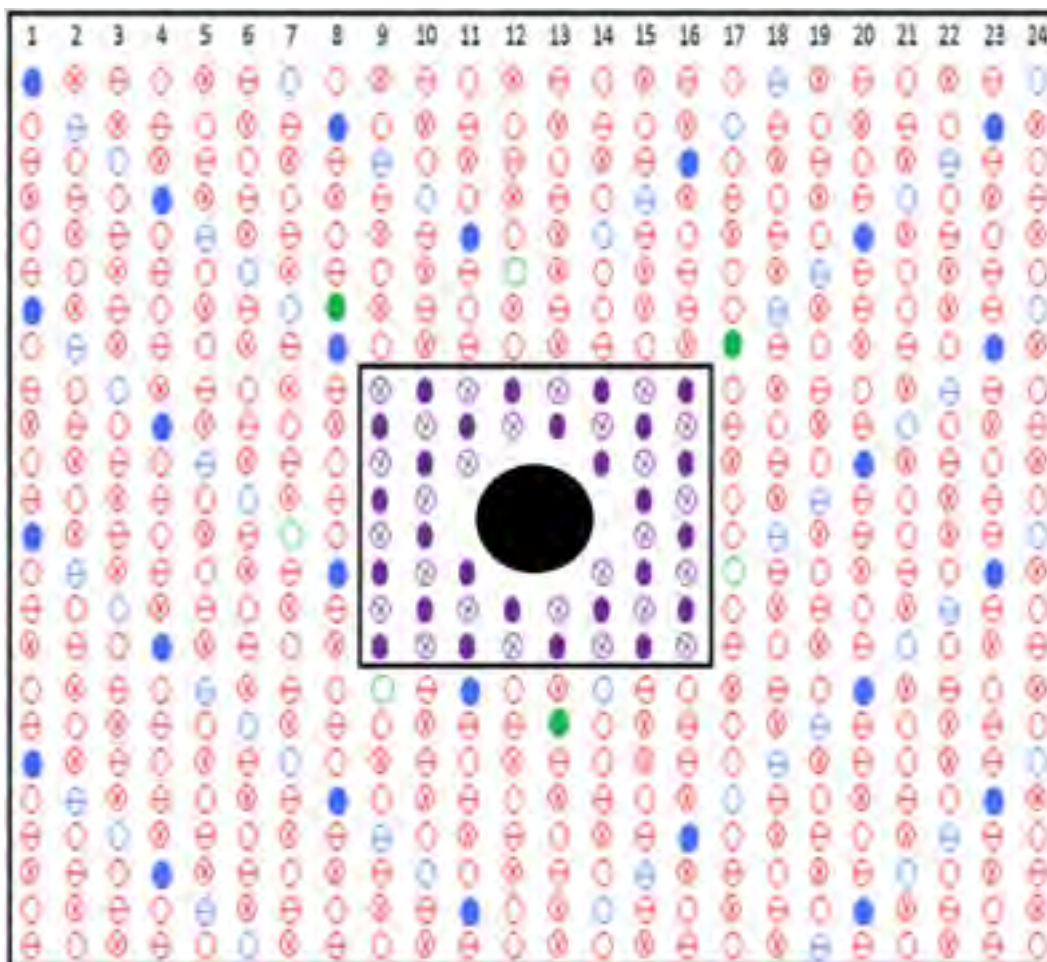


Figure 2.7 Distribution of grow lights (exterior rectangular region) and excitation lights (interior rectangular region). The centre hole is aligned in front of the LCTF and camera to permit imaging through the LED board



Table 2.2 Selected Roithner Lasertechnik grow and excitation LEDs, top-level specifications and their quantity within the developed Multispectral Plant Health Imaging System (M-PHIS) LED board

LED	Peak Wavelength (nm)	Max Voltage (V)	Max Current (mA)	Quantity	
<b>Grow Lights</b>					
⊖	B5b-436-30	660	2.4	30	117
⊗	B5b-435-TL	630	2.5	50	117
○	ELD-670-524	680	2.2	50	117
⊖	LED435-12-30	435	3.5	25	21
●	B56L5111P	470	3.4	50	21
○	LED450-01	450	3.4	50	21
○	B5-433-B505	500	4.0	30	3
●	5G4HCA-H	520	3.8	30	3
<b>Excitation Lights</b>					
⊗	LED450-01	450	4.0	50	24
●	B56L5111P	470	3.8	50	24

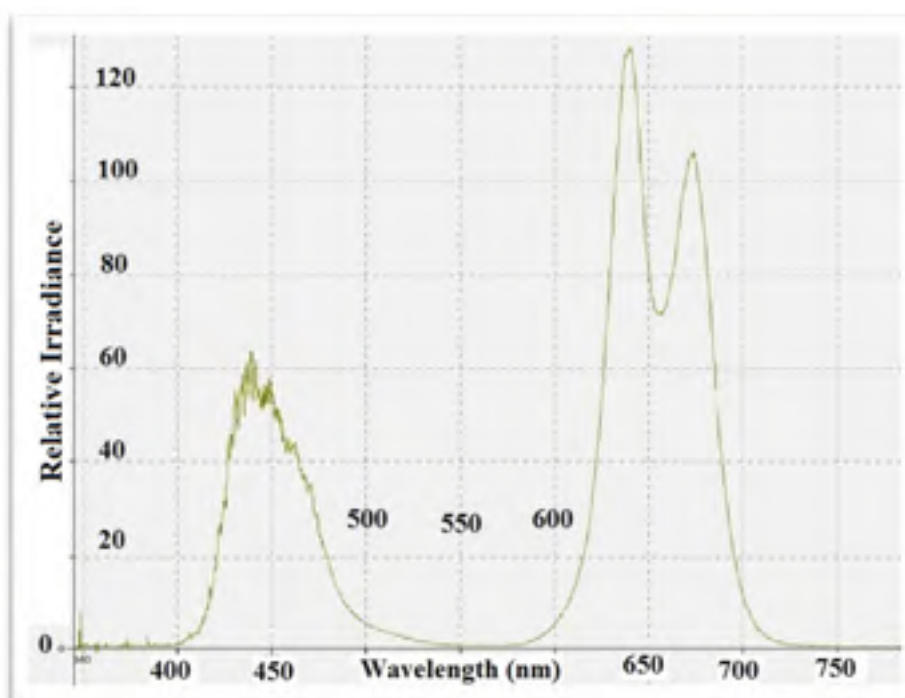


Figure 2.8 Relative irradiance spectra of the Multispectral Plant Health Imaging System (M-PHIS) primary LED board

In addition to the various light combinations and ability to tune the output wavelengths, the upper and lower half of the M-PHIS LED board can be independently controlled. This separate control is advantageous because it allows the operator to more easily illuminate the area where the plant's leaves are located while applying less light to the roots where it is typically not required. This can result in energy savings, which is of paramount importance when designing for spaceflight experiments where power is often a limitation. The utilization of fewer LEDs also resulted in a reduction in heat generation and heat management requirements. Figure 2.9 exhibits several examples of the various possible light combinations and intensity control provided by the LED board.

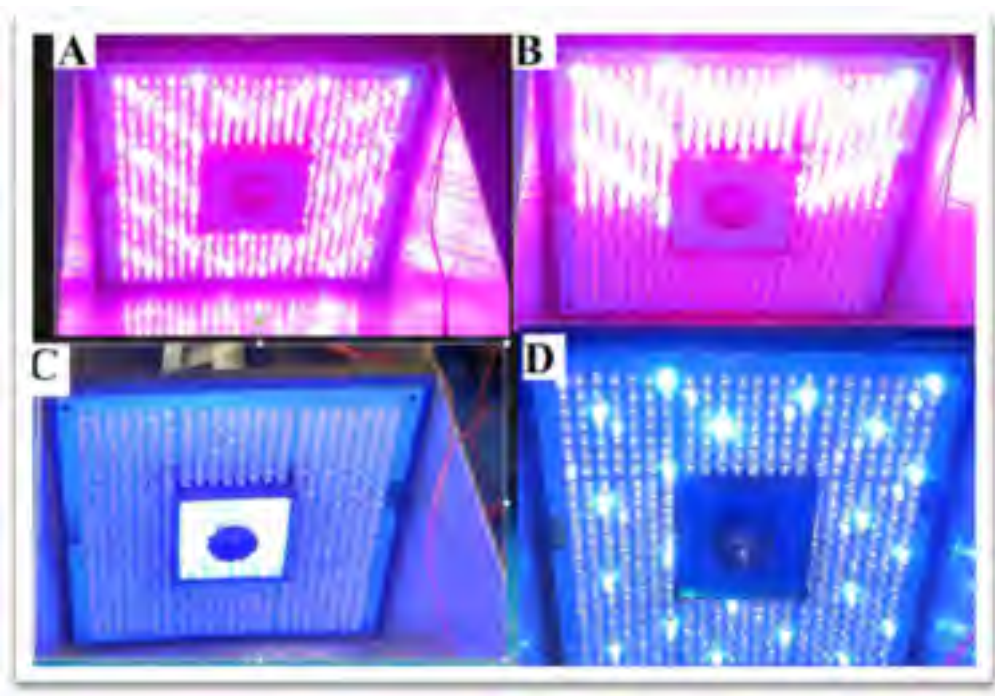


Figure 2.9 Grow / excitation light board in operation. A) All grow lights activated at 5% intensity. B) Upper section, all grow light enabled at 10%. C) Excitation lights activated at 25% D) 470 nm LEDs activated at 5%

To better focus the energy emitted by the grow lights on the biological target, a parabolic angle was built into the LED board by employing a custom LED guide produced on a 3D printer (Figure 2.10). The guide was installed on the circuit board before populating it with

LEDs. Grow light LED circuits were designed using series/parallel combination of LEDs with each chain incorporating a ballast resistor in series with the LEDs. Figure 2.11 provides an example of the described series/parallel arrangement of LEDs for the B5b-435-TL grow LEDs and serves as a useful reference for the power analysis described in the following sections. Resistors were installed on the back of the PCB, outside and away from the biological sample chamber. Cooling fans were located near this back face to aid in dissipating the heat generated by the LEDs.

During the design, two types of dimming were considered: analog and PWM. With analog dimming, X% brightness is achieved by applying X% of the maximum current to the LED; note however, that the relationship between current and output intensity is not perfectly linear. The main downside of this process is a shift in the peak output wavelength of the LEDs with changing input current. Dimming via PWM is accomplished by applying full current to the LED at a reduced duty cycle. For X% brightness, full current is applied at an X% duty cycle. The frequency of the PWM signal must be above 100 Hz to ensure that the PWM pulsing is not visible to the human eye. The M-PHIS grow light intensity was controlled by PWM using a NI cFP-PWM-520 module. Table 2.3 presents grow light power consumption information for each particular LED set.

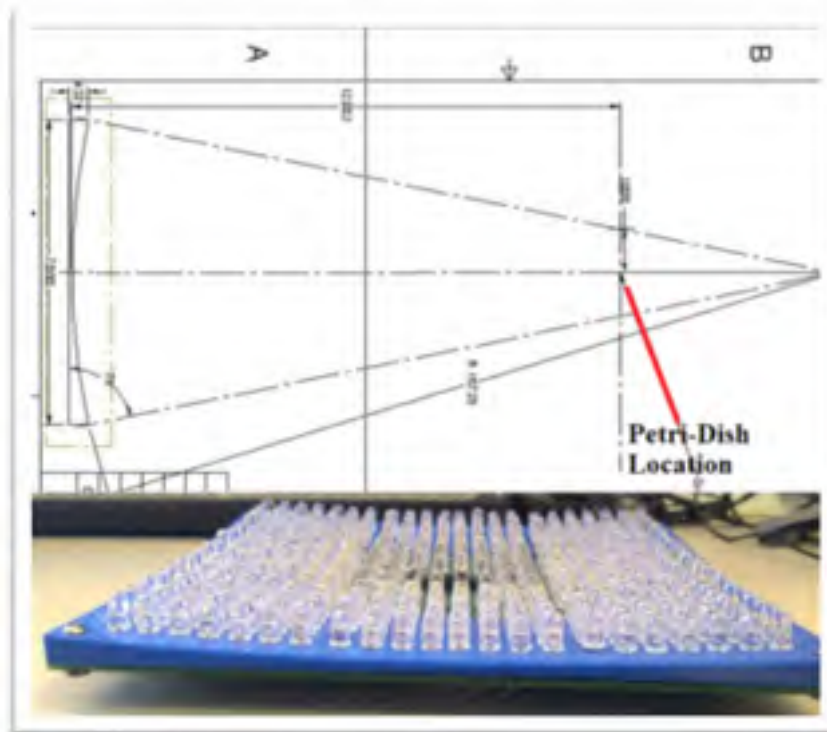


Figure 2.10 Demonstrating Multispectral Plant Health Imaging System (M-PHIS) grow light board parabolic angle that aids in focusing the energy emitted on the desired target

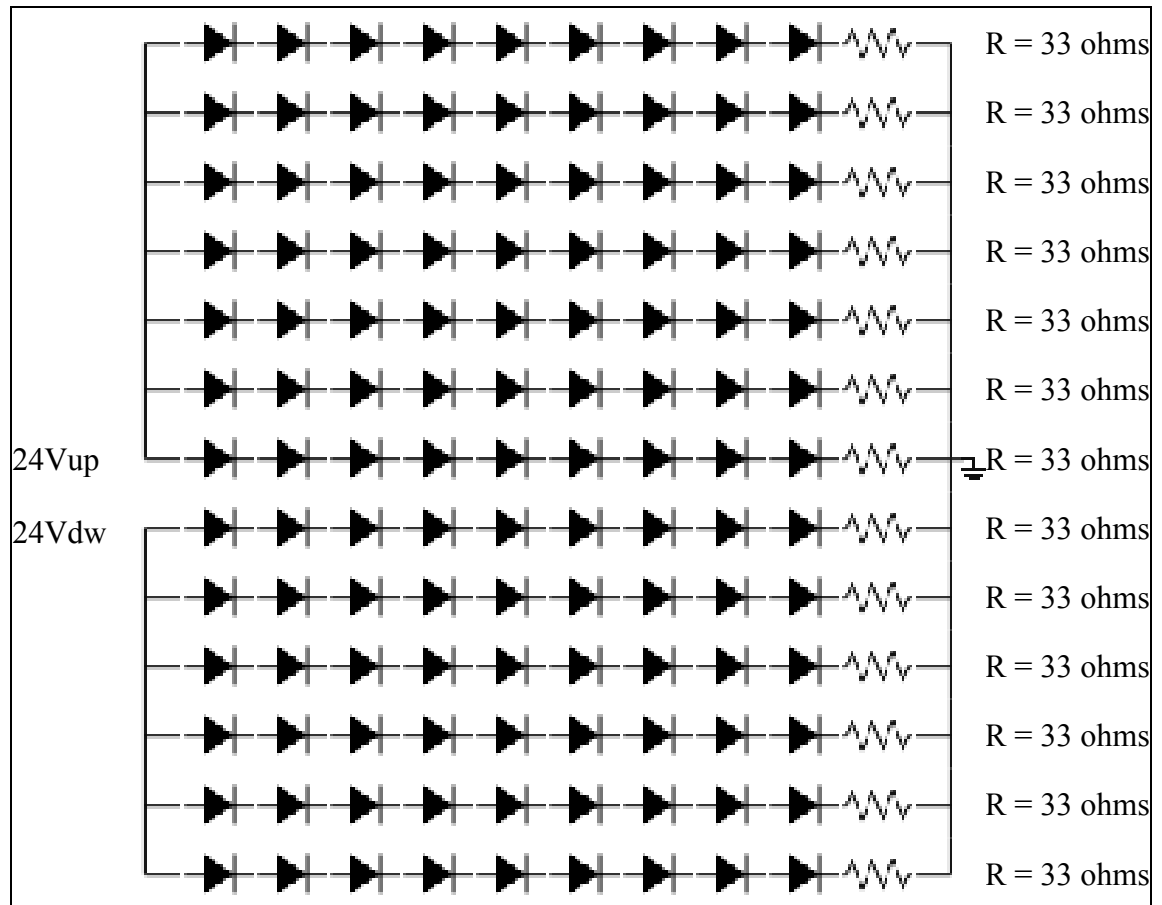


Figure 2.11 Electrical schematic for B5b-435-TL. Each 33 ohm resistor dissipates 82.5 mW. Together, all resistors dissipate 1072.5 mW (577.5 mW up & 495 mW dw). Together, the diodes dissipate 14625 mW (7875 mW up & 6750 mW dw). Total power dissipated by the array is 15697.5 mW (8452.5 mWup & 7245 mW dw). The array draws current of 650 mA from the source. (350 mW up & 300 mWdw). Where up and dw (down) represent the LED circuits for the upper and lower half of the PCB respectively.

Table 2.3 Grow light power consumption if the PWM is set to 100%

	UP	DW	UP	DW	UP	DW	UP	DW	UP	DW	UP	DW	UP	DW
Resistors power (mW)	516.6	442.8	577.5	495	1750	1500	243.75	337.5	317.5	500	207.5	410	773	
Total Pw Resist	959.4		1072.5		3250		581.25		817.5		617.5		773	
Diode	4536	3888	7875	6750	6930	5940	962.5	875	2090	1900	2200	2000	645	
Total Pw Diode	8424		14625		12870		1837.5		3990		4200		645	
Totals (D-R)	5052.6	4330.8	8452.5	7245	8680	7440	1206.25	1212.5	2407.5	2400	2407.5	2410	1418	
Grand Total	9383.4		15697.5		16120		2418.75		4807.5		4817.5		1418	
Current (mA)	210	180	350	300	350	300	50	50	100	100	100	100	35	
Grand Total (mA)	390		650		650		100		200				55	
Power Totals	UP 28206.35 mW = 28.2 Watt						Down 25038.3 mW = 25 Watt						1418	
Power Grand Total	54662.65 mW = 54.7 Watt													
Current Totals	1160 mA = 1.16 A						1030 mA = 1.03 A						35 mA	
Current Grand Total	2245 mA = 2.245 A													

### 2.4.3 Fluorescent Excitation Lights

Excitation LEDs are powered using the NI-1744 smart camera current source output. LEDs are current-driven devices whose illumination is proportional to their current. Their current can be controlled in two ways. The first method, which was used to control the grow light board, is to use the V-I curve of each LED to determine the most appropriate ballast resistor to ensure the desired current through a series of LEDs (in this case input voltage was 24 VDC). This technique has a major drawback in that any variation in LED voltage causes a change in LED current and consequently a variation in the output intensity. Although less critical for the grow lights, the requirement for consistent excitation intensity is essential since the imager is designed to capture fluorescence, and variation in excitation energy will result in a corresponding variation in fluorescence intensity. The preferred method of regulating LED current is to drive LEDs with a constant-current source. The current source is constant and eliminates changes in current due to variations in voltage, which translates into constant LED brightness. However in the case of the excitation LEDs, this generates a potential problem as M-PHIS uses a combination of LEDs connected in series and parallel with the same current applied regardless of the number of LEDs (LED chain length). If one of the LED chains opens up (e.g. due to a LED failure) the LEDs in the remaining chains will

see an increase in current flowing through them, changing their output and potentially resulting in the LEDs being driven out of specification and failing. The excitation lights shown in Figure 2.7 are two sets of four parallel rows of six LEDs in series. Both sets are Roithner LEDs (B56L5111P and LED450-01) with forward current ratings of 50 mA. The camera constant current source is set to its maximum of 400 mA (8 rows x 50 mA) and dissipates a total of 9.36 W during an excitation sequence. Figure 2.9C shows the powered excitation light and installed short pass (490 nm) filter that ensures no overlap of the incident excitation light occurs with the emitted fluorescence, which would subsequently negatively influence the desired measurement signal.

#### 2.4.4 M-PHIS Software

Communication between the NI camera and NI controller was via Ethernet and IP protocols through shared variables. The main controller was coded with LabVIEW and the camera was programmed with Vision Builder for Automated Inspection (VBAI). The variables were initialized at the start of the main controller, and then commands, status and other information is sent back and forth via the network shared variables. Figure 2.12 presents the M-PHIS software control panel: grow light intensity was controlled by setting the PWM value (0 to 100%); the lighting schedule could be set to start and end twice any time during the day or stay on for 24h. The time and frequency of the image capture sequence could also be set. The white lights and LCTF frequency could be set either manually or via shared variables. Figure 2.13 shows the VBAI Inspection State Diagram. When the Capture Sequence variable is set to *Full*, as in Figure 2.12, the VBAI State Diagram will follow the default (Figure 2.13) and the camera will capture five types of images:

- 4) GFP: Automatically via shared variable, the grow lights are turned off, excitation lights are turned ON and the LCTF is set to 510 nm with a FWHM at 10 nm. This image predominantly captures only GFP fluorescence.
- 5) RED: Same as the GFP except the LCTF is set to 630 nm with a FWHM at 20 nm. This image predominantly captures only red chlorophyll fluorescence.

- 6) NIR: Same as the two above except the LCTF is set to 730 nm with a FWHM at 20 nm. This image predominantly captures only near infrared chlorophyll fluorescence.
- 7) Black: All lights are off. This image is subtracted from the GFP image to remove certain CCD imperfections (e.g. bad pixels).
- 8) White: The white lights are on. This image produces a regular ‘white light’ image.

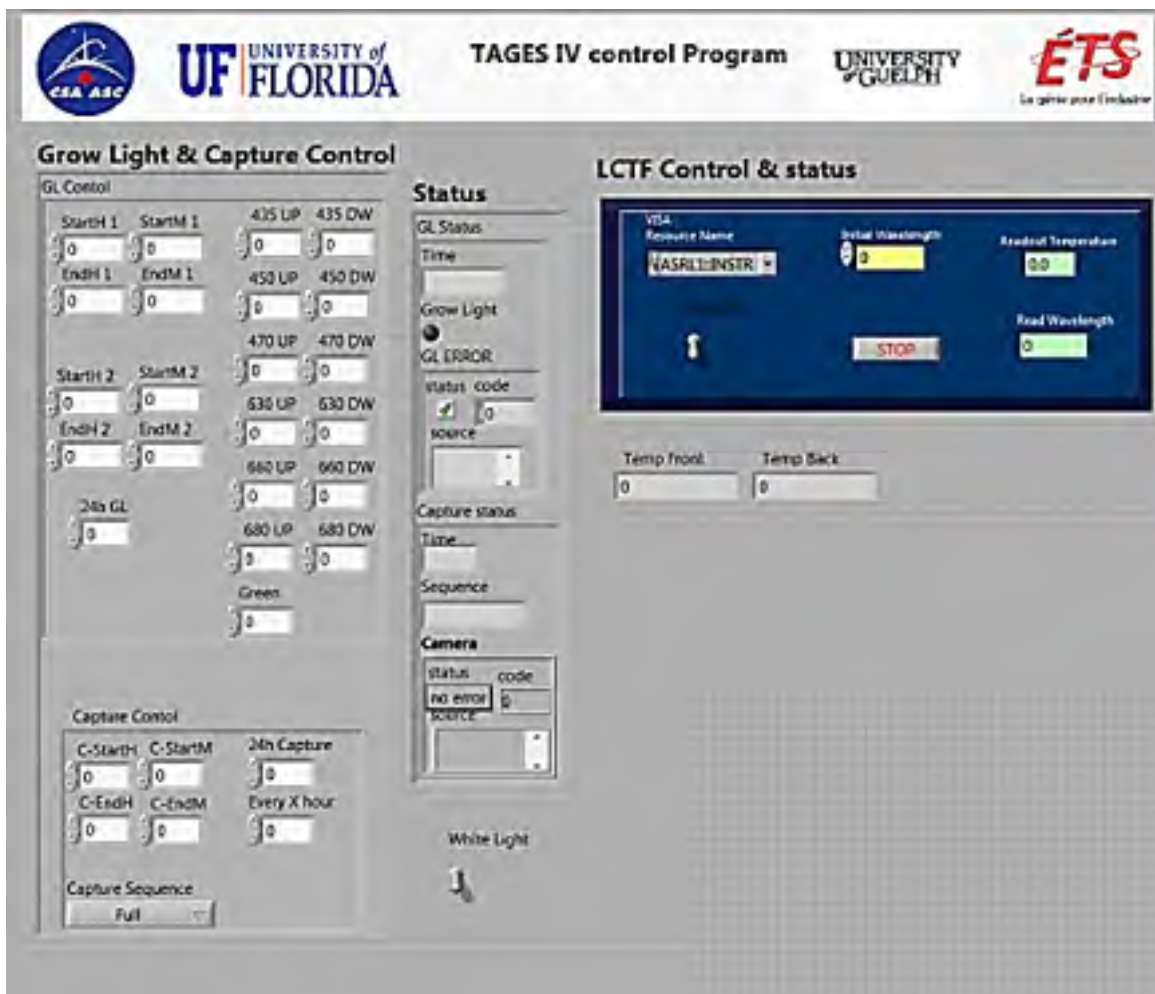


Figure 2.12 LabVIEW Multispectral Plant Health Imaging System control panel



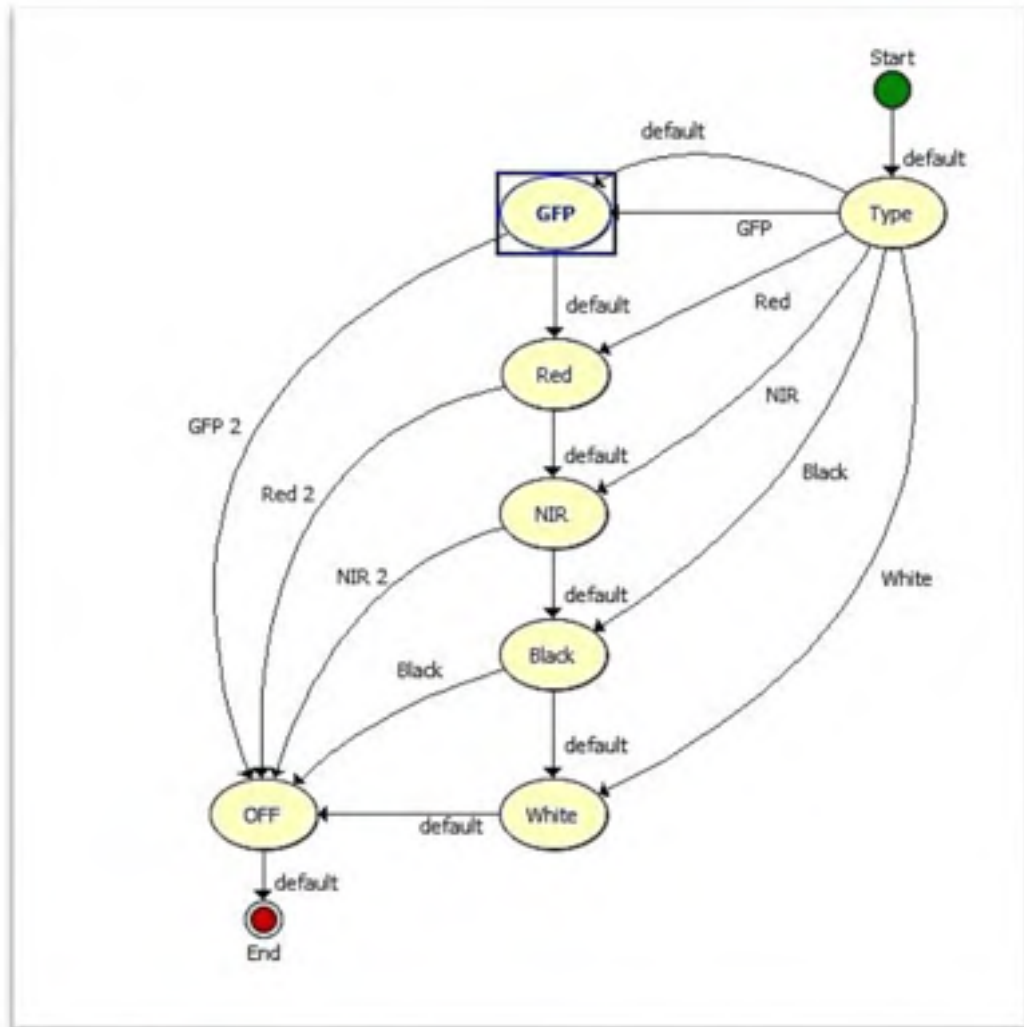


Figure 2.13 VBAI Inspection State Diagram  
(Multispectral Plant Health Imaging System capture sequence logic)

All images files are saved in two formats. The Tagged Image File Format (TIFF) (Wikipedia, 2005) is a flexible format that normally saves 8 bits or 16 bits of pixel depth per color (8 bits equal 256 level of gray in our case) and uses a lossless compression. For the implemented camera, the file size was 1.25 MB per image when the resolution was set to 1280 x 1024. The second format was JPEG (Joint Photographic Experts Group) (Wikipedia, 2007), a "lossy" compression method that compresses data by discarding (losing) some of it. The process aims to minimize the amount of data that needs to be transferred telemetrically, an important

consideration for remote deployments of this imager and the primary reason why the M-PHIS is configured to also save in the JPEG format. The camera stored the data on the cFP-2120 controller's 4 GB compact flash card with filenames of the following format; ddmmyy-HHMMSS-type-Image-temp-Fxx-Bxx.tif (or jpg) where Fxx and Bxx are the temperatures of the front and back of the Petri plate at the time of the image capture. Temperature data is also saved to a separate text file at a one minute frequency. When the imager is physically accessible or communication bandwidth permits, TIFF images are downloaded from the imager and serve as the main dataset for scientific studies and in-depth image analysis.

#### **2.4.5 Multispectral Plant Health Imaging System to Low-Pressure Chamber Interface**

The 24 VDC imager power was provided through an AC to DC adapter and the 120 VAC supply in the chamber interior. An Ethernet cable was also run into the chamber through a specially fabricated connector to permit real-time monitoring of the imager. The Ethernet cable connected the external laptop to the interior-chamber imager Ethernet hub.

### **2.5 Results and Discussion**

Like its predecessors (Abboud et al., 2013a; Paul et al., 2008), M-PHIS underwent a series of basic laboratory tests before its deployment in a space analog environment. The output spectra of the excitation lights and grow lights were verified using a USB4000 Ocean Optics spectrometer. Current draw by the LEDs was measured using a Fluke 179 True RMS Multimeter. A Tektronix TDS3054B oscilloscope was used to authenticate the PWM grow lights voltage frequency, ratios and voltage output. After calibrating the lens to focus on the biological sample and adjusting the exposure time and gain of the camera to capture the maximum amount of fluorescence, tests were conducted to verify that only the emitted light from the sample was captured. In particular, several sequences were run without a Petri dish installed or with an empty Petri dish. The collected images were then examined and the

GFP, Red and Infrared captures were dark, confirming that no excitation light entered into the imaging side of the system.

### **2.5.1 Short Duration Low Pressure Run**

The imager was installed in a hypobaric chamber at CESRF to evaluate the ability of the imager to capture images of induced GFP, natural red and near-infrared fluorescence and simulate plant health studies in a hypobaric environment. The testing was also designed to shed light on the operational constraints that a fully automated plant health imaging system may face on-orbit or other spaceflight scenarios.

Although the imager hardware and software went through several weeks of operational testing prior to deployment at CESRF, it was still unknown if the imager would operate at the low atmospheric pressures planned for the experiment. Such extreme operational conditions are far from standard, and as such no data was available regarding low pressure operation of each individual imager component. To address this question of operability under low pressure, a preliminary test was performed without biological samples in the imager. On February 16 2012, the imager was installed in the hypobaric chamber and set to capture a Full sequence (GFP, Red, InfraRed, Black and White) every 20 minutes under low pressure conditions. A calibration plate designed and fabricated by the University of Florida was installed in the imager for the tests Figure 2.14. The plate was engineered to fluoresce similar to GFP and chlorophyll. The chamber pressure was initially decreased from ambient to 25 kPa over a 30 minute period and a full imaging sequence subsequently captured and verified in real-time. After confirmation of imager functionality at 25 kPa, the chamber pressure was further decreased to 5 kPa over 10 minutes, where it was maintained for 30 minutes and a full sequence of images captured. The images obtained at low pressure (25 kPa and 5 kPa) were directly compared to those collected at ambient pressure and confirmed that the low pressures did not affect or alter the camera or LCTF optics in any significant way as shown

in Figure 2.14. These tests also confirmed that the imager was capable of operating at low atmospheric pressures.

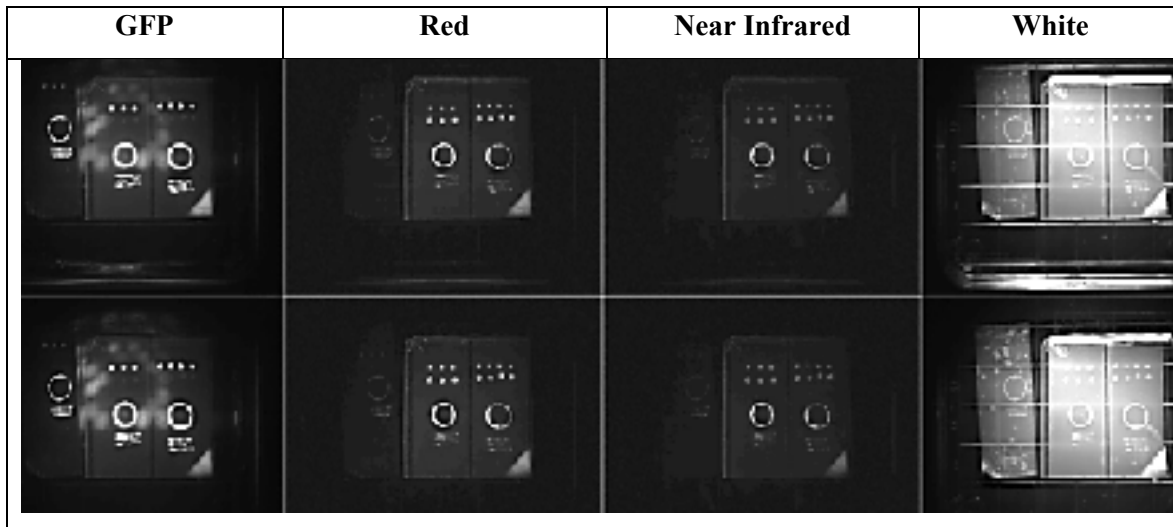


Figure 2.14 Capture sequences of the calibration plate at ambient pressure (top row) and at 5 kPa (bottom row). These images confirm that reduced atmospheric pressure did not influence overall image quality, LCTF or other imager optics

### 2.5.2 Long Duration Low Pressure Run

Following the general confirmation of M-PHIS functionality in low-pressure environments, a long duration low pressure run utilizing actual biological samples was conducted. After the chamber was closed for the first 5 kPa run, M-PHIS was set to capture a sequence of images (GFP, Red, Infrared, Black, and White) at the start and every four hours thereafter for a period of forty-eight hours. This meant that the first capture sequence was taken when the chamber pressure was still at ambient. The chamber reached 5 kPa 84-min following initiation of pressure draw-down. The second series of images, taken four hours from the start, was taken with the plants growing at 5 kPa. Figure 2.14 shows a comparison between the first two sequences. Two small rectangular markers are positioned on the top left of the sample tray and act as the LCTF calibration indicator. These reference indicators should nominally remain at the same intensity for each specific image capture type. For example,

Figure 2.15 demonstrates that the intensity of the indicators were essentially the same for the image capture at atmospheric pressure and at 5 kPa.

During the long duration experiment, the internal temperature of M-PHIS rose beyond the tolerance limits of the biological samples contain within. After further investigation, several potential causes where discovered:

- 1) although the hypobaric chamber was temperature controlled, its lighting system composed of high-pressure sodium bulbs radiates heat on to the imager's metal casing (Figure 2.1). During the initial operability trial, the chamber lights were off (no biological samples in the chamber). During the plant imaging experiments however, the chamber lights were on to support control samples outside of M-PHIS.
- 2) the imager cooling fans were insufficient in the hypobaric environment, as there was not enough air to carry away all the heat being generated. The preliminary operability tests were too short to allow the team to observe this heat management problem, which was further enhanced with the chamber lights were turned on.
- 3) since the imager system was sealed to prevent light contamination, waste heat and energy from the grow lights accumulated overtime.

To overcome or minimize the heat issue, the system was covered with a heat-reflecting blanket, the grow lights were kept off and the test durations were reduced. In the future it is likely that the fan located behind the sample tray will be replaced by a Peltier cooling system. The thermoelectric cooler could be controlled directly from the Compact FieldPoint PWM module. In addition, as the CESRF hypobaric chambers are equipped with crop irrigation lines, liquid-cooling loops could also be incorporated either individually or in combination with the thermoelectric cooler to further increase cooling capacity.

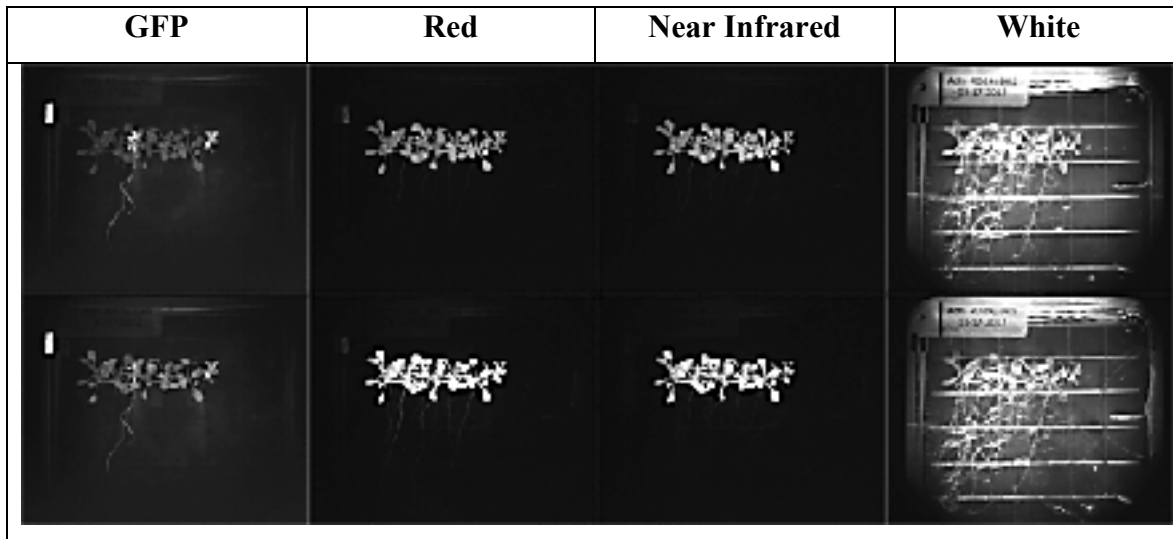


Figure 2.15 Images sets from the first 5 kPa hypobaric experiment. The sequence on the top is images captured at the beginning of the experiment where the pressure was still at ambient (~100 kPa). The series on the bottom were taken at 5 kPa four hours later

## 2.6 Conclusions

A plant health imaging system capable of capturing biological gene activities and translating these signals into plant stress measurements would be an indispensable diagnostic device in bioregenerative life support systems. In this study, we discuss the research and development of an autonomous multispectral imaging system designed to evaluate plant health *in situ*, in regular greenhouses or in plant production facilities located in hostile or space analog environments. With its LCTF the imager could be set to capture a series of images including, but not limited to GFP and natural chlorophyll fluorescence. In addition, its custom designed LED circuit board composed of independently controllable LEDs with seven distinct central wavelengths as well as independent control of the upper / lower half of the board meant the lighting system could be employed in a wide array of scenarios and studies. Numerous laboratory-based systems are available for capturing fluorescence but many are restricted to one or a predetermined set of filters. These systems also tend to involve considerable labour and do not include grow lights. Studies (Baker et Rosenqvist, 2004; Ehlert et Hinch, 2008; Galston, 1992; Lichtenthaler et Babani, 2000; Manak et al., 2002) indicate that valuable

information could be gathered with a system capable of measuring a wide range of fluorescent proteins as well as natural chlorophyll fluorescence. Additionally, a system incorporating controllable photosynthetic lighting and thus able to maintain the plant samples for long duration experimental studies would provide even greater insights. Furthermore, plant research in space or in remote regions will likely be autonomous, include several biological sensors and will consist of robotic operations where telemetric data collection is a necessity because of restrictions in crew time and/or safety. The Multispectral Plant Health Imaging System was deployed in a hypobaric chamber and successfully captured images at several wavelengths, including those for GFP and red/near-IR for chlorophyll. In addition, M-PHIS was the first fluorescent imager to run autonomously in a low-pressure plant growth chamber. Its deployment and operations have demonstrated the feasibility of plant diagnostic systems that will allow for monitoring and control of space biology experiments and bioregenerative life support systems. Multispectral plant imaging systems are powerful tools for plant health monitoring and represent a significant step towards securing the technical capacity for sending plant health information in a telemetric fashion from an extra-terrestrial location. Results from this work, combined with past and future experiments will be used to evaluate remote sensing plant response to low pressure environments.

## **2.7 Acknowledgements**

The Canadian Space Agency funded the research and materiel to develop and build the imager. We thank Mr. Jamie Lawson from the University of Guelph's Controlled Environment Systems Research Facility. We also thank Pierre Lortie, Ralph Nolting and Maxime Pepin-Thivierge of the Canadian Space Agency machine shop for contributing to the mechanical design and for aiding in prototype construction. The authors recognize and thank Éric Gloutnay EMC & Electronic Component Engineer at Canadian Space Agency for his support in LED PCB layout and fabrication. We also thank Nathalie Cassidy from the Canadian Space Agency for her important logistical contributions to this work.





## CHAPITRE 3

### SEGMENTATION D'IMAGES DE PLANTES CAPTURÉES PAR UN SYSTÈME D'IMAGERIE FLUORESCENTE

Talal Abboud<sup>1,2</sup>, Rachid Hedjam<sup>2</sup>, Rita Noumeir<sup>2</sup>, Alain Berinstain<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Agence Spatiale Canadienne, 6767 route de l'aéroport, St-Hubert, Qc, Canada J3Y 8Y9

<sup>2</sup>École de technologie supérieure, 1100 rue Notre-Dame O, Montréal, Qc, Canada H3C 1K3

Article arbitré accepté et présenté à la « conférence IEEE Montréal Canada » en Avril 2012.

#### 3.1 Résumé

Dans ce papier, un algorithme de segmentation de plante est proposé. L'image à traiter est en fait produite en deux bandes, visible et fluorescente, générée par un système d'imagerie que nous avons conçu à l'Agence Spatiale Canadienne (ASC). Le but de ce travail est de segmenter les différentes parties de la plante. Pour ce faire, un vecteur de caractéristiques est extrait pour chaque classe (feuille, tige, racine et fond) à l'aide d'une paire d'images qui contiennent les niveaux de gris en image régulière et fluorescente, ce qui donne un vecteur à deux dimensions. Trois différents algorithmes, Bayes-Quadratique, K Plus Proches Voisins et Machines à Vecteurs de Support ont été implantés, testés et comparés pour classifier tous les pixels de l'image. Les résultats obtenus démontrent qu'avec la méthode de caractérisation conçue et l'utilisation d'algorithmes de classification, l'objectif de segmentation de la plante a été accompli avec un taux d'erreur aussi faible que 8.75% et un temps de classification de seulement 35 sec.

**Mots-clés :** segmentation, classification, reconnaissance de forme, soutien de vie dans l'espace, exploration Lune/Mars.

### 3.2 Introduction

Comme les humains continuent à explorer au-delà des confins de notre propre planète, nous sommes confrontés à une variété de défis afin de faciliter ces explorations. Parmi ces défis est le génie de l'environnement qui englobe le soutien des humains dans des habitats extraterrestres (Bamsey et al., 2009b). Les plantes sont au centre de tout système de soutien de la vie qui contient des composantes biologiques. L'ASC étudie la possibilité de soutenir la présence humaine sur la Lune ou Mars en implémentant des serres (Bamsey et al., 2009a). Le bénéfice de ces serres réside dans leur capacité à fournir dans une boucle fermée, un système de régénération des trois piliers de soutien de la vie, ceux-ci étant la provision de : 1-la biomasse comestible; 2- la gestion de l'atmosphère, principalement CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>; 3- la production d'eau potable (Bamsey et al., 2009b). D'où l'importance de la compréhension des enjeux métaboliques qui peuvent influencer la croissance des plantes et leur développement dans l'espace. Le "Transgenic Arabidopsis Gene Expression System" (TAGES) est un type de détecteur de l'état des plantes (Manak et al., 2002). TAGES utilise des *Arabidopsis thaliana*, avec des gènes rapporteurs génétiquement modifiés, ce qui permet d'utiliser les plantes comme bio-moniteurs. Alors il s'agit d'un organisme utilisé pour déterminer la qualité de l'environnement. Après une mission du système d'imagerie TAGES (Paul et al., 2003), il y a des centaines d'images à analyser. Une paire d'image est capturée toutes les 6 heures pendant 15 à 30 jours, une visible (Figure 3.1) et une fluorescente "Green Fluorescent Protein" (GFP) (Figure 3.2), les images ont une résolution de 96 dpi et 8 bits de profondeur. C'est une tâche qui consomme beaucoup de temps et d'énergie des astronautes ou scientifiques. Également, un des plus grands défis est d'envoyer les images sur terre pour les analyser. La stabilité ou la vitesse du lien de communication entre la station ou la fusée spatiale n'est pas fiable pour envoyer des gros fichiers d'images, et ce, même lorsque les images sont compressées. La compression n'est pas une option valable puisqu'il peut y avoir une grande perte d'information. Le but est de simplifier l'analyse des images capturées par le système en discriminant les différentes parties de la plante (feuilles, tiges et racines). Avec cette information l'analyse des conditions où les différentes parties de la plante sont les plus stressées (malades) est simplifiée. Le programme peut analyser et envoyer les données, en

chiffres et non par images, sur terre ce qui devrait permettre de résoudre le problème de communication et le temps d'analyse.

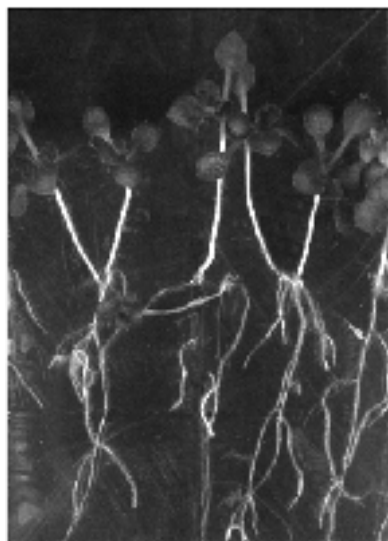


Figure 3.1 Arabidopsis, visible

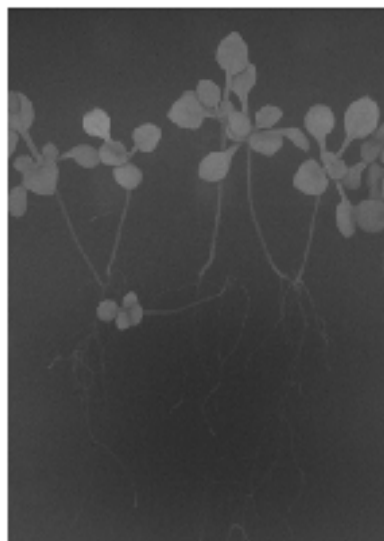


Figure 3.2 Arabidopsis, GFP

### 3.3 Méthodologie

Les niveaux de gris entre les différentes parties de la plante jouent un rôle pour la segmentation. Il y a une différence entre les niveaux de gris de chaque segment de la plante, mais certains pixels entre parties s'empiètent et ils ont les mêmes intensités. Par exemple, dans l'image GFP, il y a une différence entre le niveau de gris des feuilles et des tiges mais pas partout, puisqu'il y a des parties des tiges qui ont le même niveau de gris que certaines parties de feuille. Alors la séparation entre les parties à l'aide de seuil (threshold) n'est pas efficace. Comme le démontrent bien les Figure 3.3 et Figure 3.4, la segmentation est possible mais avec plusieurs pixels en erreur entre les tiges et feuilles. Il y a d'autres outils qui peuvent aider morphologiquement comme par exemple ouvrir et fermer une image peut séparer complètement les feuilles, mais le résultat est imprécis et n'aide pas pour les tiges ou les racines.



Figure 3.3 Segmentation des feuilles GFP avec seuil



Figure 3.4 Segmentation des tiges GFP avec seuil

Avec la différence d'intensité entre les parties de la plante et entre le type d'image, on se trouve avec deux dimensions d'intensité pour chaque partie de la plante. Alors en prenant des échantillons de pixel de chaque classe (feuilles, tiges, racines et fond) et de chaque type d'images (visible et GFP) un vecteur qui contient la valeur du pixel visible et la valeur du même pixel en GFP est produit.

La Figure 3.5 démontre bien la possibilité de séparation entre les classes. Même si la séparation entre la classe racine et fond est difficile dans l'image GFP, elle est facile dans l'image visible. Alors la Figure 3.5, nous permet de conclure que les vecteurs de caractéristiques vont permettre aux classifieurs de bien séparer les différentes parties de la plante.

Trois différents algorithmes de classification ont été implantés, testés et comparés. Le Bayes-quadratique (Bayes- Q) (Cheriet et al., 2007), K plus proches voisins (K-PPV) (Cheriet et al., 2007) la Machines à vecteurs de support (MVS) (Cheriet et al., 2007), (Adankon, 2005).

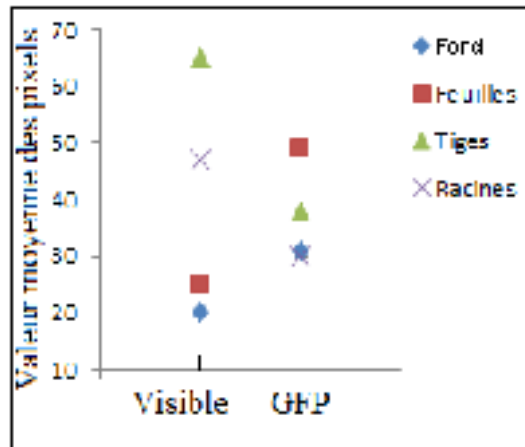


Figure 3.5 Les valeurs moyennes d'intensité des différents parties de la plante sont montrées pour les deux types d'image; image dans le spectre visible et image GFP

### 3.4 Validation

Un échantillon de soixante pixels pour chaque classe a été enregistré, où chaque pixel est représenté par un vecteur de caractérisation qui contient la valeur du pixel visible et la valeur du pixel GFP.

Vecteur de caractérisation = [pixel visible, pixel GFP]

Les algorithmes de classification, sont des algorithmes permettant d'attribuer une étiquette à un ensemble de données en utilisant une base d'apprentissage (échantillons) dont on connaît les étiquettes (les classes).

### 3.5 Bayes quadratique

Cet algorithme est extrêmement rapide. En effet, il appartient à la famille des classifieurs linéaires à modèle génératif. Ces classifieurs modélisent la probabilité conditionnelle d'appartenance d'un élément à une classe  $P(\vec{x}|classe)$ . Il suffit d'effectuer un calcul rapide

pour obtenir cette probabilité et ainsi classifier l'élément observé. Il n'y a donc aucune phase d'apprentissage, car il n'y a aucun paramètre à trouver. Le Bayes-Q est justifié par l'hypothèse que les données de chaque classe sont distribuées en suivant une distribution normale multi-variables:

$$p(x|\omega_j) = \frac{1}{(2\pi)^{d/2} |\Sigma_j|} \exp\left(-\frac{1}{2}(x-\mu_j)^T \Sigma_j^{-1} (x-\mu_j)\right) \quad (3.1)$$

Où  $x$  est le pixel à classer,  $\Sigma_j$  et  $\mu_j$  sont la matrice de covariance et le vecteur moyen des données de la classe  $\omega_j$  et  $d$  la dimension des vecteurs de caractéristiques.

La moyenne et la matrice de covariance, pour chacune des classes, sont estimées à partir des échantillons. Ces paramètres sont utilisés pour classifier les pixels de l'image à l'aide de Bayes afin d'estimer la probabilité a posteriori :

$$p(\omega_j|x) = \frac{p(x|\omega_j)p(\omega_j)}{p(x)} \quad (3.2)$$

Les fonctions discriminantes programmées associées à chacune des classes sont obtenues en prenant le logarithme naturel de l'équation (3.2) et en supprimant les constantes:

$$d_j(x) = -\frac{1}{2} \ln(|\hat{\Sigma}_j|) - \frac{1}{2} (x - \hat{\mu}_j)^T \hat{\Sigma}_j^{-1} (x - \hat{\mu}_j) \quad (3.3)$$

Le pixel est classé en trouvant la valeur maximale parmi les fonctions discriminantes associées à chacune des classes. La Figure 3.6 illustre que le Bayes-Q a bien séparé les différentes parties de la plante, mais qu'il y a des erreurs aux contours des tiges et des racines. L'utilisation d'un filtre médian ou gaussien avant le traitement diminue le taux d'erreur.

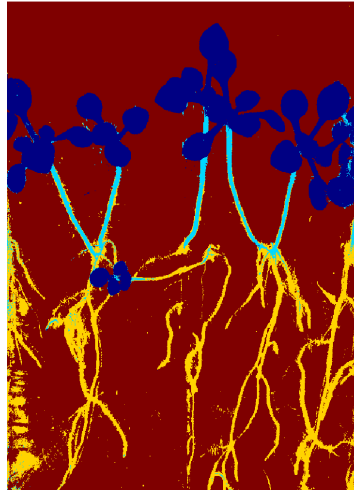


Figure 3.6 Segmentation, Bayes Quadratique

### 3.6 Algorithme du KPPV

« K plus proches voisins », est un algorithme qui se nomme en anglais "K Nearest Neighbour". L'ensemble des données d'apprentissage forme un modèle des différentes classes. Pour classer les pixels de l'image, il suffit de calculer la distance entre cette donnée et l'ensemble des données d'apprentissage, puis d'effectuer un vote majoritaire parmi les k données les plus proches, chacune des données votant pour la classe à laquelle elle appartient. Alors pour fixer le nombre k de voisins à considérer pour prendre la décision, les bases de test initial (échantillons) sont divisées en 2/3 comme base de test, puis 1/3 pour la validation. Le k avec le moins d'erreur est choisi pour classer tous les pixels de l'image. La Table 3.1 présente le taux d'erreur cumulé lors de la phase d'apprentissage du paramètre k. On remarque que pour k =1, 3, 5 et 11 le taux d'erreur est le plus bas à 8,75%. Ces k minimum ont été testés et comparés. Une inspection visuelle montre que l'image avec le moins d'erreur, surtout aux contours des racines, est le k = 5.

Table 3.1 Valeur des k testés et résultats

k	Nb erreurs	Taux d'erreurs
1	7	8.75%
3	7	8.75%
5	7	8.75%
7	8	10%
9	8	10%
11	7	8.75%
13	8	10%
15	9	11.25%

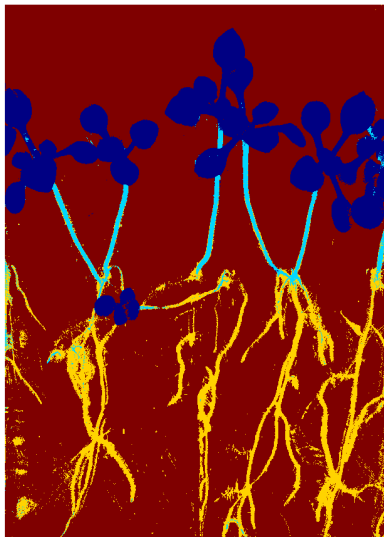


Figure 3.7 KNN avec k = 5

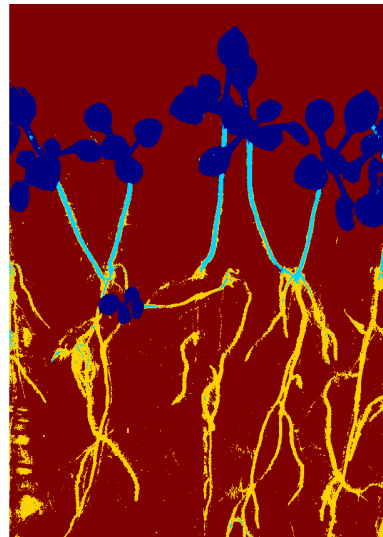


Figure 3.8 KNN avec k = 11

### 3.7 Machines à vecteurs de support

La MVS, "Support Vector Machine" en anglais, classe de façon binaire les données d'apprentissage en deux classes en déterminant la frontière optimale qui les sépare. La sortie du classifieur MVS est définie par l'équation (3.4) :



$$f(x) = \sum_{i=1}^n y_i \alpha_i K(x_i, x) + b \quad (3.4)$$

Où les  $y_i \in \{1, -1\}$  représente les classes des échantillons d'apprentissage  $x_i$  et  $K$  le noyau de Mercer qui permet de transformer les données dans un espace à une dimension plus élevée dans lequel la séparation des classes est possible. Le but de la phase d'apprentissage est de trouver les coefficients  $\alpha_i$  et  $b$  qui maximisent la marge de séparation.  $x$  symbolise l'échantillon à classer et  $n$  le nombre d'échantillons total. Nous utilisons un noyau gaussien exprimé par (3.5) (Adankon, 2005):

$$K(x_i, x) = \exp(-\gamma \|x_i - x\|^2) \quad (3.5)$$

Puisque nous avons plusieurs classes, et que le SVM est binaire, la méthode la plus simple est d'utiliser autant de SVM qu'il y a de classes. Chaque SVM est programmé à distinguer les échantillons d'une classe des échantillons de toutes les autres classes. Ce qui est appelé la stratégie "un contre tous" (Adankon, 2005). L'élément est classé selon la valeur maximale des sorties des différents SVM.

$$\max_{\alpha} \left[ \sum_{i=1}^n \alpha_i - \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^n \alpha_i \alpha_j y_i y_j K(x_i, x_j) \right] \text{ avec } \sum_{i=1}^n \alpha_i y_i = 0 \text{ et } 0 \leq \alpha_i \leq C \quad (3.6)$$

Où les paramètres  $i$  et  $j$  représente les valeurs des échantillons d'apprentissage et tests respectivement. La Table 3.2 présente les différents taux d'erreurs obtenus en faisant varier les deux paramètres d'apprentissage du SVM.

Table 3.2 Taux d'erreur en variant  $\gamma$  et C

		%Taux d'erreur				
$\gamma \backslash C$	1	10	100	1000	10000	
1	18.75	21.25	21.25	21.25	21.25	
0.1	11.25	10.00	8.75	8.75	8.75	
0.01	15.00	21.25	35.00	46.25	75.00	
0.001	63.75	62.50	67.50	75.00	75.00	

Figure 3.9 et Figure 3.10, ne démontrent pas une différence visible. Ce qui confirme les taux d'erreurs trouvés à l'apprentissage.

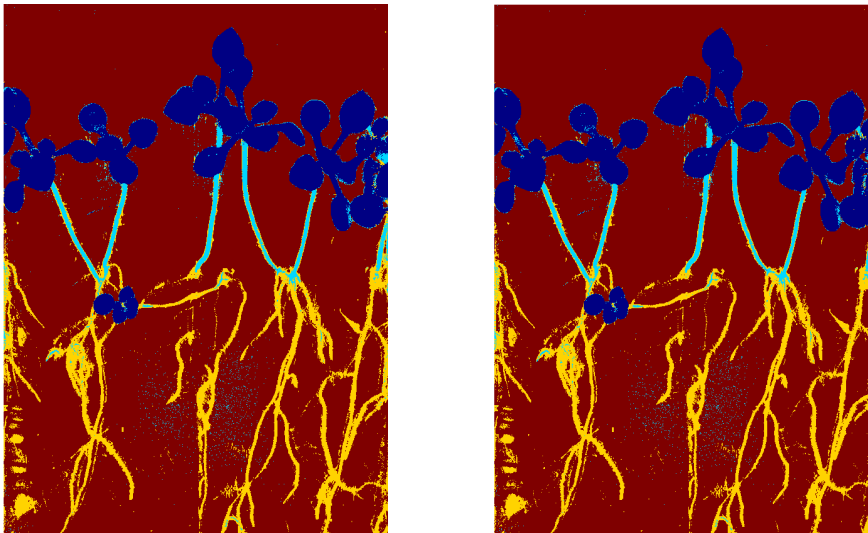


Figure 3.9 SVM C= 100,  $\gamma$ = 0.01    Figure 3.10 10:SVM C= 10k,  $\gamma$ = 0.01

### 3.8 Comparaison des trois classifieurs

La comparaison des classifieurs se base sur quatre critères : 1) la qualité de l'image reconstruite; 2) le taux d'erreur, s'il y a lieu; 3) le temps total; et 4) la complexité de l'algorithme (en terme de nombre de boucles) qui affecte la consommation d'énergie du processeur. Une inspection visuelle des Figure 3.6, Figure 3.7 et Figure 3.9 ou Figure 3.10 montre que le meilleur classifieur, avec une image qui contient le moins de pixels mal classés, est le KNN avec  $K = 5$ . Le Bayes-Q est également performant avec un peu plus de pixels mal classifiés. Par contre, l'effort et le temps mis par l'algorithme du KNN est 17 fois plus long qu'au Bayes-Q ( $(581s)/35s=16.6$ ). En consultant la Table 3.3, l'algorithme le moins performant est le MVS. Il est non seulement gourmand en temps et en énergie, mais il a également un taux d'erreur le plus élevé; de plus, on trouve beaucoup de pixels mal classifiés autour des contours des racines et même dans les feuilles. Ces tests démontrent que le BAYES-Q a le meilleur rapport performances/erreurs: il a visiblement, un peu plus d'erreurs que KNN, l'algorithme offrant le meilleur taux; il est moins gourmand en temps et en énergie que KNN. Au lieu de 581 secondes et 405721120 instructions, le BAYES-Q compte seulement 35 secondes et 2144348 instructions. Le rapport performances/erreurs du MVS est loin derrière, puisqu'il compte 2385 secondes et 116467596 instructions.

Table 3.3 Comparaison des classifieurs

	# de boucle	T Sec	Taux d'erreur
<b>B-Q</b>	2144348	35	Inspection visible
<b>KPPV-app</b>	112000	<1	8.75%
<b>KPPV</b>	405609120	580	Inspection visible
<b>MVS-app</b>	96404	5	8.75%
<b>MVS</b>	116371192	2380	Inspection visible

### **3.9 Conclusion**

Les résultats obtenus démontrent qu'avec la méthode de caractérisation conçue et l'utilisation d'algorithmes de classification, l'objectif de segmentation de la plante a été accompli avec succès et avec un très faible taux d'erreur. Les erreurs se trouvent surtout dans la classe racine. Ceci est dû au fait que le signal GFP de la racine est faible et très près du niveau de gris de la classe fond. Le rapport signal sur bruit est alors élevé, ce qui engendre plus d'erreurs que les autres classes qui ont un signal plus fort. Une solution à explorer pour réduire le taux d'erreurs, serait de filtrer l'image au début du processus, avant la caractérisation, et d'augmenter le nombre d'échantillons.

### **3.10 Remerciements**

Ce travail a été réalisé à l'aide de subvention de l'ASC. Nous remercions également Dr. Robert Ferl et Dr. Anna-Lisa Paul de l'université de Floride nous avoir fourni les plants, le Dr. Mohamed Cheriet de l'ÉTS pour les discussions sur les classifieurs et la caractérisation, ainsi que Renan Waroux de l'ÉTS pour son aide technique sur MatLab.

## CONCLUSION

Pendant que la planification de l'exploration humaine de la Lune et de Mars continue, les astronautes font face à une variété de défis pour rendre ces explorations possibles et sont souvent limités par ce qu'ils peuvent emporter pour leur survie. Par conséquent, l'utilisation des plantes dans le cadre de systèmes de soutien de vie continue d'être la pierre angulaire pour rendre les voyages spatiaux de longue durée possibles et de la présence humaine dans l'espace envisageable. Le concept principal se base sur l'utilisation de plantes pour régénérer les trois piliers indispensables à la vie humaine qui sont de l'air, de l'eau et la nourriture. Mais les vols spatiaux et autres environnements extraterrestres occasionnent des défis uniques et inédits pour la vie végétale. Les plantes sont soumises à des conditions hostiles pour leur croissance. Ces conditions hostiles peuvent affecter le développement des plantes, leur survie et la productivité de la culture. D'où l'importance de comprendre les problèmes métaboliques qui peuvent influencer sur la croissance des plantes et leur développement dans l'espace. Des systèmes de surveillance de la santé des plantes, qui ont la capacité d'observer l'état de la récolte en temps réel au sein de ces systèmes, permettraient aux opérateurs de prendre des mesures immédiates pour assurer un rendement optimal et fiable. Un dispositif d'imagerie qui capture in situ les signaux biologiques fluorescents et traduit ces signaux en des mesures de stress de la plante est un outil précieux et essentiel de diagnostic pour les mécanismes de recyclage des systèmes de support à la vie humaine.

De nombreux systèmes commerciaux, impliquant des analyses en laboratoire pour examiner des échantillons dans des boîtes à pétri, sont disponibles pour l'imagerie de fluorescence. Toutefois, s'ils doivent être utilisés comme outil efficace pour la surveillance des systèmes spatiaux de la production végétale, l'imagerie de fluorescence doit être basée sur des techniques d'imagerie autonomes. Puisque la recherche sur les plantes dans l'espace ou dans des régions éloignées sera probablement autonome et comprendra plusieurs capteurs biologiques. Le système de surveillance fonctionnera par des opérations robotiques où la collecte de données télémétriques est une nécessité en raison des restrictions dans le temps et

pour la sécurité d'équipage. Ceci est dû au fait que les systèmes de production végétale peuvent être utilisés dans un environnement à une pression atmosphérique réduite.

Dans le premier article nous avons démontré l'importance et la faisabilité d'avoir un système de diagnostic par télémétrie pour les plantes qui constitue la base des systèmes de support à la vie dans l'espace. En effet, le développement d'un système d'imagerie qui examine la santé des plantes en capturant les PVF introduites est une étape importante permettant d'étendre la capacité technique d'envoi de diagnostics de façon télémétrique d'un emplacement extra-terrestre. Nous avons développé TIS-III avec de nouvelles fonctionnalités, en y ajoutant des circuits imprimés conçus sur mesure avec des DEL pour la photosynthèse des plantes et pour l'excitation des PVF intégrées, des filtres, un système d'acquisition de données et un système de contrôle. Nous avons conçu le système très économe en énergie et alimenté avec une source d'énergie renouvelable disponible dans la serre du nord, ce qui est une fonctionnalité indispensable. De plus, le logiciel du TIS-III a été codé et intégré au système d'exploitation ACMG, ce qui a rendu TIS-III entièrement compatible avec les systèmes d'ACMG. Cette compatibilité a contribué à la réussite de la mise en place du système d'imagerie dans le cadre de la série de capteurs qui se trouvent dans l'ACMG. Ce qui a également soutenu le succès du déploiement ont été les tests et les opérations simulées du système dans la serre réplique de l'ACMG qui se situe à l'ASC. TIS-III a été le premier imageur qui a fonctionné de façon autonome dans la serre en absence d'humain. Son déploiement dans l'ACMG et son fonctionnement autonome durant une année complète démontre la faisabilité d'un système de diagnostic de plantes. De plus, la possibilité de transmettre et de recevoir des données par satellite permet en temps quasi réel la surveillance des expériences de biologie spatiale et des systèmes de biorégénération pour le support de la vie humaine.

Au deuxième chapitre nous avons présenté la nouvelle génération d'un système de diagnostic de la santé des plantes. À l'aide des connaissances et des expériences acquises lors de la conception et lors du déploiement du premier système, présenté au premier chapitre, nous avons conçu un système beaucoup plus avancé avec des nouvelles caractéristiques et fonctionnalités importantes. Dans l'article nous avons décrit la conception d'un système

d'imagerie multispectral autonome. Il a été développé pour évaluer la santé des plantes in situ dans des serres ordinaires ou dans des installations de production de plantes situées dans des environnements hostiles et éloigné. Avec son filtre variable à cristaux liquide, l'imageur peut être configuré pour capturer une série d'images, comme la PVF, les protéines fluorescentes jaunes, les protéines fluorescentes rouges et la fluorescence de la chlorophylle naturelle. En outre, le circuit imprimé avec des DEL conçues sur mesure pour la photosynthèse est composé de diodes électroluminescentes pouvant être commandées indépendamment avec sept longueurs d'onde centrales différentes. De plus, un contrôle indépendant de la moitié supérieure / inférieure du circuit permet au système d'être employé au cours de plusieurs scénarios et expériences. De nombreux systèmes pour la capture de fluorescence en laboratoire sont disponibles, mais ils sont limités à un ou plusieurs ensembles prédéterminés de filtres. Ces systèmes demandent un travail considérable et ne comprennent pas d'éclairage pour la photosynthèse. Cependant, des études montrent que des données précieuses peuvent être saisies par un système capable de mesurer une large gamme de protéines fluorescentes ainsi que les fluorescences naturelles des chlorophylles. Un système incorporant l'éclairage photosynthétique contrôlable a la capacité de loger des échantillons de plantes pour des études expérimentales de longue durée. Le système d'imagerie multispectral a été déployé dans une chambre hypobare et a détecté avec succès les changements dans la PVF et la fluorescence de la chlorophylle due à des variations de pression. C'est le premier système de surveillance de la santé des plantes qui a fonctionné de manière autonome dans une chambre à basse pression avec la possibilité d'accéder aux données en temps réel. Son déploiement et les opérations ont démontré la faisabilité d'un système de diagnostic qui permettra la surveillance et le contrôle d'expériences de biologie spatiale et systèmes de soutien de la vie biorégénératifs. Ceci suggère que le système d'imagerie multispectral représente un outil fondamental pour la surveillance de la santé des plantes. Ce qui constitue une étape considérable en étendant les capacités techniques de l'envoi des données sur le statut de la santé des plantes de façon télémétrique à partir d'un emplacement extra-terrestre ou éloigné.

Le papier de conférence que nous avons présenté dans ce mémoire propose un algorithme de segmentation d'images de plantes capturées par les prototypes de système de diagnostic

exhibés au chapitre 1 et 2. L'algorithme que nous avons développé permet de distinguer de manière efficace les pixels des feuilles, tiges, racines et le fond. L'article a démontré qu'un vecteur de caractéristiques peut-être extrait à l'aide de deux images, une visible et une fluorescente, ce qui donne un vecteur à deux dimensions. Ensuite trois différents algorithmes de classification, l'algorithme du Bayes-quadratique, l'algorithme des K Plus Proches Voisins et l'algorithme des Machines à Vecteurs de Support ont prouvé le succès de la caractérisation pour classifier tous les pixels de l'image. En effet, les résultats obtenus démontrent qu'avec la méthode de caractérisation utilisée, les trois algorithmes de classification ont classifié avec succès tous les pixels des feuilles, des tiges, des racines et le fond de l'image des plantes avec un faible taux d'erreur. Pour les trois algorithmes de classifications, les erreurs se trouvent surtout dans la classe racine. Ceci est dû au fait que le signal de la fluorescence de la racine est faible et très près du niveau de gris de la classe fond. Le rapport signal sur bruit est alors élevé, ce qui engendre plus d'erreurs que pour les autres classes qui ont un signal plus fort. Le Bayes-Q a le meilleur rapport performances/erreurs: il a visiblement, un peu plus d'erreurs que le KNN, mais il est moins gourmand en temps et en énergie que KNN. Théoriquement le SVM devrait être le meilleur des classifieurs, le fait qu'il n'était pas aussi performant est probablement dû au noyau gaussien utilisé. Un noyau conçu spécifiquement pour cette application donnerait sans doute moins d'erreurs de classification. Pour conclure, nous pouvons dire que l'objectif de simplifier l'analyse des images capturées par les systèmes de surveillance de la santé des plantes a pu être atteint à l'aide de la technique de caractérisation présentée dans le chapitre 3. À l'aide de l'algorithme de segmentation développé au cours de ce projet et intégré dans les systèmes d'imagerie, celui-ci peut analyser et envoyer des données chiffrées et non pas des images, ce qui devrait résoudre les problèmes de communication et le long temps d'analyses.

Puisque les systèmes de diagnostic de la santé des plantes sont une technologie jeune et immature, il y a encore beaucoup de place pour des améliorations et des avancées. Une étape importante est la capacité de capturer la fluorescence en présence indirecte de lumière du jour puis, éventuellement, avec une lumière naturelle directe. L'avantage d'un tel système est de pouvoir surveiller les plantes dans leurs conditions de croissance nominale, soit dans l'espace,



soit dans une serre ou sur des terres agricoles. Cela serait un bon sujet d'une thèse de doctorat!



## LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abboud, Talal, Matthew Bamsey, Anna-Lisa Paul, Thomas Graham, Stephen Braham, Rita Noumeir, Alain Berinstain et Robert Ferl. 2013a. « Deployment of a Fully-Automated Green Fluorescent Protein Imaging System in a High Arctic Autonomous Greenhouse ». *Sensors (MDPI)*, vol. 13, n° 3, p. 3530-3548.
- Abboud, Talal, Alain Berinstain, Matthew Bamsey, Robert Ferl, Anna-Lisa Paul, Thomas Graham, Mike Dixon, Demos Leonardos, Michael Stasiak et Rita Noumeir. 2013b. « Multispectral Plant Health Imaging System for Space Biology and Hypobaric Plant Growth Studies ». *Sensors (Insciencés)*, vol. 3, n° 2, p. 24-43.
- Abboud, Talal, Rachid Hedjam, Rita Noumeir et Alain Berinstain. 2012. « Segmentation d'images de plantes capturées par un système d'imagerie fluorescente ». In *25<sup>th</sup> IEEE Canadian Conference on Electrical and Computer Engineering (CCECE)*. (Montreal, Canada, 29 April - 02 May).
- Adankon, Mathias M. 2005. « Optimisation de ressources pour la sélection de modèle des SVM ». Mémoire. Montreal, École de Technologie Supérieure.
- Baker, Neil R., et Eva Rosenqvist. 2004. « Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities ». *Journal of Experimental Botany*, vol. 55, n° 403, p. 1607-1621.
- Bamsey, Matthew, Alain Berinstain, Thomas Graham, Philip Neron, Richard Giroux, Stephen Braham, Robert Ferl, Anna-Lisa Paul et Mike Dixon. 2009a. « Developing strategies for automated remote plant production systems: Environmental control and monitoring of the Arthur Clarke Mars Greenhouse in the Canadian High Arctic ». *Advances in Space Research*, vol. 44, n° 12, p. 1367-1381.
- Bamsey, Matthew, Thomas Graham, Michael Stasiak, Alain Berinstain, Alan Scott, Theresa Rondeau Vuk et Mike Dixon. 2009b. « Canadian advanced life support capacities and future directions ». *Advances in Space Research*, vol. 44, n° 2, p. 151-161.
- Barta, D. J., et D. L. Henninger. 1994. « Regenerative life support systems--why do we need them? ». *Adv Space Res*, vol. 14, n° 11, p. 403-10.
- Binot, R. A., C. Tamponnet et Ch Lasseur. 1994. « Biological life support for manned missions by ESA ». *Adv Space Res*, vol. 14, n° 11, p. 71-4.
- Bringslimark, Tina, Terry Hartig et Grete G. Patil. 2009. « The psychological benefits of indoor plants: A critical review of the experimental literature ». *Journal of Environmental Psychology*, vol. 29, n° 4, p. 422-433.

- Canada, Statistics. 2011. « Greenhouse, sod and nursery industries 2010 ». Ottawa, Ontario: 22-202-X. <<http://www5.statcan.gc.ca/bsolc/olc-cel/olc-cel?catno=22-202-XW&lang=eng>>.
- Chamberland, D., W. M. Knott, J. C. Sager et R. Wheeler. 1992. « Controlled ecological life-support system. Use of plants for human life-support in space ». *J Fla Med Assoc*, vol. 79, n° 8, p. 537-44.
- Chen, W., N. J. Provart, J. Glazebrook, F. Katagiri, H. S. Chang, T. Eulgem, F. Mauch, S. Luan, G. Zou, S. A. Whitham, P. R. Budworth, Y. Tao, Z. Xie, X. Chen, S. Lam, J. A. Kreps, J. F. Harper, A. Si-Ammour, B. Mauch-Mani, M. Heinlein, K. Kobayashi, T. Hohn, J. L. Dangl, X. Wang et T. Zhu. 2002. « Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses ». *Plant Cell*, vol. 14, n° 3, p. 559-74.
- Cheriet, Mohamed, Nawwaf Kharm, Cheng-Lin Liu et Ching Suen. 2007. *Character Recognition Systems: A Guide for Students and Practitioners*. Wiley-Interscience.
- Corp, L. A., J. E. McMurtrey, E. W. Chappelle, M. S. Kim et C. S. T. Daughtry. 1996. « Optimal fluorescence excitation wavelengths for detection of stress in vegetation ». In *Geoscience and Remote Sensing Symposium, 1996. IGARSS '96. 'Remote Sensing for a Sustainable Future.'*, International. (27-31 May 1996) Vol. 3, p. 1812-1815 vol.3.
- Cushman, J. C., et H. J. Bohnert. 2000. « Genomic approaches to plant stress tolerance ». *Curr Opin Plant Biol*, vol. 3, n° 2, p. 117-24.
- Ehlert, Britta, et Dirk Hinch. 2008. « Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in Arabidopsis leaves ». *Plant Methods*, vol. 4, n° 1, p. 12.
- Folta, Kevin, Lawrence Koss, Ryan McMorrow, Hyeon-Hye Kim, J Dustin Kenitz, Raymond Wheeler et John Sager. 2005. « Design and fabrication of adjustable red-green-blue LED light arrays for plant research ». *BMC Plant Biology*, vol. 5, n° 1, p. 17.
- Galston, A. W. 1992. « Photosynthesis as a basis for life support on Earth and in space: photosynthesis and transpiration in enclosed spaces ». *Bioscience*, vol. 42, n° 7, p. 490-3.
- Giroux, Richard, Alain Berinstain, Stephen Braham, Thomas Graham, Matthew Bamsey, Keegan Boyd, Matthew Silver, Alexis Lussier-Desbiens, Pascal Lee, Marc Boucher, Keith Cowing et Mike Dixon. 2006. « Greenhouses in extreme environments: The Arthur Clarke Mars Greenhouse design and operation overview ». *Advances in Space Research*, vol. 38, n° 6, p. 1248-1259.

- Goins, G.D., N.C. Yorio, M.M. Sanwo et C.S. Brown. 1997. « Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting ». *Journal of Experimental Botany*, vol. 48, n° 7, p. 1407-1413.
- Heim, R., et R. Y. Tsien. 1996. « Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer ». *Curr Biol*, vol. 6, n° 2, p. 178-82.
- Ishita, Ahuja, De Vos Ric C H, Bones Atle M et Hall Robert D. 2010. « Plant molecular stress responses face climate change ». *Trends Plant Sci*, vol. 15, n° 12, p. 664-74.
- Kant, P., M. Gordon, S. Kant, G. Zolla, O. Davydov, Y. M. Heimer, V. Chalifa-Caspi, R. Shaked et S. Barak. 2008. « Functional-genomics-based identification of genes that regulate Arabidopsis responses to multiple abiotic stresses ». *Plant Cell Environ*, vol. 31, n° 6, p. 697-714.
- Kilian, J., D. Whitehead, J. Horak, D. Wanke, S. Weinl, O. Batistic, C. D'Angelo, E. Bornberg-Bauer, J. Kudla et K. Harter. 2007. « The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses ». *Plant J*, vol. 50, n° 2, p. 347-63.
- Kliss, M., A. G. Heyenga, A. Hoehn et L. S. Stodieck. 2000. « Recent advances in technologies required for a "Salad Machine" ». *Adv Space Res*, vol. 26, n° 2, p. 263-9.
- Koornneef, Maarten, et David Meinke. 2010. « The development of Arabidopsis as a model plant ». *The Plant Journal*, vol. 61, n° 6, p. 909-921.
- Lee, Pascal, Stephen Braham, Marc Boucher, W. John Schutt, Geoffrey Briggs, Brian Glass, Anthony Gross, Butler Hine, Christopher P McKay, Stephen J Hoffman, Jeffrey A Jones, Alain Berinstain, Jean-Marc Comtois, Ed Hodgson et Nicholas. Wilkinson. 2007. « Haughton-Mars project: 10 years of science operations and exploration systems development at a Moon/Mars analog site on Devon Island, high arctic. ». In *38th Lunar and Planetary Science Conference*. (League City, Texas), p. 2426. Lunar and Planetary Institute.
- Levri, Julie, Fisher John W, Jones Harry W, Drysdale Alan E, Ewert Michael K, Hanford Anthony J, Hogan John A, Joshi Jitendri A et Vaccari David A. 2003. « Advanced life support equivalent system mass guidelines document ». *Ames Research Center*, vol. TM-2003-212278.
- Lichtenthaler, Hartmut K., et Fatbardha Babani. 2000. « Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence ». *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 38, n° 11, p. 889-895.

- Manak, Michael, Anna-Lisa Paul, Paul Sehnke et Robert Ferl. 2002. « Remote sensing of gene expression in Planta: transgenic plants as monitors of exogenous stress perception in extraterrestrial environments ». *Life Support Biosph Sci*, n° 1069-9422, p. 8:83-91.
- Maxwell, Kate, et Giles N. Johnson. 2000. « Chlorophyll fluorescence—a practical guide ». *Journal of Experimental Botany*, vol. 51, n° 345, p. 659-668.
- Myers, J. 1954. « Basic remarks on the use of plants as biological gas exchangers in a closed system ». *J Aviat Med*, vol. 25, n° 4, p. 407-11.
- Nelson, M., T. L. Burgess, A. Alling, N. Alvarez-Romo, W. F. Dempster, R. L. Walford et J. P. Allen. 1993. « Using a closed ecological system to study Earth's biosphere: initial results from Biosphere 2 ». *Bioscience*, vol. 43, n° 4, p. 225-36.
- Paul, Anna-Lisa, Matthew Bamsey, Alain Berinstain, Stephen Braham, Philip Neron, Trevor Murdoch, Thomas Graham et Robert Ferl. 2008. « Deployment of a prototype plant GFP imager at the Arthur Clarke Mars Greenhouse of the Haughton Mars Project ». *Sensors*, vol. 8, n° 4, p. 2762-2773.
- Paul, Anna-Lisa, Christine J. Daugherty, Elizabeth A. Bihn, David K. Chapman, Kelly L.L. Norwood et Robert J. Ferl. 2001. « Transgene Expression Patterns Indicate That Spaceflight Affects Stress Signal Perception and Transduction in Arabidopsis ». *Plant Physiology*, vol. 126, n° 2, p. 613-621.
- Paul, Anna-Lisa, et Robert J Ferl. 2006. « The biology of low atmospheric pressure - implications for exploration mission design and advanced life support ». *Gravitational and Space Biology*, vol. 19, n° 2, p. 3-18.
- Paul, Anna-Lisa, Michael Manak, John Mayfield, Matthew Reyes, William Gurley et Robert Ferl. 2011. « Parabolic flight induces changes in gene expression patterns in Arabidopsis thaliana ». *Astrobiology*, vol. 11, n° 8, p. 743-58.
- Paul, Anna-Lisa, Trevor Murdoch, E. Ferl, Howard Levine et Robert Ferl. 2003. « The TAGES Imaging System: Optimizing a green fluorescent protein imaging system for plants. ». *SAE Technical Paper*, vol. 2003-01-2477.
- Paul, Anna-Lisa, Andrew Schuerger, Michael Popp, Jeffrey Richards, Michael Manak et Robert Ferl. 2004. « Hypobaric biology: Arabidopsis gene expression at low atmospheric pressure ». *Plant Physiology*, vol. 134, n° 1, p. 215-23.
- Plautz, J. D., R. N. Day, G. M. Dailey, S. B. Welsh, J. C. Hall, S. Halpain et S. A. Kay. 1996. « Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living Drosophila melanogaster, plant and mammalian cells ». *Gene*, vol. 173, n° 1 Spec No, p. 83-7.

- Porra, R. J., W. A. Thompson et P. E. Kriedemann. 1989. « Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 975, n° 3, p. 384-394.
- Schurr, U., A. Walter et U. Rascher. 2006. « Functional dynamics of plant growth and photosynthesis--from steady-state to dynamics--from homogeneity to heterogeneity ». *Plant Cell Environ*, vol. 29, n° 3, p. 340-52.
- Sheen, J., S. Hwang, Y. Niwa, H. Kobayashi et D. W. Galbraith. 1995. « Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells ». *Plant J*, vol. 8, n° 5, p. 777-84.
- Stewart, C. N., Jr. 2001. « The utility of green fluorescent protein in transgenic plants ». *Plant cell reports*, vol. 20, n° 5, p. 376-82.
- Sultan, S. E. 2010. « Plant developmental responses to the environment: eco-devo insights ». *Curr Opin Plant Biol*, vol. 13, n° 1, p. 96-101.
- Tamponnet, Christian, et Christopher Savage. 1994. « Closed Ecological Systems ». *Journal of Biological Education*, vol. 28, n° 3, p. 167-174.
- Tibbits, T. W.; , et D. K Alford. 1982. *Controlled Ecological Life Support System: Use of Higher Plants*. Technical. NASA. <  
[http://www.archive.org/details/nasa\\_techdoc\\_19820016958](http://www.archive.org/details/nasa_techdoc_19820016958)>.
- Turc, H. A., J. Pintena, P. Bagarri, F. Gibiat et V. Fabreguettes. 1999. « A combined modeling and experimental approach for achieving a simplified closed ecosystem ». *Adv Space Res*, vol. 24, n° 3, p. 351-60.
- Wehkamp, Cara Ann, Michael Stasiak, Jamie Lawson, Neil Yorio, Gary Stutte, Jeffrey Richards, Raymond Wheeler et Michael Dixon. 2012. « Radish (*Raphanus sativa* L. cv. Cherry Bomb II) growth, net carbon exchange rate, and transpiration at decreased atmospheric pressure and / or oxygen ». *Gravitational and Space Biology*, vol. 26, n° 1, p. 3-16.
- West-Eberhard, M. J., J. A. Smith et K. Winter. 2011. « Plant science. Photosynthesis, reorganized ». *Science*, vol. 332, n° 6027, p. 311-2.
- Wheeler, R., J. C. Sager, R. P. Prince, W. M. Knott, C. L. Mackowiak, G. W. Stutte, N. C. Yorio, L. M. Ruffe, B. V. Peterson, G. D. Goins, C. R. Hinkle et W. L. Berry. 2003. *Crop production for advanced life support systems observations from the Kennedy Space Center Breadboard Project*, 58. Kennedy Space Center: NASA.

Wheeler, Raymond M. 2010. « Plants for human life support in space: from Myers to Mars ». *Gravitational and Space Biology*, vol. 23, n° 2, p. 25-36.

Wikipedia, the free encyclopedia. 2005. « Tagged Image File Format ». In *Wikipedia website*. Online. < [http://en.wikipedia.org/wiki/Tagged\\_Image\\_File\\_Format#cite\\_ref-0](http://en.wikipedia.org/wiki/Tagged_Image_File_Format#cite_ref-0) >. Consulté le 5 september 2012.

Wikipedia, the free encyclopedia 2007. « JPEG ». In *Wikipedia website*. < <http://en.wikipedia.org/wiki/JPEG> >. Consulté le 5 september 2012.