

Cartographie *ex vivo* et individuelle de la cytoarchitecture et de la myéloarchitecture du cortex cérébral humain à très haut champ magnétique

Raïssa Yebga Hot^{1,2}, Alexandros Popov^{1,2}, Justine Beaujoin¹, Gaël Perez^{1,3}, Cyril Poupon^{1,2}

¹UNIRS, CEA/DRF/NeuroSpin, Gif-sur-Yvette, France; ²Université Paris-Saclay, Orsay, France ; ³CentraleSupélec, Gif-sur-Yvette, France.

Introduction

Le cortex cérébral humain (*pallium* en latin) est une zone continue de substance grise d'environ 3 à 4 millimètres d'épaisseur occupant la totalité de la surface cérébrale. Il présente une structure laminaire tant du point de vue de son organisation cellulaire (cytoarchitecture) que de sa myélinisation (myéloarchitecture). Aboutir à une segmentation automatique des couches corticales à une échelle mésoscopique permettrait de mieux appréhender les corrélats anatomiques des fonctions cérébrales chez le sujet sain, mais également de mieux identifier les anomalies de ces structures dans les pathologies cérébrales, à l'instar des pathologies neurodégénératives (par exemple la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson) ou neurodéveloppementales. L'objectif des travaux présentés ici portent donc sur le développement de nouvelles approches de cartographie *ex vivo* de la cytoarchitecture et de la myéloarchitecture du cortex cérébral grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) quantitative et de diffusion à très haut champ magnétique. De premiers résultats pour illustrer l'efficacité de la méthode sont donnés sur la région occipitale gauche correspondant à l'aire visuelle primaire (V1) d'un cerveau humain.

Matériel et méthodes

L'échantillon de cerveau humain - L'étude a porté sur un cerveau entier *post mortem* d'un homme de 92 ans présentant des antécédents de DMLA et des premiers signes de troubles cognitifs. Le cerveau fut fixé par immersion et perfusion dans du formol concentré à 4%. La fixation a débuté 8 heures après la mort du donneur puis le cerveau fut conservé dans cette solution à une température de 5°C pendant 5 mois. La pièce anatomique fut découpée en trois parties: les deux hémisphères et le cervelet. Puis chaque hémisphère fut découpé en blocs parallélépipédiques (7 pour l'hémisphère gauche et 6 pour l'hémisphère droit) afin de permettre l'acquisition de données IRM à très haut champ (11,7T et 7T) sur un imageur IRM préclinique. Chaque bloc est immobilisé dans un gel d'isolation électrique et hydraté régulièrement à l'aide d'une solution de PBS (*phosphate buffered saline*) à 0.1M.

Au moment de l'acquisition, la solution de PBS est remplacée par un fluide non-protonique, le Fluorinert®, qui ne présente aucun signal résonance magnétique nucléaire (RMN). Ce fluide protège les tissus de la déshydratation et limite les effets de susceptibilité susceptibles d'induire des distorsions géométriques délétaires. Les trois étapes de préparation d'une bloc sont présentées à la Figure 1.

Protocoles IRM – Chaque bloc de l'encéphale fut scanné à 4 reprises sur 4 champs de vue consécutifs permettant de couvrir le champ de vue global (2 champs de vue consécutifs se superposent sur une région de 1cm d'épaisseur afin de faciliter le recalage *a posteriori*), et en utilisant 2 IRM précliniques, le Bruker BioSpec 11,7T ($G_{\max}=780\text{mT/m}$,

$v_{\text{balayage}}=9500\text{T/m/s}$) et le Bruker BioSpec 7T ($G_{\text{max}}=440\text{mT/m}$, $v_{\text{balayage}}=3440\text{T/m/s}$). Le premier sert à acquérir les données anatomiques et de diffusion, et relaxométriques pour le second à l'aide d'antennes volumiques en émission-réception Bruker ^1H de 60mm de diamètre intérieur.

Le protocole d'imagerie anatomique et de diffusion à 11,7T inclut d'une part deux séquences IRM pondérées en T_2 avec une résolution isotrope de $100\mu\text{m}$ (séquence MSME 3D, TE/TR=20/500ms, taille de la matrice=400x400, 560 coupes, 1 excitation, bande passante de lecture=50kHz) et $150\mu\text{m}$ (séquence Spin Echo 2D pondérée en T_2 , TE/TR=16/6647ms, taille de la matrice=374x275, 256 coupes, 9 excitations, angle de bascule=90°, bande passante de lecture=66kHz). D'autre part, le protocole compte un ensemble de séquences IRM pondérées en diffusion de type multiple-shell permettant l'acquisition de données à haute résolution spatiale de $200\mu\text{m}$ isotrope (séquence EPI 3D segmentée, TE/TR=24,3/250ms, $\delta/\Delta=5/12,3\text{ms}$, $b=0\text{s/mm}^2$, 30 segments, angle de bascule=90°, taille de la matrice=280x212, 204 coupes, 1 excitation, bande passante de lecture=300kHz), avec un échantillonnage de l'espace q réalisé avec respectivement $b=1500/4500/8000\text{s/mm}^2$ et 25/60/90 directions.

Le protocole d'imagerie quantitative à 7T inclut une série de séquences d'échos de spin multiples pondérées en T_2 (séquence MSME 3D, 30 échos, TE/TR=5,56-166,8/1000ms, 3 excitations, taille de la matrice=280x212, 204 coupes, bande passante de lecture=100kHz), une série de séquences d'échos de gradient multiple pondérées en T_2^* (séquence $T_2\text{s-EPI}$ 3D, signal de type Spin Echo, 8 images écho, TE/TR=3-69,04/9000ms, angle de bascule=90°, 30 segments, taille de la matrice=280x212, 204 coupes, 30 excitations, bande passante de lecture=300kHz), une série de séquences d'échos de gradient rapide avec angle de bascule variable (Trzasko et al., 2013) pondérées en T_1 (séquence FLASH avec angle de bascule variable, TE/TR=4,99/15ms, angles de bascule=3-50°, taille de la matrice=280x212, 204 coupes, 1 excitation, bande passante de lecture=50kHz). Une cartographie du champ B_1 par la méthode du double angle de bascule (Cunningham et al., 2006) a également été réalisée afin de corriger a posteriori les données pondérées en T_1 du biais de champ radiofréquence (séquence EPI 3D, TE/TR=13,41/1500ms, angles de bascule=30/60°, signal de type Spin Echo, 35 segments, taille de la matrice=280x212, 204 coupes, 1 excitation, bande passante de lecture=300kHz). L'ensemble des séquences relaxométriques a permis d'obtenir des données de résolution spatiale de $200\mu\text{m}$ isotrope, identique à la résolution des données pondérées en diffusion.

Post-traitement – Prétraitement des données : les données pondérées en diffusion ont été corrigées du bruit ricien à l'aide d'un algorithme de débruitage par moyennes non-locales (*non-local means*) (Buades et al., 2011; Condat, 2010). Compte tenu de leur rapport signal à bruit élevé (>20) et de l'absence visible de distorsion géométrique liée à l'utilisation d'un schéma de lecture EPI segmenté avec un grand nombre de segments (30 segments), aucune correction de bruit ni de distorsion géométrique des données anatomiques et relaxométriques n'a été nécessaire, à l'exception de la correction de biais B_1 des données pondérées en T_1 à l'aide de la cartographie du champ B_1 en utilisant la méthode proposée par (Sung et al., 2013).

Calcul d'un masque du tissu : un masque correspondant au tissu cérébral a ensuite été construit par combinaison d'opérateurs de seuillage et de morphologie mathématique suivi d'une correction manuelle.

Calcul des cartographies paramétriques de la cyto- et myéloarchitecture : des routines d'analyse ad hoc ont été programmées en langages C++ et python afin de reconstruire les cartographies du modèle NODDI (*Neurite Orientation Dispersion and Density Imaging*) (Zhang et al., 2012, 2019) permettant d'avoir accès à une estimation de la densité neuritique locale et de la dispersion angulaire des dendrites ou axones, et les

cartographies des paramètres quantitatifs tels que la densité protonique ρ , les temps de relaxation T_1 , T_2 , T_2^* mais également la fraction de myéline locale (MWF) (Kulikova et al., 2016).

Résultats et discussion

Les résultats présentés portent sur l'aire visuelle primaire (V1, aire 17 de Brodmann) du lobe occipital de l'hémisphère gauche de l'échantillon *ex vivo*, correspondant au champ de vue C1 présenté sur la Figure 1. Les images anatomiques de la Figure 2, centrée sur la scissure calcarine, révèle grâce à leur contraste des couches corticales et la strie de Gennari est notamment visible. Les cartes quantitatives, présentées aux Figures 3 et 4, ont leurs histogrammes de distribution gaussienne. A partir de celles-ci, il a été possible de déterminer les paramètres quantitatifs suivants : $\rho = 0,14 \pm 0,05$; $T_{1,\text{tissu}} = 250\text{ms} \pm 85\text{ms}$; $T_{2,\text{tissu}} = 45\text{ms} \pm 15\text{ms}$; $T_{2^*,\text{tissu}} = 27\text{ms} \pm 9\text{ms}$; $MWF = 0,22 \pm 0,05$; $T_{1,\text{myéline}} = 170\text{ms} \pm 30\text{ms}$; $T_{2,\text{myéline}} = 38\text{ms} \pm 10\text{ms}$.

De même, les cartes quantitatives microstructurales de la Figure 5 permettent d'obtenir une estimation des paramètres impliqués dans le modèle NODDI : $f_{\text{intra}} = 0,47 \pm 0,1$; $f_{\text{iso}} = 0,12 \pm 0,1$; $OD = 0,70 \pm 1$.

Les données quantitatives calculées dans cette étude sont cohérentes avec de précédents travaux d'IRM quantitatives *ex vivo* (Birkl et al., 2016; Sengupta et al., 2018; Shatil et al., 2018), même si ces dernières sont réalisées sous un champ magnétique moins intense. De plus, la qualité de la fixation impacte les valeurs de relaxométrie obtenues (D'Arceuil and de Crespigny, 2007; Pfefferbaum et al., 2004; Shepherd et al., 2009; Thelwall et al., 2006), ce qui se traduit par un écart-type conséquent pour les valeurs présentées malgré un intervalle de réfrigération de l'échantillon (PMI) relativement faible (PMI=8h).

Conclusion

A travers cette étude, nous avons pu montrer que l'imagerie par résonance magnétique de diffusion et quantitative à très haut champ magnétique permet de mettre en lumière les couches corticales et de myéline de l'aire visuelle primaire (V1) sur un sujet humain *post mortem*. Ces modalités d'imagerie ont aussi permis de caractériser les tissus de cette aire corticale par des données quantitatives et microstructurales, ainsi que de délimiter avec précision la strie de Gennari. Ces travaux sont les prémisses d'une caractérisation complète du cortex cérébral humain en *ex vivo*.

Financement

Ce projet a été entièrement financé par le European Union's Horizon 2020 Framework Program for Research and Innovation (Grant Agreement No 720270, Human brain Project SGA2).

Figures

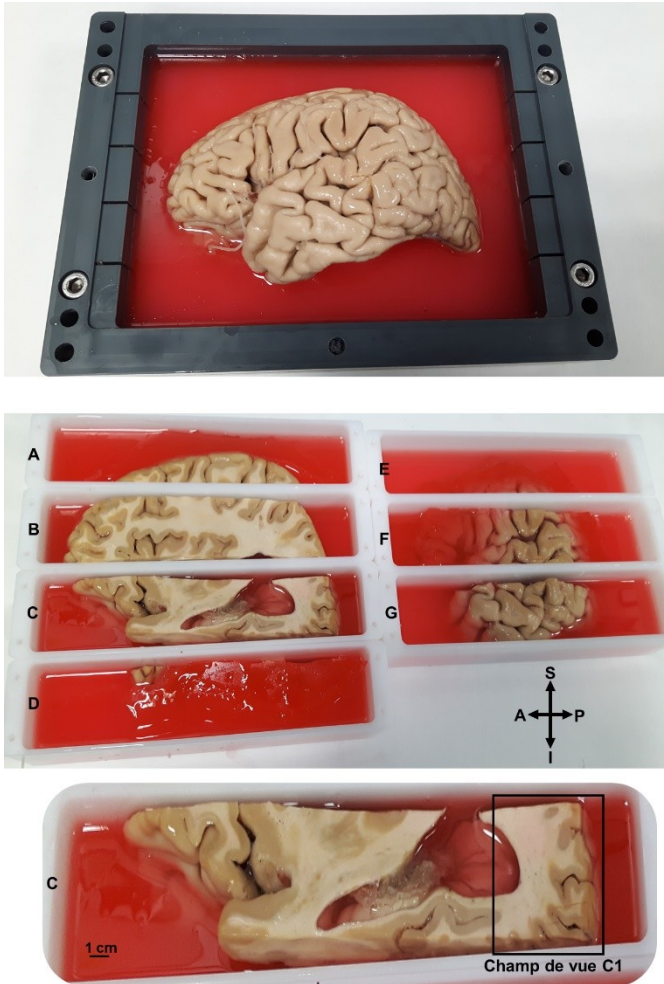


Figure 1. Images du cerveau *ex vivo* entier, des blocs de l'échantillon, et en particulier le bloc C et du champ de vue C1, ainsi que du gel les immobilisant dans leurs contenants fabriqués sur-mesure. A=antérieur ; P=postérieur ; S=supérieur ; I=inférieur.

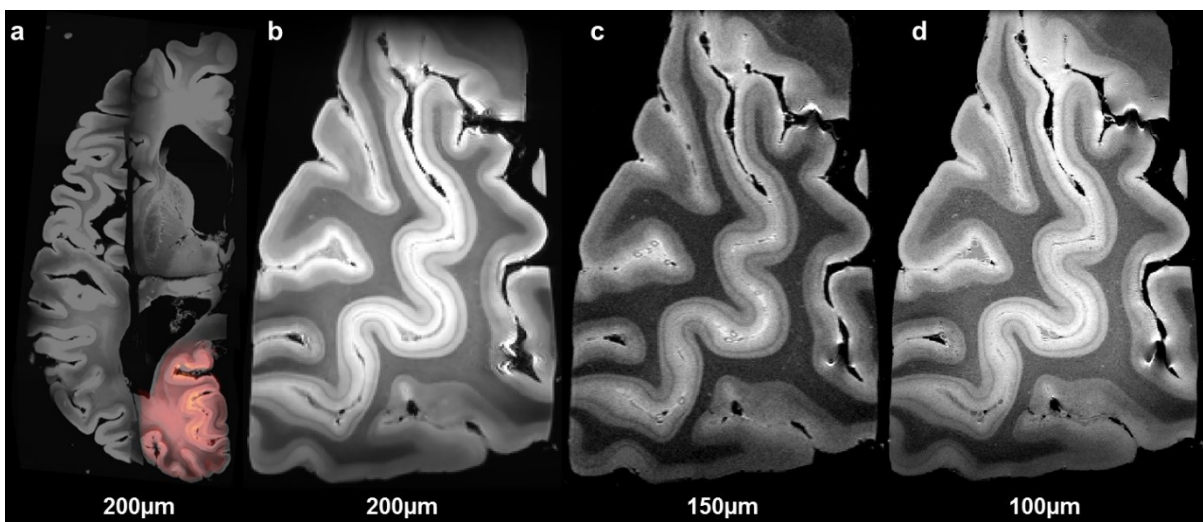


Figure 2. Images provenant des données anatomiques sur le champ de vue C1 de l'échantillon de cerveau humain *ex vivo*: (a) fusion de l'image anatomique pondérée en T_2 de l'hémisphère gauche à une résolution isotrope de 200µm avec le champ de vue C1 en

coupe axiale; (b) image anatomique pondérée en T_2 à une résolution isotrope de $200\mu\text{m}$ du champ de vue C1 en coupe sagittale; (c) image anatomique pondérée en T_2 à une résolution isotrope de $150\mu\text{m}$ du champ de vue C1 en coupe sagittale; (d) image anatomique pondérée en T_2 à une résolution isotrope de $100\mu\text{m}$ du champ de vue C1 en coupe sagittale.

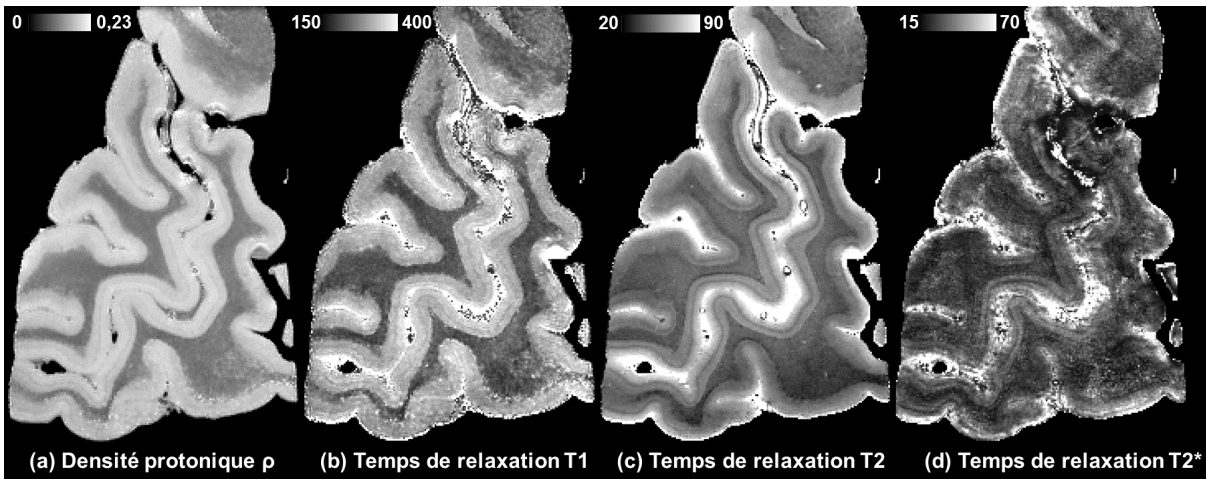


Figure 3. Cartes quantitatives à une résolution isotrope de $200\mu\text{m}$ sur le champ de vue C1 de l'échantillon de cerveau humain *ex vivo*: (a) carte quantitative de la densité protonique ρ ; (b) carte quantitative du temps de relaxation T_1 en milliseconde; (c) carte quantitative du temps de relaxation T_2 en milliseconde; (d) carte quantitative du temps de relaxation T_2^* en milliseconde.

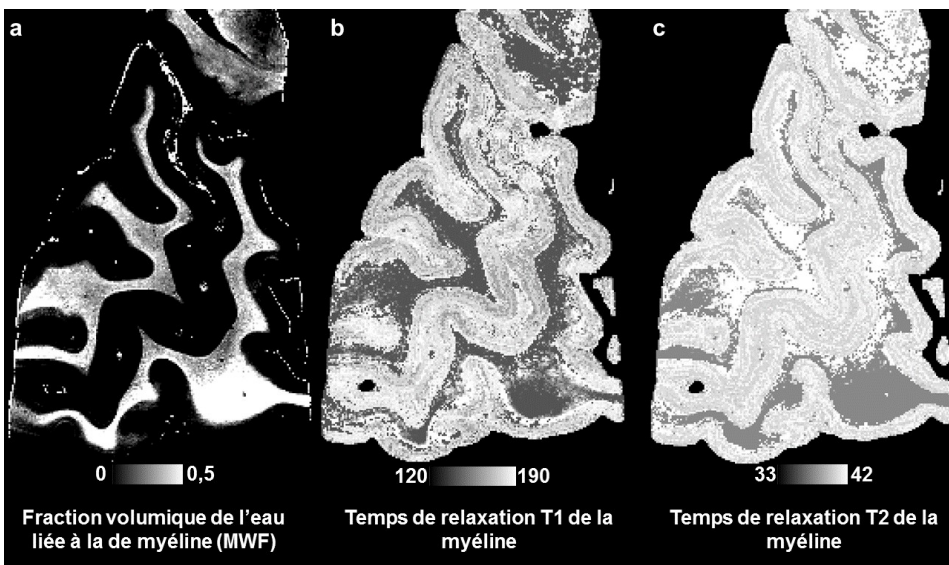


Figure 4. Cartes quantitatives microstructurales à une résolution isotrope de $200\mu\text{m}$ issues des données de diffusion sur le champ de vue C1 de l'échantillon de cerveau humain *ex vivo*: (a) carte quantitative de la fraction volumique d'eau liée à la myéline (MWF); (b) carte quantitative du temps de relaxation T_1 de la myéline en milliseconde; (c) carte quantitative du temps de relaxation T_2 de la myéline en milliseconde.

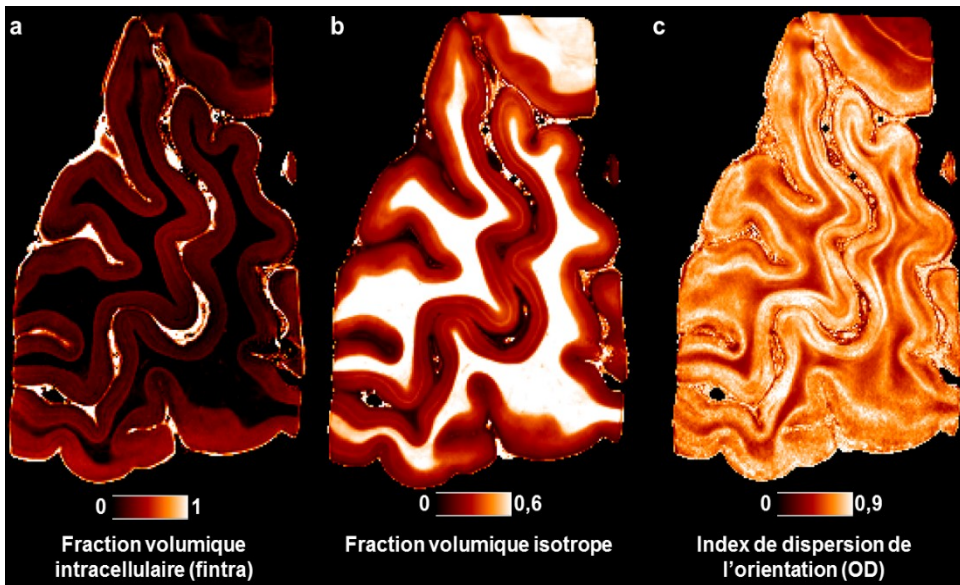


Figure 5. Cartes quantitatives microstructurales à une résolution isotrope de $200\mu\text{m}$ issues des données de diffusion et du modèle NODDI sur le champ de vue C1 de l'échantillon de cerveau humain *ex vivo*: (a) carte quantitative de la fraction intracellulaire (f_{intra}); (b) carte quantitative de la fraction isotrope; (c) carte quantitative de l'index de dispersion de l'orientation (OD).

Références

- Birkl, C., Langkammer, C., Golob-Schwarzl, N., Leoni, M., Haybaeck, J., Goessler, W., Fazekas, F., Ropele, S., 2016. Effects of formalin fixation and temperature on MR relaxation times in the human brain. *NMR Biomed.* 29, 458–465.
<https://doi.org/10.1002/nbm.3477>
- Buades, A., Coll, B., Morel, J.-M., 2011. Non-Local Means Denoising. *Image Process. Line* 1, 208–212. https://doi.org/10.5201/ipol.2011.bcm_nlm
- Condat, L., 2010. A Simple Trick to Speed Up and Improve the Non-Local Means.
- Cunningham, C.H., Pauly, J.M., Nayak, K.S., 2006. Saturated double-angle method for rapid B1+ mapping. *Magn. Reson. Med.* 55, 1326–1333.
<https://doi.org/10.1002/mrm.20896>
- D'Arceuil, H., de Crespigny, A., 2007. The effects of brain tissue decomposition on diffusion tensor imaging and tractography. *NeuroImage* 36, 64–68.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.02.039>
- Kulikova, S., Hertz-Pannier, L., Dehaene-Lambertz, G., Poupon, C., Dubois, J., 2016. A New Strategy for Fast MRI-Based Quantification of the Myelin Water Fraction: Application to Brain Imaging in Infants. *PLOS ONE* 11, e0163143.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163143>
- Pfefferbaum, A., Sullivan, E.V., Adalsteinsson, E., Garrick, T., Harper, C., 2004. Postmortem MR imaging of formalin-fixed human brain. *NeuroImage* 21, 1585–1595. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.11.024>
- Sengupta, S., Fritz, F.J., Harms, R.L., Hildebrand, S., Tse, D.H.Y., Poser, B.A., Goebel, R., Roebroek, A., 2018. High resolution anatomical and quantitative MRI of the entire human occipital lobe ex vivo at 9.4T. *NeuroImage, Neuroimaging with Ultra-high Field MRI: Present and Future* 168, 162–171.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.03.039>
- Shatil, A.S., Uddin, M.N., Matsuda, K.M., Figley, C.R., 2018. Quantitative Ex Vivo MRI Changes due to Progressive Formalin Fixation in Whole Human Brain Specimens: Longitudinal Characterization of Diffusion, Relaxometry, and Myelin Water Fraction Measurements at 3T. *Front. Med.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00031>
- Shepherd, T.M., Thelwall, P.E., Stanis, G.J., Blackband, S.J., 2009. Aldehyde fixative solutions alter the water relaxation and diffusion properties of nervous tissue. *Magn. Reson. Med.* 62, 26–34. <https://doi.org/10.1002/mrm.21977>
- Sung, K., Saranathan, M., Daniel, B.L., Hargreaves, B.A., 2013. Simultaneous T1 and B1+ Mapping using Reference Region Variable Flip Angle Imaging. *Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med.* 70, 954–961.
<https://doi.org/10.1002/mrm.24904>
- Thelwall, P.E., Shepherd, T.M., Stanis, G.J., Blackband, S.J., 2006. Effects of temperature and aldehyde fixation on tissue water diffusion properties, studied in an erythrocyte ghost tissue model. *Magn. Reson. Med.* 56, 282–289.
<https://doi.org/10.1002/mrm.20962>
- Trzasko, J.D., Mostardi, P.M., Riederer, S.J., Manduca, A., 2013. Estimating T1 from Multichannel Variable Flip Angle SPGR Sequences. *Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med.* 69.
<https://doi.org/10.1002/mrm.24401>
- Zhang, H., Schneider, T., Wheeler-Kingshott, C.A., Alexander, D.C., 2012. NODDI: Practical in vivo neurite orientation dispersion and density imaging of the human brain. *NeuroImage* 61, 1000–1016.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.03.072>
- Zhang, Y., Han, K., Worth, R., Liu, Z., 2019. Connecting Concepts in the Brain: Mapping Cortical Representations of Semantic Relations. <https://doi.org/10.1101/649939>