Université de Montréal

Comparaison de différentes techniques de fixation des laboratoires d'anatomie humaine: Les cerveaux peuvent-ils être utilisés pour la recherche neuroscientifique par histologie et par résonance magnétique ?

Par

Eve-Marie Frigon

Programme de Sciences biomédicales, Faculté de Médecine

En extension à l'Université du Québec à Trois-Rivières

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (PhD.)

en Sciences biomédicales, option Médecine expérimentale

Octobre 2025

© Eve-Marie Frigon, 2025

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

Université de Montréal

Unité académique : Université du Québec à Trois-Rivières, Département d'anatomie

---

cette thèse intitulée

Comparaison de différentes techniques de fixation des laboratoires d'anatomie humaine: Les cerveaux peuvent-ils être utilisés pour la recherche neuroscientifique par histologie et par résonance magnétique ?

Présentée par

Eve-Marie Frigon

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Sandrine Côté
Président-rapporteur

Josefina Maranzano
Directrice de recherche

Denis Boire
Codirecteur

Benjamin Boller
Membre du jury

Gabriel Venne
Examinateur externe

Résumé

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est la modalité de neuro-imagerie la plus utilisée, puisqu'elle n'est pas invasive et qu'elle génère des images qualitatives pondérées, quantitatives (c.-à-d. de diffusion, de susceptibilité ou de cartes de relaxation) ou fonctionnelles (BOLD) du cerveau entier. L'IRM montre les changements du cerveau, comme l'apparition de lésions hyperintenses dans le vieillissement normal ou neuropathologique, mais n'informe pas sur les détails cellulaires et moléculaires de ces changements. Conséquemment, l'histologie reste la référence standard pour évaluer les changements pathologiques ou du vieillissement normal pour identifier les caractéristiques cellulaires et moléculaires des cerveaux. De ce fait, combiner ces deux modalités par des méthodes de recalage d'images est essentiel pour la recherche neuroscientifique, mais aussi pour valider des diagnostics après la mort ou valider les observations faites par IRM. Pour effectuer ces analyses histologiques, il est nécessaire d'obtenir du tissu cérébral. Les banques de cerveaux fournissent généralement de petits échantillons de tissu de cerveaux fixés par immersion dans une solution de formaldéhyde (SFA). Cependant, cette solution est toxique, cancérigène, durcit le tissu et favorise la formation de liens covalents entre les protéines. En revanche, les laboratoires d'anatomie pourraient fournir un plus grand nombre de cerveaux complets fixés par perfusion avec une solution de sel saturée (SSS) ou une solution d'alcools (SA). Ces solutions ont été développées par des anatomistes afin de réduire les effets néfastes de la SFA pour la dissection et l'enseignement, mais les impacts de ces solutions sur la qualité cellulaire et moléculaire des cerveaux est inconnue.

L'objectif de mes travaux de doctorat était donc d'évaluer la qualité des cerveaux post-mortem fixés avec des solutions des laboratoires d'anatomie et de les comparer avec les spécimens fixés avec une procédure standard des banques de cerveaux, afin d'en déterminer la pertinence pour des études d'IRM et d'histologie en recherche neuroscientifique.

Plusieurs expériences ont été conduites pour accomplir cet objectif général. Premièrement, nous avons évalué la préservation antigénique des principales populations cellulaires des cerveaux de souris perfusés avec SFA, SSS et SA par immunohistochimie (IHC) et immunofluorescence (IF).

Tous les antigènes étaient marqués dans les trois groupes. Cependant, les cerveaux fixés avec SSS étaient plus difficiles à manipuler. Cette première étude nous a permis d'évaluer les impacts de la fixation sur le tissu en l'absence de variables confondantes retrouvées chez l'humain (p.ex., sexe, âge, intervalle post-mortem, comorbidités, etc.). Nous avons ensuite réalisé les mêmes expériences sur un échantillon de convenance de cerveaux humains perfusés au laboratoire d'anatomie, en plus d'ajouter des colorations histochimiques (HC). Cette deuxième étude a montré que les cerveaux fixés avec la SA ont mieux préservé les antigènes que la SFA et la SSS. De plus, les cerveaux fixés avec la SSS ont montré une diminution de la qualité du tissu par rapport aux deux autres groupes. Dans la troisième étude, nous avons scanné des blocs de tissu humain avec un scanneur animal 7T que nous avons ensuite traités par histologie de manière similaire aux deux études précédentes. Nous avons ensuite procédé au recalage manuel d'images obtenues avec la séquence T2-TurboRARE avec toutes les images histologiques. Nous avons observé des différences de contraste entre la matière blanche (MB) et la matière grise (MG) et de la quantité de distorsions des coupes dans les cerveaux fixés avec les trois solutions. Malgré ces différences, le recalage était faisable et de bonne qualité dans la majorité des cas, peu importe la solution de fixation utilisée. Dans la quatrième étude, nous avons développé un protocole d'IRM 3T *ex vivo ex situ* d'hémisphères complets fixés avec les trois solutions. Nous avons évalué le contraste MB-MG de manière qualitative et quantitative, qui s'est avéré inversé dans la séquence pondérée en T1, mais pas en T2. De plus, cette inversion de contraste n'était pas toujours complète dans les cerveaux fixés avec la SA, ce qui reflétait une fixation plus lente ou moins efficace de certaines régions. Les contrastes en T2 étaient toutefois préservés dans les cerveaux fixés avec les trois solutions. Finalement, lors de l'élaboration des protocoles d'IRM *ex vivo in situ* (c.-à-d., scan des têtes anatomiques avant l'extraction de cerveau), nous avons observé un contraste hétérogène dans les images produites par la séquence pondérée T1 qui reflétait une fixation sous-optimale de certaines régions des cerveaux de six cas fixés avec la SA. Nous avons extrait les cerveaux et observé que certaines régions correspondantes à celle du signal observé par IRM étaient macroscopiquement moins bien fixées (tissu mou et friable). Cependant, l'IHC et les colorations HC des neurones et de la myéline de ces mêmes régions étaient tout de même de qualité satisfaisante et donc, les cerveaux pouvaient être utilisés pour des analyses histologiques.

En conclusion, nous avons développé des protocoles d'histologie et d'IRM pour des cerveaux fixés avec trois solutions différentes (SFA, SSS et SA) et avons établi la faisabilité de plusieurs colorations histologiques et de séquences d'IRM, ce qui a permis de décrire les avantages et les inconvénients de chaque solution utilisée dans les laboratoires d'anatomie. La qualité des IRM, de l'histologie et des techniques de recalage de nos études supporte le fait que les cerveaux fixés avec des solutions utilisées dans les laboratoires d'anatomie humaine peuvent être utilisés pour la recherche neuroscientifique qualitative et pourraient devenir une source potentielle de tissu cérébral pour les chercheurs.

Mots-clés : cerveau, neuroanatomie, *ex vivo*, fixation, histologie, imagerie par résonance magnétique, antigénicité, recalage, laboratoire d'anatomie

Abstract

Magnetic resonance imaging (MRI) is the most common neuro-imaging modality since it is non-invasive and generates qualitative (i.e., weighted images), quantitative (i.e., diffusion, magnetization transfer imaging, relaxation maps), and functional (i.e., BOLD) images of the whole brain. While MRI informs on qualitative changes, such as hyperintense lesions in the brain, it does not provide cellular or molecular details of these changes. Consequently, histology remains the gold standard method to assess normal and pathological changes, since it is specific and sensitive to the underlying cellular and molecular features of the changes seen on MRI. Combining these two neuro-imaging modalities using registration protocols is therefore essential in neuroscientific research and neurologic post-mortem diagnosis to allow the identification of molecular changes associated with the MRI changes observed. To perform histology assessments, neuroscientists need brain tissue, generally provided by brain banks, which supply few and small tissue blocks fixed by immersion in Neutral-buffered formalin (NBF). This solution contains a high formaldehyde concentration that is hazardous, hardens the tissue, and is known to increase cross-linking of the proteins. Alternatively, a higher number of full brain specimens could be provided by gross anatomy laboratories, but these brains are fixed through full-body perfusion using different solutions, such as a salt-saturated solution (SSS) or an alcohol-formaldehyde solution (AFS). It is currently unknown if these brains could be suitable for neuroscientific research that uses MRI and histology techniques, since the impact of these different chemicals on the cellular and molecular features of the brain remains unknown.

The aim of my doctoral work was therefore to investigate the quality of brain tissue from post-mortem specimens fixed with solutions used in anatomy laboratories, and to compare them with specimens fixed using the standard brain bank approach, in order to assess their suitability for neuroscientific research that uses MRI and histology techniques.

To achieve this overall objective, various experiments were conducted. We first assessed the antigenicity of the four main brain cell populations in mice brains perfused with NBF, SSS or AFS using immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF), identifying all antigens across solutions. We also determined that the SSS-fixed brains were more difficult to manipulate. This

first study allowed us to evaluate the impact of the fixatives on the tissue without the confounding variables found in human data (e.g., sex, age, post-mortem interval, comorbidities, etc.). We then used a convenience sample of human brains fixed in our anatomy laboratory on which the same histological assessments were performed, in addition to common histochemical (HC) stains. This second study showed that the AFS-fixed brains preserved the antigens in a more homogeneous way than the NBF and SSS-fixed specimens, but that SSS-fixed brains showed lower histology quality than brains fixed with the other two solutions. In the third study, we used human brain tissue blocks that were scanned in a 7T animal scanner and processed for similar histology assessment to our previous studies. We then assessed the quality of the manual alignment of histology slices and the T2 TurboRARE scans. We found differences in the gray matter (GM) to white matter (WM) contrast and the amount of distortions across solutions, but the registration was feasible and of good quality in most of the histology-processed sections. In the fourth study, we developed *ex vivo ex situ* 3T MRI protocols of brain hemispheres fixed with the three solutions. We assessed the GM-WM contrast qualitatively and quantitatively and found that T1w GM-WM contrasts were inversed by fixation, but that this inversion was sometimes incomplete in AFS-fixed brains, probably reflecting a lesser or slower fixation process. We also found that T2-weighted GM-WM contrasts were preserved in brains fixed with the three solutions. Finally, while developing our *ex vivo in situ* brain MRI protocol (i.e., scans of anatomical heads prior to brain extraction), we observed that five cases of AFS-fixed brains presented a heterogeneous signal on T1w images which reflected regions with a suboptimal fixation. We extracted the brains and found that the macroscopic regions that seemed suboptimally fixed (i.e., friable tissue) presented a good IHC and HC quality of neurons and myelin, and therefore, these specimens were still suitable for basic histology analyses. We presented these findings as a short communication.

In conclusion, we have developed histology and MRI protocols on brain specimens fixed with three different solutions (NBF, SSS, and AFS) and have established the feasibility of various histology stains and MRI modalities, describing the pros and cons of the solutions used in anatomy laboratories. The MRI, histology, and registration quality of our studies support the conclusion that brains fixed with solutions used in anatomy laboratories are suitable for qualitative

neuroscientific research and could provide another source of neural tissue for researchers, alongside with brain banks.

Keywords : brain, neuroanatomy, *ex vivo*, fixation, perfusion, immersion, histology, magnetic resonance imaging, antigenicity, registration, anatomy laboratories

Table des matières

Résumé i

Abstract iv

Table des matières vii

Liste des tableaux xx

Liste des figures xxi

Liste des sigles et abréviations xxvi

Remerciements xxviii

Introduction 1

Problématique de recherche 1

Objectifs et hypothèses 2

Chapitre 1 – Revue de littérature 5

1. La fixation 5

1.1 Généralités et définitions 5

1.2 Principes de la fixation chimique 7

1.3 Les types de solutions de fixation 9

1.3.1 Solution de formaldéhyde (SFA) 9

1.3.1.1 Mécanisme d'action de la SFA 9

1.3.1.2 Avantages et inconvénients de la SFA 11

1.3.1.3 Étendue de l'utilisation de la SFA 12

1.3.2 Solution de sel saturé (SSS) 12

1.3.2.1 Mécanismes d'action de la SSS 12

1.3.2.2 Avantages et inconvénients de la SSS 14

1.3.2.3 Étendue d'utilisation de la SSS 14
1.3.3 Solution d'alcools (SA) 15
1.3.3.1 Mécanismes d'action de la SA 15
1.3.3.2 Avantages et inconvénients de la SA 15
1.3.3.3 Étendue d'utilisation de la SA 16
1.3.4 Autres solutions utilisées 17
1.4 Techniques de fixation utilisées 18
1.4.1 Fixation par perfusion ou par immersion 18
1.4.1.1 Fixation ex situ 18
1.4.1.2 Fixation in situ 19
1.5 Considérer le délai post-mortem dans la fixation du cerveau 21
2. L'histologie 22
2.1 Immunohistochimie 23
2.1.1 Protocoles de récupération des antigènes 24
2.1.1.1 Traitement par la chaleur 24
2.1.1.2 Traitement enzymatique 25
2.1.1.3 Traitement par dénaturation 25
2.1.2 Les protéines spécifiques des principales populations cellulaires 26
2.1.2.1 Neurones 27
2.1.2.2 Astrocytes 28
2.1.2.3 Microglie 29
2.1.2.4 Myéline 30
2.1.3 Protocole d'immunohistochimie 33
2.1.3.1 Utilisation d'anticorps primaires 33

2.1.3.2 Éléments utilisés pour l'IHC indirecte 34
2.1.3.3 Avantages et inconvénients des méthodes choisies 35
2.1.4 Immunofluorescence 35
2.2 Histochimie 37
2.2.1 Techniques et procédés 37
2.2.2 Marquage des corps cellulaires et cytoarchitecture 37
2.2.3 Marquage de la myéline et myéloarchitecture 39
2.2.4 Autres marquages 40
2.2.4.1 Colorations à l'argent 40
2.2.4.2 Colorations de fer 41
2.3 Impact de la fixation sur l'histologie 42
2.3.1 Impact sur les différents types de colorations 42
2.3.2 Études qui utilisent la SSS ou la SA en histologie 43
3. L'imagerie par résonance magnétique 44
3.1 Concepts généraux 44
3.1.1 Phénomènes physiques de la résonance magnétique 44
3.1.2 Les appareils d'IRM et le concept de Tesla 46
3.2 Comment classifier les séquences d'IRM? 47
3.2.1 L'IRM qualitative – les séquences pondérées 48
3.2.1.1 Types de stimulation pour créer des images pondérées 49
3.2.1.2 Séquences pondérées T1 et T2 utilisées 50
3.2.2 L'IRM semi-quantitative 51
3.2.3 L'IRM quantitative 52
3.3 L'IRM du cerveau *ex vivo* 53

3.3.1 Avantages et inconvénients en relation à l'IRM *in vivo* 53

3.3.2 IRM du cerveau *in situ* 56

3.3.3 IRM du cerveau *ex situ* 57

4. Recalage des images 59

4.1 Méthodologie et classification du recalage 59

1. Modalités impliquées 60

2. Sujets 60

3. Objets 61

4. Dimension 61

4.1 Spatiale 61

4.1.1 Basé sur la surface (2D) 62

4.1.2 Basé sur le volume (3D) 62

4.2 Temporelle 62

5. Nature de la transformation (types de recalage) 63

6. Domaine de transformation 64

6.1 Global, ou plus communément appelé recalage linéaire 64

6.2 Local, ou plus communément appelé recalage non-linéaire 64

7. Base de la transformation 66

7.1 Repères extrinsèques 66

7.2 Repères intrinsèques 66

7.2.1 Géométriques et anatomiques 66

7.2.2 Basés sur la segmentation 67

7.2.3 Par intensité de pixels ou de voxels 67

8. Interaction 69

9. Procédure d'optimisation 70

4.2 Recalage entre l'IRM et l'histologie du cerveau 70
4.2.1 Approches et méthodologies de recalage utilisées 71
4.2.1.1 Recalage de l'histologie vers le bloc de tissu 72
4.2.1.2 Reconstruction des coupes histologiques en un volume 72
4.2.1.3 Traitement de l'IRM 74
4.2.2 Applications dans la recherche en neurosciences 75
4.2.2.1 La neuropathologie 75
4.2.2.2 Les atlas multimodaux 76
Chapitre 2 – Article 1 – Antigenicity is preserved with fixative solutions used in human gross anatomy: A mice brain immunohistochemistry study 79
2.1 Préface 79
2.1.1 Contribution des auteurs 79
2.1.2 Contribution scientifique 80
2.2 Abstract 80
2.3 Introduction 81
2.4 Methods 83
2.4.1 Population 83
2.4.2 Fixation procedure 84
2.4.3 Histology processing 84
2.4.4 Variables of interest 85
2.4.4.1 Perfusion quality 86
2.4.4.2 Ease of manipulation 86
2.4.4.3 Tissue quality 87
2.4.4.4 Antigenicity preservation 88

2.4.4.5 Immunohistochemistry quality 88
2.4.5 Microscopy 89
2.4.6 Statistical analyses 90
2.4.7 Immunofluorescence staining 90
2.4.7.1 Histology processing 90
2.4.7.2 Microscopy and analysis 90
2.4.7.3 Antigenicity preservation 91
2.4.7.4 Auto-fluorescence 91
2.4.7.5 Tissue quality 91
2.5 Results 91
2.5.1 Perfusion quality 91
2.5.2 Ease of manipulation 92
2.5.3 Tissue quality 93
2.5.4 Antigenicity preservation 93
2.5.5 Immunohistochemistry quality 94
2.5.6 Immunofluorescence staining 96
2.5.6.1 Antigenicity preservation 96
2.5.6.2 Auto-fluorescence 96
2.5.6.3 Tissue quality 97
2.6 Discussion 98
2.6.1 Perfusion quality 98
2.6.2 Ease of manipulation 99
2.6.3 Tissue quality 100
2.6.4 Antigenicity preservation 100

2.6.5 Immunohistochemistry quality 101
2.6.7 Immunofluorescence staining 102
2.6.8 Study limits 102
2.6.9 Relevance for human tissue analysis 103
2.6.10 Conclusion 104
2.6.11 Acknowledgements 105
2.7 References 105
Chapitre 3 – Article 2 – Comparison of histological procedures and antigenicity of human post-mortem brains fixed with solutions used in gross anatomy laboratories. 112
3.1 Préface 112
3.1.1 Contribution des auteurs 112
3.1.2 Contribution scientifique 113
3.2 Abstract 113
3.3 Introduction 114
3.4 Methods 117
3.4.1 Population 117
3.4.2 Fixation procedure 118
3.4.3 Histology processing 119
3.4.4 Immunohistochemistry 119
3.4.5 Histochemical stains 120
3.4.5.1 Cresyl violet 120
3.4.5.2 Luxol fast blue 121
3.4.5.3 Prussian blue 121
3.4.5.4 Bielchowsky silver stain 121

3.4.6 Variables of interest 122
3.4.6.1 Ease of manipulation 122
3.4.6.2 Tissue quality 122
3.4.6.3 Antigenicity preservation 123
3.4.6.4 Histochemical stains' quality 124
3.4.7 Confounding variables 128
3.4.7.1 Post-mortem interval 128
3.4.7.2 Histology processing delay 128
3.4.8 Statistical analyses 129
3.5 Results 129
3.5.1 Ease of manipulation 129
3.5.2 Tissue quality 130
3.5.3 Antigenicity preservation 131
3.5.4 Histochemical stains 134
3.5.5 Confounding variables 136
3.5.5.1 Post-mortem interval 136
3.5.5.2 Histology processing delay 137
3.6 Discussion 139
3.6.1 Ease of manipulation 139
3.6.2 Tissue quality 139
3.6.3 Antigenicity preservation 140
3.6.4 Histochemical stains 140
3.6.5 Confounding variables 141
3.6.6 Anatomy laboratory's fixatives 142

3.6.6.1 Salt saturated solution 142
3.6.6.2 Alcohol-formaldehyde solution 143
3.6.6.3 Neutral-buffered formalin 144
3.6.7 Study limitations 144
3.6.8 Conclusion 145
3.6.9 Acknowledgements 146
3.7 Supplementary material 146
3.8 References 150
3.9 Résultats supplémentaires 162
Chapitre 4 – Article 3 – Histology to MRI registration quality of *ex vivo* human brain blocks fixed with solutions used in anatomy laboratories 166
4.1 Préface 166
4.1.1 Contribution des auteurs 166
4.1.2 Contribution scientifique 167
4.2 Abstract 167
4.3 Introduction 168
4.4 Methods 169
4.4.1 Population 169
4.4.2 Magnetic resonance imaging protocol 170
4.4.3 Histology procedures 171
4.4.3.1 Sectioning and mounting 171
4.4.3.2 Immunohistochemistry 172
4.4.3.3 Histochemistry stains 172
4.4.3.4 Imaging 172

4.4.4 Registration 172
4.4.5 Variables of interest 173
4.4.5.1 Histology quality | Staining intensity 173
4.4.5.2 Histology quality | Gray matter to white matter contrast 173
4.4.5.3 Registration quality | Number of tags 174
4.4.5.4 Registration quality | Tissue block-MRI-histology colocalization 175
4.4.6 Statistical analysis 177
4.5 Results 177
4.5.1 Histology quality 177
4.5.1.1 Staining intensity 177
4.5.1.2 Gray matter to white matter contrast 178
4.5.2 Registration quality 179
4.5.2.1 Number of tags 179
4.5.2.2 Tissue block-MRI-histology colocalization 180
4.6 Discussion 182
4.6.1 Histology quality 182
4.6.1.1 Staining intensity 182
4.6.1.2 Gray matter to white matter contrast 183
4.6.2 Registration quality 183
4.6.3 Groups of comparison 184
4.6.3.1 Fixatives 184
4.6.3.2 Staining type 185
4.6.4 Limitations 186
4.6.5 Conclusion 187

4.7 Supplementary material 188
4.8 References 189
4.9 Résultats préliminaires supplémentaires 198
Chapitre 5 – Article 4 – Comparison of T1- and T2-weighted MRI contrasts of *ex vivo ex situ* brains fixed with solutions used in gross anatomy laboratories 201
5.1 Préface 201
5.1.1 Contribution des auteurs 201
5.1.2 Contribution scientifique 202
5.2 Abstract 202
5.3 Introduction 203
5.4 Methods 204
5.4.1 Population 204
5.4.2 Imaging protocol 205
5.4.3 Image processing 206
5.4.4 Variables of interest 206
5.4.5 Statistical analysis 208
5.5 Results 209
5.5.1 Qualitative assessment 209
5.5.2 Quantitative assessment 213
5.6 Discussion 217
5.6.1 Voxel-wise intensity ratios 221
5.6.2 Limitations 223
5.6.3 Conclusion 223
5.6.4 Acknowledgements 224

5.7 Supplementary material 224
5.8 References 227
Chapitre 6 – Article 5 – Courte communication – T1- and T2-weighted MRI signal and histology findings in suboptimally fixed human brains 232
6.1 Préface 232
6.1.1 Contribution des auteurs 233
6.1.2 Contribution scientifique 233
6.2 Abstract 233
6.3 Introduction 234
6.4 Case description 236
6.5 Discussion 241
6.5.1 Acknowledgements 245
6.6 References 245
Chapitre 7 – Discussion globale 247
7.1 Méthodes de fixation et populations étudiées 247
7.1.1 Solutions de fixation utilisées et comparaison des résultats obtenus 247
7.1.2 Méthodes de fixation utilisées 251
7.2 L'histologie 253
7.2.1 Souris vs humains 253
7.2.2 Impacts de la fixation 254
7.2.2.1 Qualité du tissu 255
7.2.2.2 Préservation de l'antigénicité 255
7.2.2.3 Qualité de l'IHC 257
7.2.2.4 Qualité de l'HC 259

7.2.3 Conclusions générales 261
7.3 L'imagerie par résonance magnétique 261
7.3.1 Scans des blocs 261
7.3.2 Scan *ex situ* 263
7.3.3 Scan *in situ* 264
7.3.4 Conclusions générales 266
7.4 Limitations générales 266
7.5 Prochaines avenues des projets de cette thèse 267
7.6 Conclusions globales 268
Références bibliographiques 273

Liste des tableaux

Tableaux qui sont présentés dans les textes de cette thèse :

Tableau 1. – Concentration des composantes chimiques des solutions de fixation utilisées 9

Tableau 2. – Présentation des anticorps et des produits utilisés pour les protocoles d'IHC. 34

Tableaux qui sont présentés dans les manuscrits :

Chapitre 2

Table 1. Mice Data

Table 2. Fixatives components

Table 3. Immunohistochemistry antibodies

Table 4. Immunofluorescence antibodies

Chapitre 3

Table 1. Specimen data

Table 2. Fixative's components

Table 3. Immunohistochemical antibodies

Supplemental Table 1. Scores and data assessment for all variables of interest

Chapitre 4

Table 1. Characteristics of the specimens included in this study

Chapitre 5

Table 1. Demographic variables of the processed hemispheres

Table 2. Regions of interest for quantitative analysis

Table 3. GM-WM mean intensity ratios of each region in T1w and T2w images

Supplemental Table 1. Mean intensities of each of the ROIs of T1w images

Supplemental Table 2. Mean intensities of each of the ROIs of T2w images

Chapitre 6

Table 1. Demographic and fixation procedures

Table 2. Affected regions on MRI according to the blood clots in major brain vessels

Liste des figures

Figures qui sont présentées dans les textes de cette thèse :

Figure 1. – Formation de liens covalents après dénaturation d'une protéine qui a changé de conformation. 8

Figure 2. – Perfusion *ex situ* du cerveau, par l'injection avec une pompe de la solution de fixation dans des cathéters attachés à la vascularisation postérieure en bleu (artères vertébrales) et la vascularisation antérieure en rouge (artères carotides internes). Figure adaptée de Hade et al., 2024. 19

Figure 3. – Procédés de récupération des antigènes A) par induction de chaleur ou B) par un complexe enzymatique, lorsque des liens covalents (*cross-linking*, lignes noires) ont été créés entre deux protéines par leur changement de conformation dû à la fixation chimique. Figure adaptée de BioGenex. 26

Figure 4. – Nombre de publications associées aux protéines cibles des principales populations cellulaires selon PubMed. A) *Neuronal Nuclei* (NeuN). B) *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP). C) *Ionized calcium binding adaptor molecule 1* (Iba1). D) *Proteolipid protein* (PLP). 32

Figure 5. – Conformation des protéines de NeuN, GFAP, Iba1 et PLP. Figure adaptée de proteinatlas.org (*The Human Protein Atlas*). 32

Figure 6. – Organisation du cortex cérébral selon la densité et la forme des corps cellulaires (cytoarchitecture) et la densité et l'arrangement des axones myélinisés (myéloarchitecture). Figure adaptée de Palomero-Gallagher et Zilles, 2019. 40

Figure 7. – Interactions entre l'ORF et les protons dans le champ magnétique pour la création des phénomènes de relaxation. A) Perturbation de l'état d'équilibre par une ORF et phénomène de relaxation lors de l'arrêt de l'ORF. B) Relaxation longitudinale C) Temps requis pour la relaxation longitudinale. D) Relaxation transversale. E) Temps requis pour la relaxation transversale. Figure adaptée de Kastler and Vetter, 2011, Elsevier Masson. 46

Figure 8. – Contrastes de gris entre la matière blanche, la matière grise et le liquide céphalorachidien dans différentes séquences pondérées. A) Séquence pondérée en T1. B) Séquence pondérée en T2. Figure adaptée de Kastler and Vetter, 2011. 49

Figure 9. – Contrastes entre la matière blanche et la matière grise inversé dans les cerveaux post-mortem fixés avec formaldéhyde en séquence T1 pondérée. A) Figure 1 de Raman et al., 2017; B) Figure 3 de Yong-Hing et al., 2005; C) Figure 2 de Dadar et al., 2024. 56
Figure 10. – Domaines de recalage (global/linéaire ou local/non-linéaire) et nature de la transformation (rigide, affiné, de projection et en courbe/non-rigide) 2D-2D. Figure basée de Maintz and Viergever, 1998. 65
Figure 11. – Bases de la transformation selon des repères. Les repères peuvent être extrinsèques (A), comme lorsqu'une vitamine est introduite dans le scanneur (flèches rouges). Les repères peuvent être intrinsèques et basés sur le sujet (B), comme des repères géométriques ou anatomiques (étoiles jaunes et rouges). Les repères intrinsèques peuvent aussi être basés sur la segmentation de l'image (C) (lignes verte et cyan) ou sur l'intensité de l'image (D). La figure D a été adaptée de Abdel-Basset et al., 2017. 68
Figure 12. – Graphique à barres du nombre d'études publiées dans PubMed qui incluent comme mot clé « image registration » dans les 20 dernières années. 78
Figure 13. – Photomicrographies (20X) de la qualité de l'IF évaluée par trois variables; le degré de préservation des antigènes (A-D), l'intensité de l'arrière-plan (E-H) et l'intensité de l'AF des cellules (I-L). Préservation des antigènes A) Absente=0; B) Cellules isolées=1; C) Hétérogène (en *patch*)=2, où les flèches rouges indiquent un astrocyte; D) Homogène=3. Intensité de l'arrière-plan E) Gris pâle=0; F) Gris=1; G) Gris foncé=2; H) Noir=3. Intensité de l'AF des cellules I) Cellules et granules présentes=0; J) Cellules présentes=1; K) Granules présentes=2; L) Aucune AF=3. Échelle=50μm. 163
Figure 14. – Distribution des antigènes (NeuN et GFAP) selon les trois solutions de fixation après un protocole d'HIAR. 164
Figure 15. – Degré d'AF de l'arrière-plan (gauche) et des cellules (droite) selon le traitement au $NaBH_4$ ou au *sudan black* appliqué. Les variables ont été comparées par solution de fixation et par longueur d'ondes. ↓ Significatif avant la correction de Bonferroni; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; ***$p<0.001$ après la correction de Bonferroni. Les neurones sont visibles dans la longueur d'onde 488nm, les astrocytes dans la longueur d'onde 555nm et rien n'est marqué dans la longueur

d'onde 647nm (donc techniquement, devrait être exempt de marquage et montrer un arrière-plan complètement noir des coupes). 165
Figure 16. – Processus de recalage entre l'IRM et l'histologie. A) Séquence T2-pondérée d'un hémisphère scanné *ex situ* avec un scanneur 3T. B) Recalage de l'IRM du bloc 7T vers l'IRM 3T, et de l'histologie à l'IRM 7T. C) Colocalisation des cellules de la myéline (PLP) et des corps cellulaires neuronaux (NeuN). Figure tirée de la demande de bourse post-doctorale #361834 au FRQS octroyée avec un DOI https://doi.org/10.69777/361834. 199
Figure 17. – Processus de recalage entre l'histologie et l'IRM. A) Lésions de HMB visibles sur la séquence T2-pondérée d'un scan d'un hémisphère cérébral droit. B) Coupe du bloc de tissu périventriculaire de la corne frontale du ventricule latéral et acquisition de l'IRM 7T à ultra-haute résolution. C) Coupe de bloc au vibratome et colorations histologiques afin de marquer les différentes cellules d'intérêt. D) Recalage entre l'IRM et l'histologie. Figure tirée de la demande de bourse post-doctorale #361834 au FRQS octroyée avec un DOI https://doi.org/10.69777/361834. 199
Figure 18. – Colocalisation entre l'hyperintensité de la matière blanche et des régions ponctiformes hypointenses qui représentent l'accumulation d'hémosidérine observée par histologie. A) HMB observées sur une séquence T2*.VL=Ventricule latéral; TNC=Tête du noyau caudé; CI=Capsule interne. B) Image de coloration de PB recalée à l'IRM, qui marque les noyaux cellulaires en rose et le l'hémosidérine du fer en bleu. C) Superposition des deux modalités et colocalisation des amas de fer. 200

Figures qui sont présentées dans les manuscrits :

Chapitre 2

Figure 1. Photomicrographs of the different categorical variables that were assessed.
Figure 2. Bar charts of the perfusion quality.
Figure 3. Bar charts of the ease of manipulation.
Figure 4. Bar charts of the tissue quality.
Figure 5. Photomicrographs (40X) of the different antigens of brain samples fixed with three different solutions.

Figure 6. Bar charts of the immunolabeling quality.
Figure 7. Immunofluorescence antigenicity.
Figure 8. Tissue integrity of the immunofluorescence processed slices.

Chapitre 3

Figure 1. Photomicrographs of different criteria of the IHC categorical variables that were assessed.
Figure 2. Photomicrographs of different criteria of the histochemical stains' categorical variables that were assessed.
Figure 3. Bar charts of the ease of manipulation of the tissue.
Figure 4. Bar charts of the tissue quality.
Figure 5. Antigenicity preservation and cellular distribution of the four main brain cell populations.
Figure 6. Before and after an antigen retrieval protocol in sections that showed poor antigenicity preservation.
Figure 7. Bar charts of the quality of the histochemical stains.
Figure 8. Quality of the histochemical stains.
Supplemental Figure 1. Scatter dot plots of the variables of interest in relation to the PMI as a continuous variable.
Supplemental Figure 2. Scatter dot plots of the variables of interest in relation to the HD as a continuous variable.

Chapitre 4

Figure 1. Criteria for assessment of the histology quality variable.
Figure 2. Process of the manual registration using landmarks.
Figure 3. Masks created using Display to assess histology-MRI colocalization.
Figure 4. Overlap of the masks segmented to assess the amount of histology tissue colocalizing with MRI scans.
Figure 5. Histology quality of the sections regarding staining intensity and gray to white matter (GM-WM) contrast.
Figure 6. Number of tags necessary to register the sections.

Figure 7. Tissue block-MRI-histology overlap of the masks to assess colocalization.

Chapitre 5

Figure 1. Visual assessment of the qualitative variables of interest.

Figure 2. Qualitative assessment of the inverted contrast on T1w images.

Figure 3. Qualitative assessment of the cGM-WM sharpness in relation to the fixative solution.

Figure 4. Qualitative assessment of the gray matter to white matter contrast sharpness in relation to the fixation delay.

Figure 5. Qualitative assessment of the gray matter to white matter contrast in co-registered T1w and T2w images of all specimens.

Figure 6. GM and WM T1w intensity ratios for each region of interest.

Figure 7. GM and WM T2w intensity ratios for each region of interest.

Supplemental figure 1. Quantitative assessment of the mean intensity in each ROI group in relation the fixative.

Supplemental figure 2. Quantitative assessment of the difference of the ratios with 1 (i.e., GM-WM ratio value minus 1) to reflect the GM-WM contrast.

Supplemental figure 3. Longitudinal assessment of the GM-WM contrast of an *in situ* brain fixed by perfusion with NBF.

Chapitre 6

Figure 1. MRI contrast when the fixation is suboptimal (Cases 1-5) compared to a well AFS-fixed brain (Case 6).

Figure 2. Macroscopic visual inspection of the Case 2.

Figure 3. Histology quality of poorly fixed regions (based on MRI loss of GM-WM contrast of Case 4 and 5), before and after post-fixation in NBF, compared with well-fixed tissue (Case 6).

Liste des sigles et abréviations

2D = Deux dimensions ; 3D = Trois dimensions ; c.-à-d.= c'est-à-dire ; AF = Autofluorescence ; B_0 = Champ magnétique ; CV = Crésyl violet ; DAB = Diaminobenzidine ; DBCBB = *Douglas-Bell Canada brain bank* ; DP = Densité protonique ; DPM = Délai post-mortem ; DWI = *Diffusion-weighted imaging* ; E_1 = Niveau de basse énergie ; E_2 = Niveau d'énergie élevé ; EIAR = *Enzymatic-induced antigen retrieval* ; FA = *Flip angle* ; FLAIR = *Fluid-attenuated Inversion recovery* ; GFAP = *Glial fibrillary acidic protein* ; GRE = *Gradient echo* ; HIAR = *Heat-induced antigen retrieval* ; HMB = Hyperintensités de la matière blanche ; HC = Histochimie ; HRP = *Horseradish peroxidase* ; Iba1 = *Ionized-calcium binding adaptor molecule 1* ; IF = Immunofluorescence ; IgG = Immunoglobuline de type G ; IHC = Immunohistochimie ; IRM = Imagerie par résonance magnétique ; LCR = Liquide céphalo-rachidien ; LFB = *Luxol fast blue* ; MB = Matière blanche ; MG = Matière grise ; min = minute ; ml = millilitres ; MO = Microorganismes ; MPRAGE = *Magnetization-prepared rapid gradient echo* ; MTR = *Magnetization Transfer ratio* ; ms = millisecondes ; NeuN = *Neuronal Nuclei* ; ORF = Ondes de radiofréquences ; PAF = Paraformaldéhyde ; PB = *Prussian blue* ; PBS = *Phosphate buffer saline* ; p.ex. = par exemple ; PLP = *Proteolipid protein* ; QSM = *Quantitative susceptibility mapping* ; RA = Récupération des antigènes ; RER = réticulums endoplasmiques rugueux ; **SA = Solution d'alcools** ; SDS = Sodium dodécyl sulfate ; SE = *Spin echo* ; **SFA = Solution de formaldéhyde** ; **SSS = Solution de sel saturé** ; SWI = *Susceptibility-weighted imaging* ; T = Tesla ; T1 = Temps 1 (relaxation longitudinale) ; T2 = Temps 2 (relaxation transversale) ; TE = Temps d'echo ; TI = Temps d'inversion ; TR = Temps de répétition ; UQTR = Université du Québec à Trois-Rivières

L'information n'est pas la connaissance

-Albert Einstein

Remerciements

La réalisation de ce PhD n'aurait pas été possible sans la contribution de plusieurs personnes à qui je souhaite adresser ma reconnaissance.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, Dre Josefina Maranzano, pour la confiance qu'elle m'a dédiée en la réalisation de ce projet et pour m'avoir soutenue, autant académiquement qu'émotionnellement, à travers toutes les étapes de ce doctorat. Sa patience, sa rigueur, sa spontanéité, son enthousiasme, son dévouement et sa disponibilité m'ont guidé durant les cinq dernières années à travailler avec elle. L'avoir comme collègue a été pour moi très agréable et la « cerise sur le sundae » de mon cheminement. Mon parcours au doctorat n'aurait pas été aussi motivant sans elle. Josefina, j'espère continuer à te côtoyer et collaborer avec toi. Ta mentalité, ton énergie et ta façon de faire font de toi une mentore exceptionnelle. À tous nos fous rires, merci.

Je souhaite aussi remercier mon co-directeur, Dr Denis Boire, sans qui la réalisation de ce projet n'aurait pas été possible. Sa grande expertise, sa patience et sa rigueur m'ont permis d'acquérir une rigueur ainsi que des connaissances scientifiques qui m'aideront à jamais dans ma carrière. Il est présent pour moi depuis le début de mon parcours universitaire et c'est grâce à lui que je suis rendue ici, aujourd'hui, et je lui en serai toujours reconnaissante. Maintenant, je te souhaite la plus belle retraite, très bien méritée!

A special thanks to my principal collaborators and mentors, Dre Mahsa Dadar and Dr Yashar Zeighami, who helped me through all the process, who welcomed me into their team and taught me pre-processing, softwares and MRI technologies. I owe them a lot of my expertise, and I want to express my gratitude to them for being as excited as we were to develop these projects. I also met several students from their lab who had a major impact on my path: Thanks guys for making my PhD a little more fun! Looking forward to working with you during my post-doc.

Mes plus sincères remerciements envers tous mes collègues de laboratoire que j'ai pu côtoyer, pour leur support et nos échanges tout au long de ces années. Un merci spécial surtout à Guillaume pour sa disponibilité et son aide à travers chacun nos cheminements de PhD. Je

voudrais également remercier mon collègue et ami Philippe pour sa disponibilité et son support depuis qu'il est arrivé au laboratoire. Son aide au niveau professionnel et personnel est inestimable et je lui en serai toujours reconnaissante. Je ne peux passer à côté de remercier Amy, qui a été d'une aide magistrale comme co-auteure et dans la réalisation de multitudes expériences, mais aussi comme amie. Mention spéciale également à Victoria et Jean Francois pour l'aide et la fraîcheur que vous avez apporté au lab. À vous tous, je vous souhaite le meilleur succès pour la suite, et sachez que je serai toujours là pour vous rendre la pareille. Merci guys!

Toute l'équipe de l'administration et professionnels du département d'anatomie de l'UQTR mérite également mes remerciements les plus distingués, pour leur aide au laboratoire et leur adaptation à nos idées farfelues. Je tiens aussi à remercier le personnel de l'animalerie, ainsi que les membres de l'équipe de l'Institut de Neurologie de Montréal (Université McGill) et du Centre de recherche Douglas pour leur collaboration dans l'élaboration des protocoles d'imagerie.

I would also like to acknowledge Dre Katrin Amunts who welcomed me in her team for a couple of months abroad at the Forschungszentrum Jülich, Germany. It was a very enriching experience, and I'm grateful that I have taken part in a major project with them. I would like to thank all the staff with whom I had the chance to work with at the Neuroscience and Medicine Institute. I'd especially like to express my gratitude to Dre Sabine Ruland for her help and training, as well as Nataliia and Ihsane for their help, support and friendship throughout.

Je n'oublie pas les membres de ma famille qui m'ont soutenue tout au long de mon parcours. Ils ont cru en moi et m'ont donné la chance d'effectuer des études supérieures avec un support incroyable, spécialement ma mère, ma fan #1. Mes remerciements s'adressent également à mon conjoint pour son énorme preuve de patience et de soutien. Tu as su m'aider à garder le focus et à me pousser vers le haut dans toutes les opportunités qui se sont prêtées à moi et dans toutes les étapes de mon parcours. Évidemment, je tiens aussi à remercier tous mes précieux amis pour leur soutien et encouragements inestimables depuis tout ce temps.

Ce projet n'aurait pas pu avoir lieu sans le soutien financier du Conseil de recherche en sciences naturelles et génie (CRSNG) qui m'a financé durant les trois premières années de mon doctorat (Alexander Graham-Bell), ainsi que le Réseau de Bio-imagerie du Québec et le département

d’anatomie de l’UQTR qui ont financé la dernière année. Les fonds de recherche du CRSNG de Dr Boire et de Dre Maranzano, ainsi que de Dre Mahsa Dadar ont également contribué à l’élaboration de ce projet.

Finalement, je ne peux passer à côté de remercier les défunts ainsi que leur famille, qui offrent généreusement leur corps à la science dans le cadre du programme de dons de corps du laboratoire d’anatomie. Sans leur générosité, mes projets de recherche n’auraient pu voir le jour, et je souhaitais donc terminer en démontrant mon immense gratitude envers leur décision ainsi que le support de leurs proches.

Introduction

Problématique de recherche

La recherche neuroscientifique humaine comporte plusieurs défis. L'un des plus importants est lié au fait que certaines méthodes utilisées en recherche peuvent être invasives pour des études du cerveau humain *in vivo*, alors que celles-ci doivent se faire de manière non invasive. Les technologies et méthodes disponibles pour la recherche *in vivo* sont donc limitées, puisque les méthodes d'imagerie couramment utilisée, comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM), ne permet pas de voir les caractéristiques cellulaires et moléculaires du cerveau (Alkemade et al., 2018). Le prélèvement de biopsies, qui permettrait d'étudier ces caractéristiques par l'histologie, ne sont pas permises sur les patients partenaires pour la recherche, puisque les risques sont plus élevés que les avantages. De ce fait, un grand nombre de changements qui se passent dans le cerveau en santé ou à cause de pathologies spécifiques demeurent encore inconnus ou impossibles à étudier pendant la vie des individus. Pour pallier les limites de la recherche *in vivo* sur le cerveau humain, les chercheurs développent des modèles animaux reproduisant des maladies humaines (Constantinescu et al., 2011). Cependant, les résultats obtenus à partir de ces modèles ne sont pas toujours transposables chez l'être humain (Azkona & Sanchez-Pernaute, 2022).

De ce fait, la recherche *ex vivo* (post-mortem) est primordiale pour étudier le cerveau humain de manière non invasive et invasive (Alkemade et al., 2018). La recherche *ex vivo* peut permettre, entre autres, de valider des diagnostics qui ont été émis avant la mort du patient (Braak et al., 2006). En effet, les diagnostics sont établis à travers le portrait clinique des patients et en observant des lésions par imagerie *in vivo* (p.ex., l'IRM), mais les lésions observées ne sont généralement pas suffisamment différenciées (ou pathognomoniques) entre les maladies neurodégénératives potentielles (Bobinski et al., 2000; Pietrzak et al., 2018; Post, 2008). De fait, c'est la neuropathologie qui permet de confirmer ces diagnostics en observant les changements cellulaires et moléculaires des lésions observées au préalable par imagerie *in vivo*. Les analyses neuropathologiques utilisent l'histologie, qui est considérée comme le *gold standard* en

neurosciences (Cardoso et al., 2014; den Bakker, 2017; Hoffmann et al., 2011) (Note : *gold standard* sera aussi appelé étalon-or ou référence standard tout au long de cette thèse). C'est ensuite grâce au recalage d'images (c.-à-d. par l'alignement de deux images en superposition) que les IRM peuvent être validés par l'histologie.

Pour réaliser ces analyses neuropathologiques, le tissu *ex vivo* est généralement fourni par des banques de cerveaux. Cependant, ces banques offrent peu d'échantillons aux chercheurs, qui sont préservés de façon standardisée avec une solution de formaldéhyde 4% (SFA) (Carlos et al., 2019; Dadar et al., 2024; Hulette, 2003; McFadden et al., 2019; Vonsattel et al., 2008). En revanche, les laboratoires d'anatomie disposent d'une grande quantité de cerveaux complets qui sont présentement inutilisés en recherche puisqu'ils sont préservés par perfusion du corps complet avec des solutions chimiques mieux adaptées à l'enseignement, la dissection, et les simulations chirurgicales qu'à l'étude neuropathologique (Coleman & Kogan, 1998; Kaliappan et al., 2023; Thiel, 1992). Ces solutions combinent différents composants chimiques pour former, p. ex., une solution de sel saturé (SSS) (Coleman & Kogan, 1998) ou une solution d'alcools (SA) (Benet et al., 2014), qui n'ont pas été préalablement validées comme efficaces pour des études neuroscientifiques.

Comme présenté précédemment, les modalités d'imagerie les plus utilisées en recherche neuroscientifique sont l'IRM et l'histologie, puisqu'elles permettent d'établir des corrélations entre une modalité d'imagerie qui s'applique *in vivo* et la référence standard qui permet d'observer la structure et les changements cellulaires et moléculaires associés (Hoffmann et al., 2011; Wisse et al., 2017). Cependant, on ne sait pas si ces deux modalités sont applicables sur du tissu humain *ex vivo* préservé avec des solutions de fixation utilisées dans les laboratoires d'anatomie humaine. Si la SSS et la SA préservent les cerveaux *ex vivo* de façon adéquate pour différents protocoles d'histologie et d'IRM, les laboratoires d'anatomie humaine pourraient devenir une ressource inestimable de tissu cérébral disponible aux chercheurs.

Objectifs et hypothèses

L'objectif global des présents travaux est donc de développer des protocoles d'histologie, d'IRM et de recalage entre ces deux modalités, dans des cerveaux fixés dans les laboratoires d'anatomie,

et de comparer leurs caractéristiques avec celles des cerveaux fixés avec la SFA, typique des banques de cerveaux. Cela permettra de définir s'ils sont préservés de manière satisfaisante pour être utilisés comme ressource pour la recherche neuroscientifique.

On pourrait s'attendre à ce que les cerveaux fixés dans les banques de cerveaux avec la SFA soient de qualité supérieure à ceux fixés dans les laboratoires d'anatomie avec une SSS ou une SA. Cette hypothèse générale est basée sur les concepts suivants :

1- la recherche du cerveau humain *ex vivo* qui se sert de l'histologie et l'IRM sont effectuées sur du tissu offert par les banques de cerveaux, fixés avec une SFA (Goubran et al., 2013; Humphreys et al., 2019; Roseborough et al., 2020);

2- le formaldéhyde est connu pour rendre le tissu cérébral plus ferme et donc facilement manipulable (McFadden et al., 2019; Weisbecker, 2011), ce qui est avantageux pour l'obtention des scans d'IRM avec une forme préservée (Dadar et al., 2024; Nagara et al., 1987) et la coupe subséquente du tissu pour faire l'histologie; et

3- même si la SFA augmente la formation de liens covalents des protéines (connus sous le nom de cross-linking en anglais) (Kiernan, 2000; McKenzie et al., 2024; Stumptner et al., 2019), ce qui nuit à la préservation de certains antigènes, l'utilisation de protocoles de récupération des antigènes (RA) bien établis démontrent une préservation moléculaire suffisante pour plusieurs antigènes importants pour la recherche en neurosciences (Evers et al., 1998; Shi et al., 2011).

Il est important de noter que notre intérêt pour les cerveaux fixés dans les laboratoires d'anatomie pour la recherche neuroscientifique n'a pas comme but de remplacer la SFA par une autre solution de fixation que l'on jugerait plus performante. Notre intérêt réside dans la compréhension des effets des solutions de fixation utilisées par les laboratoires d'anatomie humaine afin d'augmenter l'offre de cerveaux disponibles pour les chercheurs. Pour atteindre cet objectif général, plusieurs objectifs spécifiques ont été abordés par les études (toutes sous forme d'article) présentées dans cette thèse, qui ont été réalisées en utilisant trois groupes de comparaison : 1- cerveaux fixés avec la SFA (typique des banques de cerveaux), 2- cerveaux fixés avec la SSS et 3- cerveaux fixés avec la SA (2- et 3- utilisées par des laboratoires d'anatomie humaine).

L'objectif spécifique de l'étude 1 (chapitre 2) a été d'évaluer et comparer la qualité histologique et la préservation des antigènes par immunohistochimie (IHC) et immunofluorescence (IF) des cerveaux de souris, en évitant ainsi les variables confondantes retrouvées chez l'humain, telles que le délai post-mortem (DPM) (délai entre le décès du patient et l'injection de la solution de fixation), le sexe, l'âge, la cause de décès, etc.

Cette étude a permis d'établir les protocoles histologiques que nous avons appliqués pour atteindre l'objectif spécifique de l'étude 2 (chapitre 3), qui était d'évaluer la qualité histologique et la préservation des antigènes par IHC de petits blocs de tissus de cerveaux humains fixés avec les trois solutions. Nous avons aussi réalisé et évalué les caractéristiques des colorations histochimiques (HC) qui sont utilisées dans les protocoles d'histopathologie humaine.

L'étude 3 (chapitre 4) comporte deux objectifs spécifiques. Le premier a été d'évaluer les caractéristiques histologiques des gros blocs de tissus coupés au vibratome et qui pourraient influencer leur recalage aux scans d'IRM. Le deuxième a été d'évaluer la qualité du recalage des images d'IRM 7Tesla (7T) avec les images histologiques de ces blocs.

L'étude 4 (chapitre 5) a eu pour objectif d'évaluer les différences de contrastes de la matière blanche (MB) et de la matière grise (MG) de différentes régions et structures des hémisphères cérébraux fixés avec les trois solutions, utilisant des séquences d'IRM 3Tesla (3T), pondérées T1 et T2 (c.-à-d. les deux séquences d'IRM de base dans l'étude du cerveau normal et pathologique).

Finalement, la dernière étude présentée dans cette thèse (chapitre 6) est de type rapport de cas, et l'objectif spécifique a été de décrire les effets d'une fixation sous-optimale dans les séquences d'IRM 3T T1 et T2 pondérées, et les effets sur la qualité histologique avant et après la post-fixation des régions cérébrales sous-fixées.

Avant d'aborder les études qui constituent le cœur de cette thèse, le chapitre 1 présentera, sous forme d'une brève revue de la littérature, les domaines de connaissances liés à leurs objectifs et méthodes, c'est-à-dire la fixation des cerveaux, l'histologie de tissus cérébraux, la résonance magnétique et le recalage d'images d'histologie et d'IRM de cerveaux *ex vivo*.

Chapitre 1 – Revue de littérature

1. La fixation

1.1 Généralités et définitions

Il y a plus de 3000 ans, nos ancêtres ont voulu freiner la décomposition des cadavres, par la momification, la cryopréservation, l'éviscération ou l'enterrement (p.ex., avec des herbes, huiles, épices, résines, etc.) pour "préserver la vie après la mort" (Balta, Cronin, et al., 2015; Brenner, 2014; Jones, 1997; Mayer, 2011; Weiglein, 2002). Par ailleurs, l'embaumement est une technique qui consiste à préserver le corps des défunts dans des contextes funéraires par des traitements chimiques spécifiques[1].

De cette idée est née l'embaumement à des fins scientifiques, qui consiste à perfuser le cadavre à l'aide d'une solution chimique (Brenner, 2014). La perfusion d'une solution de fixation (c.-à-d., mélange de plusieurs produits chimiques), ou d'un fixateur (c.-à-d., un seul produit chimique spécifique) à travers le système cardiovasculaire du défunt (généralement par les artères carotides communes ou les artères fémorales), permet de distribuer la solution à travers tout le corps. La solution de fixation ou le fixateur agissent pour prévenir la décomposition du corps. En plus, les fixateurs éliminent les microorganismes (MO) qui pourraient être une source d'infections pour les personnes en contact avec les corps fixés (Balta, Cronin, et al., 2015; Bradbury & Hoshino, 1978; Shoja et al., 2013; Woodburne & Lawrence, 1952).

Dans le milieu universitaire, les cadavres qui proviennent des programmes de dons de corps sont principalement utilisés pour l'enseignement de l'anatomie ou de techniques chirurgicales, et secondairement pour la recherche (Benninger et al., 2014; Feigl & Sammer, 2022; Mohebimoushaei et al., 2025). Ces pratiques requièrent une quantité élevée de matériel anatomique, qui doit être bien préservé (Balta et al., 2022; Eisma & Wilkinson, 2014; Noël et al., 2021; Noël et al., 2022). Par exemple, dans le laboratoire d'anatomie de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), on reçoit une moyenne de 84 corps par année, dédiés à la dissection du

[1] https://www.cooperativefuneraire.ca/embaumement.

corps complet, aux pratiques chirurgicales, aux démonstrations et aux formations continues des programmes de médecine, de médecine podiatrique, de physiothérapie, de chiropratique, de sciences infirmières, d'ergothérapie, des sciences biomédicales et des sciences de l'activité physique. Au Québec, le laboratoire d'anatomie de l'Université McGill reçoit environ 80 à 100 corps par année, majoritairement destinés aux programmes de médecine et de médecine dentaire[2].

Le produit chimique le plus utilisé pour l'embaumement et la fixation des cadavres humains et animaux depuis 1868, est le formaldéhyde, pour ses propriétés antibactériennes et sa capacité à ralentir la décomposition (Brenner, 2014; Fox et al., 1985; Musiał et al., 2016). Toutefois, après des années de recherche, les scientifiques s'entendent pour dire que le formaldéhyde n'est pas le fixateur idéal pour embaumer les corps utilisés en anatomie (Balta, Cronin, et al., 2015; Balta, Twomey, et al., 2019; Kaliappan et al., 2023). En effet, cette fixation dite "hard-fixed" que l'on nommera "fixation dure" altère la représentation des organes vivants, puisqu'elle produit un rétrécissement du tissu et des changements de couleurs, diminue la flexibilité des articulations et entraîne la rigidité des tissus (Balta, Cronin, et al., 2015; Balta, Twomey, et al., 2019; Gulati et al., 2020; Hammer et al., 2011; Mouritzen Dam, 1979; Weisbecker, 2011). De plus, les vapeurs qui émanent des corps embaumés avec du formaldéhyde peuvent entraîner des problèmes de santé chez les usagers, comme une irritation de la peau, des yeux et du système respiratoire, des maux de tête, et même des cancers (Balta, Cronin, et al., 2015; Brenner, 2014; Fisher, 1905; Frølich et al., 1984; Hubbell et al., 2002; Musiał et al., 2016; Raja & Sultana, 2012; Tolhurst & Hart, 1990).

Pour contourner les problèmes engendrés par le formaldéhyde, les anatomistes ont développé de nouvelles solutions de fixation, qui sont mieux adaptées à l'enseignement, notamment des solutions qui: 1- préservent la couleur, la texture et la flexibilité des corps embaumés plus proches de celles des cadavres frais; 2- contiennent des produits chimiques relativement peu coûteux et non-toxiques; 3- désinfectent et éliminent la croissance de MO pour limiter la décomposition le plus longtemps possible; 4- conservent la qualité des éléments cellulaires et biochimiques des tissus de l'organisme; et 5- sont versatiles (utilisation sur plusieurs tissus ou le corps complet,

[2] https://mcgillnews.mcgill.ca/fr/un-don-sans-equivalent/

autant chez les humains que d'autres espèces animales) (Balta, Cronin, et al., 2015; Brenner, 2014; Coleman & Kogan, 1998; Eltoum et al., 2001; Souchon, 1908). C'est en développant des solutions dites "soft preservation techniques", que l'on nommera "fixation souple", que les anatomistes se sont le plus rapprochés de ces critères et que les corps peuvent maintenant être exploités au maximum (Balta, Twomey, et al., 2019; Brenner, 2014; Kaliappan et al., 2023; Venne et al., 2020).

1.2 Principes de la fixation chimique

Il faut noter que juste avant l'injection d'une solution de fixation, les anatomistes procèdent parfois à une étape de préfixation qui consiste à injecter une solution tamponnée, de la solution saline, et/ou une solution de nettoyage, de lubrification et de déblocage (appelés agents modifiants) dans les vaisseaux sanguins (Eltoum et al., 2001; Insausti et al., 2023; McFadden et al., 2019). Cela permet de retirer le sang et les caillots sanguins, permettant au fixateur de circuler à travers le système cardiovasculaire, pour ainsi se distribuer dans tous les tissus de façon homogène (Böhm, 1983; de Oliveira et al., 2012; McFadden et al., 2019).

Vient ensuite l'injection de la solution de fixation, où plusieurs types de produits chimiques sont combinés, puisque chacun a des propriétés différentes. Ils sont divisés en 6 groupes: 1- Fixateurs; 2- Désinfectants; 3- Agents modifiants (c.-à-d., tampons, anticoagulants, surfactants, humectants); 4- Colorants; 5- Agents de parfum; et 6- Diluants (Eltoum et al., 2001; Mayer, 2011). Dans les sections qui suivent, on traitera des fixateurs en détails, puisqu'ils ont une implication importante dans les changements cellulaires et moléculaires des tissus. Les autres types de produits chimiques présentés ici ne seront pas abordés individuellement, mais seront présentés lorsqu'ils sont ajoutés dans les différentes solutions de fixation.

La fonction d'un fixateur est de minimiser la destruction des macromolécules. Le fixateur empêche la cellule d'entrer en phase de nécrose et la maintient telle qu'elle est en phase d'oncose (phénomène de mort cellulaire irrégulier où l'ischémie mène à la perte d'ATP et d'activité ionique et donc la perte de molécules, mais où la morphométrie cellulaire est encore intacte) (Krassner et al., 2023). De plus, il va détruire les MO et les agents infectieux (Eltoum et al., 2001).

Les fixateurs peuvent avoir trois mécanismes d'action différents:

1- la formation de liens covalents entre les protéines (*cross-linking*), ce qui change leur conformation tertiaire et/ou quaternaire, les fixe dans un état ou structure précise, et empêche les MO de s'infiltrer (p.ex. les aldéhydes, comme le formaldéhyde et le glutaraldéhyde) (Eltoum et al., 2001; Sewell et al., 1984). Cela réduit l'exposition d'épitopes des protéines, affectant l'antigénicité, ce qui rend l'utilisation des tissus difficile pour la recherche (Figure 1) (Birkl et al., 2016; Dawe et al., 2009; Eltoum et al., 2001; Im et al., 2019; Puchtler & Meloan, 1985; van Essen et al., 2010).

2- la précipitation et la coagulation des protéines en retirant l'eau libre des tissus (p.ex. par des produits déshydratants), ce qui entraîne l'agglomération des protéines ensemble et détermine ainsi la perte de leur structure tridimensionnelle[3]. Différents types d'alcools, tels que l'éthanol, le méthanol, le phénol, etc. ont ce mécanisme d'action;

3- la dénaturation des protéines, par le changement de leur structure tridimensionnelle par la perturbation de leurs liaisons faibles (hydrogène, ioniques, hydrophobes) en changeant le pH ou la charge ionique, ou via la formation de sels (p.ex. l'acide picrique, l'acide acétique, et l'acétate de zinc) (Eltoum et al., 2001).

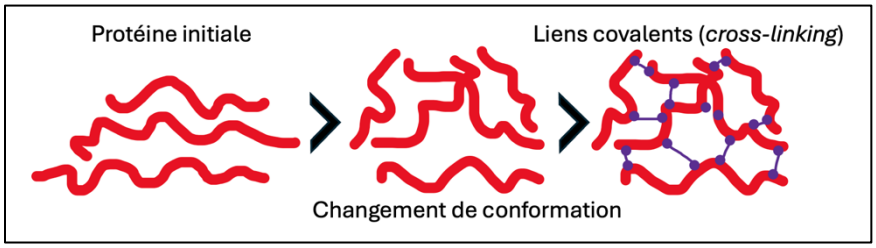


Figure 1. – Formation de liens covalents après dénaturation d'une protéine qui a changé de conformation.

[3]https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/protein-denaturation#:~:text=Denaturation%20may%20be%20defined%20as,lead%20primarily%20to%20protein%20denaturation.

1.3 Les types de solutions de fixation

Dans le présent projet, une SFA couramment employée dans les banques de cerveaux (Carlos et al., 2019; Dadar et al., 2024; Hulette, 2003; McFadden et al., 2019; Sheedy et al., 2008; Vonsattel et al., 2008) a été utilisée comme fixateur de nos groupes contrôles, étant donné que les effets de la SFA sur les cerveaux sont bien répertoriés. Deux autres solutions utilisées dans les laboratoires d'anatomie ont été comparées, c'est-à-dire une SSS (Coleman & Kogan, 1998) et une SA, dont la formulation est propre au laboratoire de l'UQTR. Les trois solutions sont dites "à base de formaldéhyde", car elles en contiennent toutes, à différentes concentrations. Il est à noter qu'une solution est considérée de « fixation souple » lorsque sa formulation ne contient pas, ou en faible concentration, de formaldéhyde (généralement moins de 1%) (Kaliappan et al., 2023). De ce fait, la SSS est considérée de « fixation souple », alors que la SA de l'UQTR est considérée comme « fixation dure ». Les concentrations des produits de la SA varient entre les laboratoires, alors elle peut être considérée comme « fixation souple » lorsque la concentration de formaldéhyde est diminuée dans sa formulation (Benet et al., 2014). Le tableau 1 détaille la composition des trois solutions utilisées dans le laboratoire de l'UQTR et dans le présent projet de recherche:

Tableau 1. – Concentration des composantes chimiques des solutions de fixation utilisées

Solutions	**Formaldéhyde (SFA)**	**Solution de sel saturé (SSS)**	**Solution d'alcools (SA)**
Composantes chimiques	Formaldéhyde 4% Tampon phosphate 0.1M	Formaldéhyde 0.8% NaCl 36% Phénol 0.72% Glycérol 2% Alcool isopropylique 16% Dettol® 2.5%	Formaldéhyde 1.4% Éthanol 69% Phénol 1.9% Glycérol 20.9% Acétate de sodium 0.006% Dettol® 2.8%

1.3.1 Solution de formaldéhyde (SFA)

1.3.1.1 Mécanisme d'action de la SFA

Le formaldéhyde (CH_2O, où CHO est un groupe aldéhyde) est un produit chimique de catégorie 1 (un fixateur) des solutions de fixation. Il peut être sous plusieurs formes et en différentes concentrations. Le formaldéhyde est un gaz qui atteindra un équilibre chimique pour se

polymériser vers sa forme solide de stockage, le paraformaldéhyde (PAF) (Kiernan, 2000). Dans l'eau, le groupe aldéhyde se dissout et forme de l'hydrate de méthyl qui se polymérise pour former la formaline. La formaline est la forme de formaldéhyde aqueuse à laquelle est parfois ajoutée une faible quantité (10%) de méthanol, qui réagit avec le polymère de méthylène hydrate, ce qui maintient le formaldéhyde dépolymérisé et empêche sa précipitation (Eltoum et al., 2001; Kiernan, 2000; Singer, 1963; Thavarajah et al., 2012). Il est à noter que la fabrication de la SFA peut se faire de deux manières, qui sont souvent interchangées dans la littérature : soit par la dissolution du paraformaldéhyde dans une solution tampon, où les chercheurs vont généralement parler d'une solution de PAF, ou bien par la dilution du formaldéhyde en formaline, qui est la solution aqueuse commercialisée (Kiernan, 2000). La solution la plus concentrée de formaldéhyde commercialisée est de 37%. La SFA la plus commune, utilisée dans les banques de cerveaux, est une solution de formaline 10% (formaldéhyde commercial dilué à 1:10), qui contient 3.7% de formaldéhyde dans une solution tamponnée (généralement un tampon phosphate) (McFadden et al., 2019). De ce fait, la SFA contient 3.7% de formaldéhyde (où les usagers parlent de 4%), avec 1% de méthanol (parfois), dans un tampon phosphate (McFadden et al., 2019). La formaline 10%, la PAF 4% ou le formaldéhyde 4% sont alors des équivalents (Snyder et al., 2022).

Le tampon phosphate est considéré comme un produit de type 3 (agent modifiant), qui a comme mécanisme d'action de maintenir le pH presque neutre, en plus de maintenir la concentration osmotique de la solution, importante pour que la solution diffuse dans les tissus (Thavarajah et al., 2012). De plus, comme mentionné plus haut, le formaldéhyde est connu pour rétrécir les tissus, en formant des liens covalents, ce qui dépolymérise les composantes cellulaires, résultant en un tissu plus compacte et rigide (Kiernan, 2000). Le tampon ajouté au formaldéhyde pour former la SFA permet donc de diminuer les distorsions, puisqu'en maintenant la concentration osmotique, il diminue le gonflement (déterminé par une solution hypotonique) et le rétrécissement cellulaire (déterminé par une solution hypertonique) (Eltoum et al., 2001). Finalement, le tampon phosphate de la formaline permet de garder un pH plus neutre, ce qui réduit le *cross-linking* induit par le formaldéhyde, puisque le groupe amine des protéines est protoné, et donc moins réactif au *cross-linking* (Hoffman et al., 2015).

1.3.1.2 Avantages et inconvénients de la SFA

Le formaldéhyde est le plus puissant type de fixateur/agent de conservation connu depuis plus d'un siècle (Balta, Cronin, et al., 2015; Fox et al., 1985; Hammer et al., 2011; Kiernan, 2000). Les inconvénients de la SFA déjà décrits plus tôt dans ce texte sont la toxicité et la rigidité des spécimens. Il est toutefois possible de réduire les vapeurs toxiques formées par le formaldéhyde en ajoutant du phénoxyéthanol (désinfectant, préservatif et agent de parfum) à la solution; il peut aussi être utilisé pour retirer le formaldéhyde des cadavres après la fixation (Balta, Cronin, et al., 2015; Brenner, 2014; Crosado et al., 2020; Frølich et al., 1984; Wineski & English, 1989). La SFA à 4% (ou Formaline 10%) rend les cadavres trop rigides; par conséquent, cette concentration n'est généralement pas utilisée en anatomie humaine à des fins de dissection (Brenner, 2014), mais elle peut être utilisée pour la recherche, ou pour fixer des organes *ex situ* (p.ex. des cerveaux). D'ailleurs, les cerveaux fixés avec la SFA sont rétrécis et durs (Del Signore et al., 2022; Mouritzen Dam, 1979; Neuhaus et al., 2025; Quester & Schröder, 1997).

Un autre inconvénient est que la SFA peut être responsable d'artéfacts d'images en IRM; il inverse le contraste MB-MG dans les images en raccourcissant la relaxation longitudinale (T1) qui s'ajoute à la diminution de la relaxation transversale (T2) (Augustinack & van der Kouwe, 2016; Birkl et al., 2016; Blamire et al., 1999; Dawe et al., 2009; Nagara et al., 1987; Pfefferbaum et al., 2004; Raman et al., 2017; Shepherd, Thelwall, et al., 2009; Tovi & Ericsson, 1992). Cet aspect sera couvert dans la section 3 (section sur l'IRM) du présent chapitre.

Concernant les avantages, la fixation par perfusion au formaldéhyde est très répandue dans la recherche animale (Gage et al., 2012; Wu et al., 2021). De plus, certaines études ont montré des résultats de haute qualité avec l'IHC, les colorations d'histochimie (HC), ou l'IF sur des cerveaux humains fixés avec du formaldéhyde (Alkemade et al., 2020; Beach et al., 1987; Insausti et al., 2023; Waldvogel et al., 2006), mais celui-ci change la conformation des protéines. Le changement est assez lent (Helander, 1994; Kiernan, 2000; Stumptner et al., 2019) et affecte donc la qualité antigénique et d'IHC de plusieurs populations cellulaires chez les spécimens fixés depuis longtemps (si les DPM de fixation ne sont pas raisonnables (> 48h) et lorsqu'ils sont soumis à une post-fixation trop longue) (Arnold et al., 1996; Beach et al., 1987; Eltoum et al., 2001; Lyck et al.,

2008; Puchtler & Meloan, 1985; Stumptner et al., 2019; Waldvogel et al., 2006). Cela crée une autre limite pour les études histologiques du cerveau.

1.3.1.3 Étendue de l'utilisation de la SFA

Une étude de 2011 stipulait que parmi 109 laboratoires d'anatomie à travers le monde, 87% utilisent du formaldéhyde et donc, des solutions "à base de formaline" et "fixation dure" (Balta, Cronin, et al., 2015; Benkhadra et al., 2011). Cependant, les chercheurs se tournent vers d'autres formules chimiques pour limiter les enjeux de santé et de rigidité, en diminuant la concentration de celle-ci à moins de 1% (Kaliappan et al., 2023).

La SFA 4% (ou formaline 10%) est toutefois encore utilisée hors des laboratoires d'anatomie humaine pour deux raisons principales : les banques de cerveaux s'en servent comme fixateur par immersion des hémisphères cérébraux (Beach et al., 2015; Carlos et al., 2019; Hulette, 2003; McFadden et al., 2019; Nacul et al., 2014; Sheedy et al., 2008; Vonsattel et al., 2008) et elle reste la fixation de choix chez les espèces animales (Del Signore et al., 2022; Janczyk et al., 2011; Martins-Costa et al., 2022; Musiał et al., 2016; Weisbecker, 2011). Dans ces situations, les utilisateurs ne sont pas confrontés à un contact prolongé avec le formaldéhyde (donc limite les dommages liés à la santé). Ces applications ne requièrent pas non plus une flexibilité/couleur/qualité des organes et des tissus souhaitables pour la dissection et les simulations chirurgicale.

1.3.2 Solution de sel saturé (SSS)

1.3.2.1 Mécanismes d'action de la SSS

La SSS a été développée comme solution de « fixation souple » par les anatomistes Raymond Coleman et Igor Kogan en Israël en 1998 (Coleman & Kogan, 1998). La SSS est une solution qui est à base de formaldéhyde, mais en très basse concentration (0.8%). Elle agit principalement par la précipitation des protéines, plutôt qu'en engendrant un *cross-linking*, étant donné la grande quantité d'alcools dans sa formulation (Rahman et al., 2021). De plus, la grande concentration de NaCl empêche la dessiccation, puisque l'eau est absorbée par le sel, ce qui empêche les MO de proliférer et entraîne la déshydratation (Brenner, 2014). Par ailleurs, le sel est largement utilisé

dans l'industrie alimentaire comme un agent de conservation qui peut absorber l'eau et entrainer la coagulation des protéines alimentaires (Henney et al., 2010). De plus, l'utilisation de faibles concentrations de formaldéhyde avec du sel produit un cadavre flexible; le formaldéhyde produit encore moins de *cross-linking* en présence d'eau que lorsqu'il est dans un tampon phosphate, puisque le pH est un peu plus acide, et donc plus protoné et moins disponible aux ponts covalents (Arnold et al., 1996; Eltoum et al., 2001). La SSS contient aussi du phénol (C_6H_6O), un produit qui a été introduit dans l'embaumement anatomique en 1886 par Laskowski (Brenner, 2014). Le phénol engendre la dénaturation des protéines, ce qui aide aussi à diminuer la quantité de ponts covalents, tout en agissant comme un excellent fixateur (Rahman et al., 2021). Il est aussi un bon désinfectant et déshydratant, ce qui empêche la prolifération des MO (Brenner, 2014; Ikeda, 1988). Cependant, il crée une coloration brune des tissus et est odorant (Tolhurst & Hart, 1990). De plus, il est corrosif pour la gorge et l'estomac, est possiblement mutagène, en plus d'occasionner d'autres problèmes de santé (p.ex., il désensibilise la peau et provoque des maux de tête) (Balta, Cronin, et al., 2015; Balta, Cryan, et al., 2019; Balta, Twomey, et al., 2019; Brenner, 2014; Hammer et al., 2012). Le glycérol, ou la glycérine (synonyme) ($C_3H_8O_3$) est également une composante de la SSS qui, contrairement aux autres types d'alcool, est humectant plutôt que déshydratant, dû à sa grande densité et viscosité (Ferreira et al., 2017; Thiagarajan, 2017). De plus, il a été décrit que le glycérol prévient la déshydratation des tissus et augmente la flexibilité (Tolhurst & Hart, 1990), ce qui aide à contrer les effets déshydratants de l'alcool isopropylique (propan-2-ol, $CH_3CH(OH)\text{-}CH_3$). Ce dernier est aussi présent en grande concentration dans la SSS et agit également comme un fixateur complémentaire au formaldéhyde et au phénol. Il fonctionne par remplacement de l'eau libre du tissu, ce qui déstabilise les ponts d'hydrogène entre les molécules, entraînant la rupture de la structure tertiaire des protéines et leur coagulation. Ce sont alors les groupes hydrophobes de ces protéines qui se retrouvent à la surface, rendant le tout insoluble (Eltoum et al., 2001; Horobin, 1982). Cela aide à la fixation (bien que l'alcool isopropylique ne soit pas le fixateur principal de la solution), mais empêche aussi la croissance de MO (Eltoum et al., 2001). Finalement, le Dettol® est rajouté à la SSS au moment de la perfusion (UQTR, 1993). C'est un produit commercialisé comme un détergent désinfectant (produit de catégorie 2) utilisé pour prévenir la moisissure. Son principe actif est le chloroxylénol,

un composé chimique aromatique (catégorie 5, agents de parfum) dérivé du phénol qui contient un atome de chlore[4].

1.3.2.2 Avantages et inconvénients de la SSS

En général, la SSS est une solution dite de « fixation souple » ; les articulations des cadavres embaumés sont plus flexibles que celles des cadavres fixés avec des solutions qui contiennent une plus grande concentration de formaldéhyde (Coleman & Kogan, 1998). Elle conserve également mieux la couleur et la texture des tissus (Hayashi et al., 2014). La SSS contient 3 fixateurs (formaldéhyde, phénol, et alcool isopropylique), en plus d'une grande quantité de sel qui accentue la déshydratation du tissu (et donc possiblement qui contribue à la coagulation des protéines par le phénol et l'alcool isopropylique). Cela fait en sorte que la fixation des cadavres est complète après 6 semaines, alors que celle avec SFA peut prendre jusqu'à 6 mois, alors que la SA peut prendre jusqu'à 8 mois (Coleman & Kogan, 1998). Cependant, le corps est préservé moins longtemps[5]; il s'oxyde et l'aspect du vivant se détériore après environ 2 ans (Balta, Cronin, et al., 2015). De plus, les tissus sont déshydratés par le phénol et l'alcool isopropylique (Benet et al., 2014; Grinberg et al., 2008; Hobro & Smith, 2017; McFadden et al., 2019), ce qui pourrait provoquer des artéfacts dans les études histologiques, notamment au niveau du cerveau.

1.3.2.3 Étendue d'utilisation de la SSS

La SSS a été développée en remplaçant l'alcool de la solution de Logan (1983) par de l'alcool isopropylique et en ajoutant beaucoup de sel (Brenner, 2014; Coleman & Kogan, 1998). Depuis, la solution est utilisée pour diminuer les effets toxiques du formaldéhyde en plus haute concentration dans les laboratoires d'anatomie, mais elle est assez récente et encore peu connue. De ce fait, de nombreuses études se concentrent sur ses mécanismes d'action pour mieux comprendre les impacts sur la qualité histologique des tissus d'intérêt en recherche (Balta, Cronin, et al., 2015; Balta, Twomey, et al., 2019; Brenner, 2014; Lombardero et al., 2017; Martins-Costa et al., 2022; Watanabe et al., 2020). De plus, plusieurs laboratoires utilisent cette formule pour l'apprentissage de procédures chirurgicales (Bruns et al., 2018; Gulati et al., 2020; Hayashi

[4] https://www.rbnainfo.com/MSDS/CA/DETTOL®%20Antiseptic%20Liquid%20EN%20GHS%20CA.pdf
[5] https://oraprdnt.uqtr.uquebec.ca/portail/gscw031?owa_no_site=4000&owa_no_fiche=3&owa_bottin=

et al., 2014; Hayashi et al., 2016; Homma et al., 2019; Shirai et al., 2022; Watanabe et al., 2020). Cependant, une seule étude rapporte les effets de cette solution sur le cerveau du rat (Martins-Costa et al., 2022), et une seule rapporte les effets sur le cerveau humain (Maranzano et al., 2020).

1.3.3 Solution d'alcools (SA)

1.3.3.1 Mécanismes d'action de la SA

En plus du formaldéhyde, du phénol, du glycérol et du Dettol®, la SA est aussi composée d'éthanol (C_2H_5OH) et d'acétate de sodium (CH_3COONa). L'éthanol joue le même rôle que l'alcool isopropylique de la SSS; c'est un fixateur déshydratant qui coagule les protéines et rend le tissu insoluble (Brenner, 2014; Eltoum et al., 2001; Horobin, 1982). L'éthanol va en plus former du formaldéhyde alcoolique, qui préserve les molécules de glycogène et rétrécit et durcit moins les tissus, comparativement aux autres déshydratants ou au formaldéhyde utilisés individuellement (Eltoum et al., 2001). Finalement, l'acétate de sodium est utilisé comme agent de conservation (utilisé en alimentaire (Santé Canada, 2022)[6] pour prévenir la contamination par des MO, et comme agent modifiant (tampon hypertonique) pour maintenir le pH de la solution (Holden et al., 2021). Il peut aussi aider à diminuer la formation de caillots sanguins (utilisé dans les médicaments anti-coagulants, comme la Tinzaparine[7] et le Pradaxa[8], et donc, à améliorer la perfusion de la solution.

1.3.3.2 Avantages et inconvénients de la SA

En général, la SA est une solution à base de formaldéhyde (à 1.4%, et donc considérée comme « fixation dure »). Les cadavres sont complètement fixés après environ 8 mois, ce qui est plus long que le formaldéhyde, connu pour diffuser plus rapidement dans le tissu que l'éthanol (Fortier & Hould, 2014). En plus, les corps peuvent être conservés pendant des dizaines d'années, encore plus s'ils sont en immersion ou à 4°C (UQTR, 1993). Les organes sont bien préservés; leur texture

[6] https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/salubrite-aliments/additifs-alimentaires/listes-autorises/11-conservation.html
[7] https://ressourcessante.salutbonjour.ca/drug/getdrug/innohep
[8] https://www.boehringer-ingelheim.ca/sites/ca/files/documents/praxbindcifr.pdf

et leur couleur sont adéquates pour la démonstration de pièces anatomiques, la dissection en cours de médecine et autres disciplines de la santé (p.ex. chiropratique, podiatrie) (UQTR, 1993).

1.3.3.3 Étendue d'utilisation de la SA

La SA utilisée dans le présent projet a été conçue à l'UQTR et n'est donc pas une formule nécessairement employée ailleurs (même si les mêmes produits chimiques sont combinés pour faire des solutions de fixation dans d'autres laboratoires d'anatomie, la proportion de chaque produit peut varier). Il y a aussi d'autres formulations d'alcools qui ne contiennent pas de formaldéhyde (ou qui contiennent une concentration inférieure à 1%) et qui sont considérées comme des « fixations souple ». En général, les anatomistes mélangent différentes concentrations d'éthanol, de glycérol, de phénol et d'eau, ce qui est décrit comme idéal pour l'apparence et la texture du corps en pratique chirurgicale (Barton et al., 2009). Notamment, une solution qui ressemble beaucoup à la SA est la solution de Benet (Benet et al., 2014), mais qui contient moins de formaldéhyde et qui est donc une solution dite de « fixation souple ». Cette solution a été développée dans le but de diminuer les distorsions du cerveau engendrées par la « fixation dure », ce pourquoi nous avons utilisé cette formulation dans le projet initial chez les souris. Note : pour les autres projets, avec des échantillons de cerveaux humains, nous avons utilisé la SA du laboratoire d'anatomie de l'UQTR, parce qu'elle est très proche de la solution de Benet et en même temps elle représente la réalité au quotidien de notre laboratoire.

Concernant l'utilisation dans des programmes de médecine, une étude mentionne que sur 16 écoles de médecine, toutes utilisent des solutions à base de phénol, glycérol ou éthanol (O'Sullivan & Mitchell, 1993). D'autres utilisent une partie de ces composantes, en différentes concentrations (Cabrera et al., 2017; Martins-Costa et al., 2022), ou même du méthanol (Shetty et al., 2020). Plusieurs études qui utilisent des solutions à base de phénol montrent une préservation de la flexibilité et des couleurs du corps, en plus d'une bonne qualité histologique des tissus (Hopwood et al., 1989; Rahman et al., 2021; Tomalty et al., 2019; Venne et al., 2020). De plus, l'Universidade Nova de Lisboa au Portugal utilise un mélange d'alcools aliphatiques et d'éthylène glycol (Goyri-O'Neill et al., 2013). Un autre laboratoire de l'Université de Leipzig (Allemagne) utilise un mélange d'éthanol, de glycérine et de thymol (désinfectant bactérien et

fongique), ce qui préserve la flexibilité des muscles et donne aux vaisseaux sanguins une apparence naturelle se rapprochant de celle du vivant (Hammer et al., 2012).

Une autre solution a été conçue en remplaçant le glycérol par du sorbitol, et l'éthanol, par l'isopropanol, ce qui a été un franc succès pour l'élimination de MO et pour conserver une flexibilité et une texture des cadavres satisfaisantes pour la dissection (Woodburne & Lawrence, 1952). Les SA (à base de phénol principalement) semblent être l'alternative idéale qui devrait éventuellement remplacer la SFA, pour tous ses avantages, que ce soit pour la fixation animale, du corps complet, d'organes *ex situ* ou pour l'histologie (Cabrera et al., 2017; Crosado et al., 2020; Hammer et al., 2011; Hammer et al., 2012; Rahman et al., 2021; Shetty et al., 2020; Tomalty et al., 2019; Venne et al., 2020). De plus, les effets des différents alcools sur le tissu cérébral post-mortem sont connus; ils engendrent des artéfacts de déshydratation du neuropile, mais conservent la taille du cerveau et préservent bien l'antigénicité des principales populations cellulaires (Benet et al., 2014; Martins-Costa et al., 2022; Rahman et al., 2021; Tomalty et al., 2019).

1.3.4 Autres solutions utilisées

Il existe d'autres solutions, notamment d'acide acétique (qui agit comme dénaturant des protéines en changeant la charge ionique), aussi utilisée dans la fixation du cerveau, bien que cela résulte en la perte de myéline (Grinberg et al., 2008; McFadden et al., 2019). Sa combinaison avec du formaldéhyde est toutefois considérée comme plus efficace pour la reconstruction axonale (Grinberg et al., 2008; McFadden et al., 2019). De plus, le glutaraldéhyde est un autre fixateur grandement utilisé (Kiernan, 2000). Il produit une fixation dure très rapide à des concentrations de 1-3% ou plus, peut être inodore et préserve la coloration des tissus cadavériques semblable à celle des corps frais s'il est utilisé à de plus faibles concentrations (ou comme base) (Brenner, 2014; Tutsch, 1975). Cependant, les structures sont plus dures que dans les cadavres frais, mais un peu plus flexibles qu'avec le formaldéhyde (Campbell, 1998; Tolhurst & Hart, 1990). Il a été utilisé comme un fixateur en premier lieu en 1955 (Tolhurst & Hart, 1990), et ensuite dans plusieurs formulations chimiques en tant qu'ingrédient de base (Balta, Cronin, et al., 2015). Il est également parfois utilisé dans la fixation des cerveaux (McFadden et al., 2019). Il est cependant toxique, en plus d'être un fixateur qui engendre le *cross-linking* des protéines (et même plus que

le formaldéhyde, ayant un groupe d'aldéhyde de plus dans sa conformation), pouvant affecter la qualité cellulaire et moléculaire des tissus (Eltoum et al., 2001; Hayat, 1981; Kiernan, 2000; McFadden et al., 2019). Cependant, l'utilisation du glutaraldéhyde semble profitable pour la microscopie électronique des cerveaux (Morin et al., 1997) comparativement au formaldéhyde (Kiernan, 2000). En effet, le glutaraldéhyde engendre du *cross-linking* des protéines, mais pas de l'ADN comme le fait le formaldéhyde, ce qui peut être nuisible à la microscopie électronique (Sewell et al., 1984).

1.4 Techniques de fixation utilisées

1.4.1 Fixation par perfusion ou par immersion

1.4.1.1 Fixation ex situ

La technique la plus populaire pour la fixation des cerveaux humains est la fixation par immersion dans le formaldéhyde: c'est la pratique courante des banques de cerveaux. Dans ces cas, les cerveaux sont extraits tant qu'ils sont encore frais (ils deviennent donc des cerveaux *ex situ*) et submergés dans la SFA (Insausti et al., 2023; McFadden et al., 2019). L'extraction du cerveau frais s'amorce généralement par l'ouverture du crâne avec une scie, ce qui peut abimer la partie superficielle de la dure-mère et du cortex cérébral. Ensuite, le cerveau est soulevé pour détacher les nerfs crâniens et la moelle épinière qui attache l'encéphale au reste du corps, une étape lors de laquelle des déchirures du tissu peuvent survenir (Waters, 2009). La fixation par immersion engendre donc des déformations du cerveau, en plus d'être lente et hétérogène (sur-fixation à la surface, et décomposition qui s'amorce en profondeur) (Insausti et al., 2023; McFadden et al., 2019) ce qui entraîne des artéfacts histologiques (Bauer et al., 2016; Beach et al., 1987; Garman, 1990; Lamberts & Goldsmith, 1986), comparativement à ce que l'on obtient avec les cerveaux fixés par perfusion (Insausti et al., 1995; Kalimo et al., 1974; McFadden et al., 2019).

Une autre méthode est parfois utilisée; la fixation par perfusion *ex situ*, une procédure illustrée dans la figure 2 (Hade et al., 2024; McKenzie et al., 2022). Le cerveau est extrait frais, suivi d'une injection du fixateur dans les artères carotides internes et vertébrales. Cette méthode occasionne des déformations (comme expliqué plus haut, des déchirures sont plus susceptibles d'être

causées par l'extraction du cerveau frais qui est plus friable), en plus de risquer la rupture des artères, lors de l'extraction. En revanche, la fixation est plus rapide et peut être monitorée; les usagers peuvent remarquer si des artères sont bloquées (ce qui peut nuire à la perfusion), chose impossible lorsque le cerveau est perfusé *in situ* (Insausti et al., 2023; Istomin, 1994; McFadden et al., 2019). Un autre avantage de cette méthode est qu'elle produit une bonne qualité histologique du tissu (McKenzie et al., 2022; Sharma & Grieve, 2006; Waldvogel et al., 2006). De plus, cette méthode peut être combinée avec la méthode d'immersion, afin d'assurer une fixation malgré des possibles pathologies cérébrovasculaires (p.ex., plaques d'athérome) qui pourraient affecter la qualité de la fixation par perfusion (Insausti et al., 2023). Finalement, cette méthode permettrait également de mesurer le volume du cerveau frais en le submergeant dans l'eau (principe d'Archimède) qui s'avère l'étalon-or dans la mesure du volume cérébral en comparaison avec d'autres méthodes de mesure comme l'IRM (Gérin-Lajoie et al., 2025).

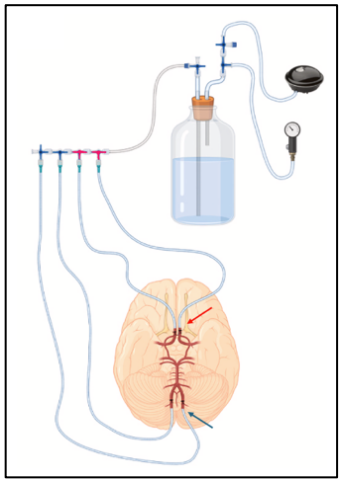


Figure 2. – Perfusion *ex situ* du cerveau, par l'injection avec une pompe de la solution de fixation dans des cathéters attachés à la vascularisation postérieure en bleu (artères vertébrales) et la vascularisation antérieure en rouge (artères carotides internes). Figure adaptée de Hade et al., 2024.

1.4.1.2 Fixation in situ

La fixation *in situ* des cerveaux se fait par la perfusion du cerveau à l'intérieur de la boîte crânienne par l'embaumement du corps complet par l'injection du fixateur chimique par le système cardiovasculaire, avec une pompe réglée à une pression précise (30 psi à l'UQTR), généralement

par les artères carotides communes et/ou par les artères fémorales (Garrood et al., 2025; Insausti et al., 2023; Maranzano et al., 2020). La perfusion *in situ* peut aussi se faire par l'injection du fixateur par les artères carotides communes et vertébrales de la tête détachée, souvent utilisées dans le cadre de pratiques neurochirurgicales (Alvernia et al., 2010; Benet et al., 2014; Turkoglu et al., 2014).

La fixation *in situ* comporte plusieurs avantages en comparaison avec la fixation par perfusion *ex situ* ou la fixation par immersion. Premièrement, comme mentionné, la fixation *in situ* évite les déformations et les endommagements possibles du cerveau lors de l'extraction du tissu frais. Deuxièmement, les cerveaux sont fixés par le biais des vaisseaux sanguins; la diffusion du fixateur chimique dans le cerveau est donc plus homogène que par immersion si les vaisseaux n'ont pas des obstructions pathologiques (p.ex. plaques d'athéromes) (Insausti et al., 2023). Troisièmement, la fixation *in situ* permet des corrélations d'imagerie plus directes avec le patient *in vivo*, puisque le cerveau se retrouve encore dans sa localisation « normale » comme chez le vivant. Dans ces cas, il est possible de corréler des images d'IRM de la tête *ex vivo* et d'IRM du patient qui auraient été acquises avant sa mort (Gouw et al., 2011; Humphreys et al., 2019; Maranzano et al., 2020; Murray et al., 2012). Toutefois, il ne s'agit pas d'une méthode toujours envisageable, comme les banques de cerveaux qui reçoivent les hémisphères *ex situ* directement de l'hôpital (Beach et al., 2015). De plus, le déroulement de la fixation *in situ* ne peut pas être monitoré; de possibles biais dans la fixation des cerveaux en raison d'un blocage d'une artère ne peuvent pas être évités. D'ailleurs, le chapitre 6 de cette thèse présentera des cas de fixation *in situ* incomplète ou hétérogène.

Finalement, il existe aussi des méthodes de fixation physique, c'est-à-dire par le chauffage du tissu, ou sa congélation (Eltoum et al., 2001). Généralement, dans les banques de cerveaux, il y a un hémisphère congelé, et un autre fixé chimiquement (par immersion) avec du formaldéhyde (Beach et al., 2015; Carlos et al., 2019; de Oliveira et al., 2012; Hulette, 2003; Insausti et al., 2023; Kretzschmar, 2009; McFadden et al., 2019; Nacul et al., 2014; Ravid et al., 1992; Sheedy et al., 2008; Vonsattel et al., 2008; Waldvogel et al., 2008). Les banques conservent un hémisphère congelé, puisque celui-ci n'est pas modifié chimiquement, ce qui est idéal pour des études biochimiques, moléculaires ou protéomiques (Vonsattel et al., 2008). Le principe de fixation

physique ne sera pas abordé plus en détails, puisque l'objectif de ce projet ne s'intéresse qu'aux cerveaux fixés chimiquement.

1.5 Considérer le délai post-mortem dans la fixation du cerveau

Le DPM est définit par le temps qui s'écoule entre la mort et l'injection de la solution de fixation dans le corps (ou l'immersion du cerveau dans la solution de fixation dans les cas des banques de cerveaux). Le temps écoulé est associé au déclenchement de changements dans les tissus morts qui peuvent affecter la qualité du tissu cérébral obtenu par les chercheurs (Blair et al., 2016; Hyodoh et al., 2012).

Premièrement, le DPM a un impact sur la qualité vasculaire du cerveau; la variation dans le temps post-mortem peut contribuer à des différences dans l'intégrité des vaisseaux sanguins (McKenzie et al., 2022). De plus, dans les 2 à 6 heures suivant le décès d'un individu, les phénomènes de *rigor, livor* et *algor mortis* s'amorcent et modifient les caractéristiques du sang, ce qui formera des caillots (Thomsen et al., 1999) (Note : Les détails du *rigor*, *livor* et *algor mortis* ne seront pas décrits dans cette thèse, puisqu'ils occasionnent des changements dans tous les corps reçus dans les laboratoires d'anatomie et tous les cerveaux des banques de cerveaux. Ce ne sont pas des variables modifiables ou contrôlables dans nos spécimens). Ainsi, le DPM peut avoir un impact sur la qualité cérébrovasculaire qui détermine la formation de davantage de caillots (Jackowski et al., 2006; Shiotani et al., 2002), et par le fait même, sur la qualité de la fixation par perfusion des cerveaux (Insausti et al., 2023).

Deuxièmement, dès la mort du patient, le cerveau commence à se dégrader, un phénomène que l'on appelle décomposition, qui dénature la structure du tissu (Shatil et al., 2016; van Duijn et al., 2011), en particulier la MB du cerveau par son autolyse (D'Arceuil & de Crespigny, 2007; D'Arceuil et al., 2007). De ce fait, un DPM plus long (généralement > 24 heures) est associé à une qualité inférieure du tissu cérébral (Roebroeck et al., 2019). En général, les chercheurs recommandent d'utiliser des cerveaux qui ont été fixés dans un DPM le plus court possible (< 24 heures) (Hade et al., 2024; Insausti et al., 2023; Maranzano et al., 2020). Toutefois, les résultats d'études d'imagerie de diffusion démontrent peu ou pas d'impact de la longueur du DPM (>48h) sur la qualité du tissu (D'Arceuil & de Crespigny, 2007; Guilfoyle et al., 2003), et certaines études

histologiques ne démontrent pas non plus d'impact (Blair et al., 2016; Krassner et al., 2023; Mizee et al., 2017). Les DPM « acceptables » sont donc très variables d'une étude à l'autre, selon les paramètres/variables mesurés. Par exemple, une étude par Hade et ses collaborateurs proposent un DPM de 24 heures pour des études immunohistochimiques (Hade et al., 2024), alors que certaines protéines d'intérêt peuvent être détectées bien au-delà de ce temps (Blair et al., 2016; Waldvogel et al., 2006). Une autre étude démontre un enroulement axonal et une diminution de la qualité de l'IHC des axones au-delà de 24h (Lavenex et al., 2009). Par ailleurs, l'ARN serait plus affecté par un long DPM (Gonzalez-Riano et al., 2017; Sherwood et al., 2011), affectant les études transcriptomiques, alors que des études histologiques de base (p. ex., colorations de Nissl) pourraient supporter des DPM plus longs (Insausti et al., 2023). Il est donc clair que le DPM a un impact variable sur la qualité macro et microscopique du tissu cérébral et doit donc être considéré dans la méthodologie des études post-mortem, étant donné qu'il affecte différemment les molécules/antigènes des cellules cérébrales.

Note concernant les acronymes des solutions **:** En français, on utilise l'acronyme SFA (Solution de FormAldéhyde), alors que l'acronyme FAS a été utilisée dans l'article 1 (chapitre 2) de cette thèse (en anglais : FormAldehyde Solution). Cependant, l'acronyme NBF (Neutral-Buffered Formalin) a été utilisé (au lieu de FAS) à partir de l'article 2 de cette thèse (chapitre 3), puisque l'on a remarqué son utilisation plus étendue dans la littérature pour parler de solution de formaldéhyde. L'acronyme SSS a été utilisé dans tous les chapitres, autant en français (Solution de Sel Saturée) qu'en anglais (Saturated Salt Solution). Finalement, la solution d'alcools (SA comme acronyme en français) a aussi été décrite comme AS dans l'article 1 (chapitre 2) pour Alcohol Solution, alors que dans l'article 2 (chapitre 3) et les subséquents, on parle de AFS (Alcohol-Formaldehyde Solution), pour remarquer qu'il y a toujours du formaldéhyde dans sa composition.

2. L'histologie

En neurosciences, les études histologiques doivent se faire post-mortem et nécessitent donc du tissu cérébral fixé. Comme expliqué dans la section précédente, la fixation change la conformation cellulaire et moléculaire, mais peut aussi déshydrater et entraîner un

rétrécissement du tissu. De ce fait, les coupes histologiques font face à plusieurs facteurs de distorsion : 1-La fixation (Quester & Schröder, 1997); 2-Les procédés de colorations, qui peuvent être hétérogènes et entraîner un rétrécissement supplémentaire du tissu (Mouritzen Dam, 1979; Taqi et al., 2018) et 3-Les manipulations du tissu, qui peuvent entraîner des déchirures, la séparation de structures (c.-à-d. lorsque les hémisphères ne sont plus reliés sur la ligne médiane, ou bien qu'un lobe se détache) ou bien même des coupes manquantes (Choe et al., 2011; Taqi et al., 2018). Tous ces facteurs contribuent à limiter l'utilisateur/évaluateur dans l'orientation des coupes dans l'espace en trois dimensions (3D) lors d'analyses qui nécessitent un recalage de l'histologie à d'autres type d'images 3D (voir section 4 du chapitre 1) (Stille et al., 2013).

Malgré ces inconvénients, l'histologie reste la référence standard dans l'évaluation de la neuroimagerie, de la connectivité, des maladies neurodégénératives, etc. (Cardoso et al., 2014; den Bakker, 2017; Hoffmann et al., 2011). Elle nous permet d'étudier le tissu cérébral à une résolution cellulaire et moléculaire afin d'évaluer la cytoarchitecture, la myéloarchitecture et la réceptoarchitecture, ou encore l'arrangement entre les neurones et les autres populations cellulaires (c.-à-d., les astrocytes et la microglie), ce qui est crucial pour la compréhension du système nerveux (Palomero-Gallagher & Zilles, 2019). De plus, l'histologie permet aussi d'étudier l'anatomie pathologique du cerveau pour comprendre les protéinopathies et les changements de la MB qui apparaissent lors du vieillissement normal et pathologique, via des corrélations entre la neuroimagerie et l'histopathologie (Bouman et al., 2020; Bronge et al., 2002; Eriksson et al., 2005; Gouw et al., 2011; Humphreys et al., 2019; Jonkman et al., 2019; Jonkman et al., 2015; Lahna et al., 2022; Laule et al., 2008; Lycklama à Nijeholt & Barkhof, 2003). En général, deux techniques histologiques différentes sont utilisées; l'IHC, et l'HC.

2.1 Immunohistochimie

L'IHC est une technique qui utilise le couplage d'anticorps et d'antigènes spécifiques aux cellules d'intérêt. De ce fait, cette technique de coloration est dite immuno-dépendante et compte sur la disponibilité des épitopes spécifiques et donc, de la conformation tertiaire des protéines d'intérêts (Mebratie & Dagnaw, 2024).

2.1.1 Protocoles de récupération des antigènes

Comme expliqué dans la section 1 (la fixation), le tissu post-mortem est sujet à des changements de conformation moléculaire en raison de la fixation chimique et de la dégradation cellulaire après la mort. De ce fait, certains antigènes d'intérêts sont sujets à du *cross-linking* de protéines, un processus de formation de liens covalents stables entre les acides aminés (Hoffman et al., 2015; Stumptner et al., 2019), par des ponts méthyléniques (Yamashita, 2007). Cela peut empêcher le bon marquage de ces antigènes par l'IHC, puisque les épitopes spécifiques se retrouvent cachés dans une conformation différente de la protéine originale ou recouverts par d'autres macromolécules (Yamashita, 2007). En histologie, des protocoles de RA, appelés *antigen retrieval*, ont été développés afin de renverser ces liens covalents (Alelú-Paz et al., 2008; Jiao et al., 1999; Krenacs et al., 2010; Robinson & Vandré, 2001; Shi et al., 2001; Shi et al., 2011; Shi et al., 2019; Syrbu & Cohen, 2011; Werner et al., 1996). Il existe plusieurs méthodes efficaces pour renverser les liens covalents des protéines qui peuvent être utilisées avant les procédés d'IHC.

2.1.1.1 Traitement par la chaleur

Premièrement, le « heat-induced antigen retrieval (HIAR) », ou la récupération d'antigènes par induction de chaleur, consiste à faire bouillir le tissu dans des solutions tampons (Citrate ou Tris-EDTA en général) et d'ensuite le refroidir rapidement (Figure 3A) (Krenacs et al., 2010). Le choc thermique agit pour briser les liens covalents (ponts de méthylène) en ajoutant des groupes méthylol dans les protéines fixées, ce qui étend les polypeptides afin de dévoiler les épitopes. Le chauffage dans un tampon avec un pH (Shi et al., 1995) et une concentration en ions (Shi et al., 1991) appropriés est important pour que les polypeptides puissent trouver un équilibre entre la force de répulsion hydrophobe et la force d'attraction électrostatique et ainsi s'étendre (Yamashita, 2007). Cette méthode est utilisée pour sa simplicité, ses faibles coûts, sa sensibilité et son efficacité. De plus, l'HIAR permet non seulement d'augmenter la réactivité de l'IHC, mais engendre aussi un meilleur rapport signal/bruit (*signal to noise ratio*) (Yamashita, 2007). C'est pour ces raisons que l'HIAR a été choisie dans les travaux de cette thèse, en comparaison avec les autres techniques disponibles décrites ci-dessous.

2.1.1.2 Traitement enzymatique

Une deuxième méthode de RA est la « enzymatic-induced antigen retrieval (EIAR) », aussi appelée méthode de digestion enzymatique (Yamashita, 2007). Cette méthode consiste à incuber le tissu dans une solution d'enzymes protéolytiques (trypsines, pepsines, protéases (Bolton & Mesnard, 1982; Huang, 1975) qui couperont les ponts covalents entre les protéines et digéreront les macromolécules environnantes. Cela permet de libérer les épitopes d'intérêts (Figure 3B) (Yamashita, 2007). Cependant, une digestion excessive par des protéases entraîne la destruction de structures tissulaires et peut détruire certains épitopes, provoquant une diminution de la qualité de l'IHC. C'est pour cette raison que l'HIAR est généralement choisi aux dépens des techniques de EIAR. En plus, la méthode EIAR est plus dispendieuse et n'intensifie pas toujours l'IHC comparativement à l'HIAR (Yamashita, 2007). Son utilisation est tout de même courante dans les cas où les antigènes sont susceptibles à la dénaturation par la chaleur entraînée par l'HIAR (Yamashita, 2007).

2.1.1.3 Traitement par dénaturation

Une troisième méthode de RA consiste à appliquer des traitements de dénaturation des protéines, aussi appelée méthode de perméabilisation des protéines (c.-à-d. par méthodes chimiques), généralement par l'incubation des coupes dans le dodécylsulfate de sodium (SDS) (Robinson & Vandré, 2001). Le SDS exposerait les épitopes masqués grâce à l'association des antigènes avec un polymère (Yamashita, 2007). Certains épitopes pourraient être détectés seulement dans leur forme dénaturée de la protéine initiale, ce qui serait la base de l'efficacité du SDS dans certains cas d'IHC (Brown et al., 1996).

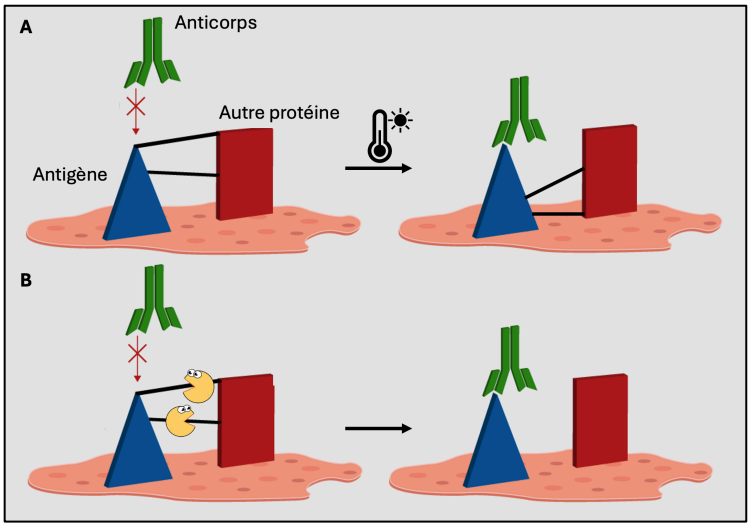


Figure 3. – Procédés de récupération des antigènes A) par induction de chaleur ou B) par un complexe enzymatique, lorsque des liens covalents (*cross-linking*, lignes noires) ont été créés entre deux protéines par leur changement de conformation dû à la fixation chimique. Figure adaptée de BioGenex.

Malgré que l'HIAR soit une méthode de choix comparativement à la EIAR ou au SDS, l'HIAR engendre des inconvénients quant à la qualité du tissu. En effet, après un traitement à la chaleur, les coupes deviennent fragiles et s'enroulent sur elles-mêmes, ce qui peut engendrer une perte de tissu significative lors de la coupe et la manipulation difficile du tissu (Taqi et al., 2018). De plus, les coupes soumises à un renversement des ponts covalents pourraient être négativement affectées par ces protocoles, dans les cas où l'HIAR romprait également des liaisons normales entre les protéines et ainsi nuirait à l'antigénicité de protéines spécifiques (Yamashita, 2007).

2.1.2 Les protéines spécifiques des principales populations cellulaires

Dans le cadre des études de cette thèse, le but était de déterminer si les principales populations cellulaires du cerveau, notamment les neurones, les astrocytes, la microglie et la myéline des oligodendrocytes, étaient préservées avec les différentes solutions de fixation. Des antigènes spécifiques pour chacune des populations ont été choisis afin de les marquer par IHC.

2.1.2.1 Neurones

Les neurones ont été marqués avec *Neuronal nuclei* (NeuN) (Uniprot #A6NFN3), un marqueur utilisé mondialement et dans de nombreuses publications, dont le mot clé « NeuN » dans Pubmed résulte en 5124 études depuis 1952 (Figure 4A). Le NeuN est aussi appelé le *RNA binding protein fox-1 homolog3* (RBFOX3) et a un poids moléculaire d'environ 46-48 kDa (Kim et al., 2009). Sa conformation tertiaire est présentée à la figure 5. La RBFOX3 est localisée dans les neurones post-mitotique du système nerveux central, et est donc utilisé pour marquer tous les neurones par son expression dans le cytoplasme et le noyau (sauf les neurones non matures ou en développement qui ne seront pas positifs au NeuN). La protéine joue un rôle dans la régulation de séquençage de pré-ARNm, essentiel dans la fonction neuronale (Kim et al., 2009; Mullen et al., 1992).

Le NeuN peut être utilisé pour des études de cytoarchitecture du cerveau humain (Prkačin et al., 2024; Štajduhar et al., 2023) (Note : Les principes de la cytoarchitecture seront décrits plus loin dans cette section). De plus, le NeuN a aussi servi pour le développement d'un atlas histologique de cerveaux de souris marqué par IF par le Allen Brain Institute[9]. NeuN est aussi utilisé dans des études neuropathologiques qui montrent la perte neuronale et la dégénérescence de neurones dans diverses maladies neurodégénératives et démence (Moon et al., 2025; Wang et al., 2018; Yousef et al., 2017) et est également utilisé dans l'identification de dommage ischémique du cerveau (Kirik et al., 2009; Korzhevskii et al., 2009). NeuN a aussi été utilisé dans l'identification de cellules pathologiques dans la maladie de Huntington (Tippett et al., 2007).

L'utilisation de l'anti-NeuN est pratique, car cet anticorps est le plus couramment employé pour marquer la population neuronale de manière générale (sans les différencier, qu'ils soient normaux ou pathologiques). D'autres antigènes sont aussi disponibles pour marquer spécifiquement certains types de neurones. Par exemple, certains interneurones seront marqués spécifiquement en ciblant leur neurotransmetteur principal, comme les cellules GABAergique, les interneurones Parvalbumine, Somatostatine, Calbindine, Calretinine, etc. (Tiveron et al., 2006). Les neurones de projection sont généralement de type glutamatergique (et donc marqués par des anticorps Anti-Glut), mais cela est moins spécifique étant donné que certains interneurones

[9] http://connectivity.brain-map.org/static/referencedata

le sont aussi (Tiveron et al., 2006). De plus, le SMI-32 est un autre antigène largement utilisé pour marquer le corps cellulaire et les dendrites neuronaux par l'antigène non-phosphorylé des neurofilaments à lourdes chaines (Merkulyeva & Mikhalkin, 2021). Cependant, il n'a pas été utilisé dans le cadre des projets de cette thèse puisqu'il est spécifique aux neurones pyramidaux et que le but était de voir l'arrangement global des neurones (Campbell & Morrison, 1989).

2.1.2.2 Astrocytes

Les astrocytes ont été marqués avec GFAP, acronyme pour *Glial fibrillary acidic protein*, (Uniprot #P14136, protéine d'environ 50 kDa), aussi un marqueur largement utilisé. Le mot clé « GFAP » dans Pubmed montre 23 397 études depuis 1977 (Figure 4B). GFAP est une protéine cellulaire spécifique des filaments intermédiaires (classe III) présente dans le cytoplasme, qui différencie les astrocytes des autres cellules gliales durant le développement (Eng, 1985; Hol & Pekny, 2015). Sa conformation tertiaire est présentée à la figure 5. Le GFAP est présent dans les astrocytes fibreux et les astrocytes protoplasmiques et est donc un marqueur général des filaments intermédiaires (Eng, 1985). Cependant, l'expression de GFAP est plus élevée dans les astrocytes fibreux que dans les protoplasmiques (Sun & Jakobs, 2012; Walz, 2000). Dans ces derniers, GFAP est parfois retrouvé seulement dans les pieds des astrocytes associés à la barrière hémato-encéphalique (Oberheim et al., 2009; Tabata, 2015).

Selon Bio-Technologies, le GFAP est le marqueur astrocytaire le plus populaire[10]. Plusieurs études sur la morphologie astrocytaire utilisent du marquage de GFAP et la reconstruction 3D des corps cellulaires et de leurs prolongements pour mieux comprendre leur structure et leur arrangement spatial dans le cortex et la MB (Baldwin et al., 2024; Hade et al., 2024; Nosova et al., 2021; SheikhBahaei et al., 2018; Testen et al., 2020). De plus, plusieurs études qui ont utilisé le marquage de GFAP ont évoqué que les astrocytes auraient un rôle à jouer dans la connectivité avec certains neurones et dans la régulation synaptique, justement par son rôle de régulation des filaments intermédiaires (Brun et al., 1995; Hulshof et al., 2022; Kim & Chung, 2023; Mederos et al., 2018). Le GFAP est aussi utilisé dans l'étude de différentes maladies neurodégénératives,

[10] https://www.bio-techne.com/resources/blogs/glial-fibrillary-acidic-protein-gfap--the-most-popular-astrocyte-marker

étant donné qu'il est un marqueur important de la régulation et du réarrangement de filaments intermédiaires (Hol & Pekny, 2015). GFAP serait exprimé dans les plaques d'amyloïde associées à la maladie d'Alzheimer (Kamphuis et al., 2014; Kim et al., 2023), serait associé à la neuroinflammation (Giovannoni & Quintana, 2020) et jouerait un rôle dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Aoki et al., 1999). Il est aussi utilisé dans l'évaluation neuropathologique de certaines tumeurs (Jaiswal, 2016).

Il existe d'autres marqueurs d'astrocytes, comme le ALDH1L1 (*Aldehyde dehydrogenase 1 family member L1*). Cependant, celui-ci semble plus spécifique aux astrocytes associés aux glioblastomes (Adam et al., 2012), ou en plus grande abondance chez les souris par exemple (Michalovicz et al., 2019; Zhang et al., 2019). Un autre marqueur d'astrocytes, le S100β est aussi utilisé, mais celui-ci ne permet pas le marquage des astrocytes fibreux (marque seulement les protoplasmiques) et marque les oligodendrocytes à la fois, et n'est donc pas très spécifique. Par conséquent, il est moins utilisé (Du et al., 2021).

2.1.2.3 Microglie

Le marqueur Iba1, ou *Ionized-calcium binding adaptor molecule 1*, (Uniprot #P55008) a été utilisé pour marquer les cellules microgliales. Le mot clé « Iba1 » dans PubMed montre 6062 résultats depuis 1981 (Figure 4C). L'Iba1, est aussi connue comme *Allograft Inflammatory Factor-1*, un marqueur de la microglie et des macrophages, qui module l'agrégation de l'actine, facilitant ainsi les changements morphologiques et la phagocytose des microglies activées (Ohsawa et al., 2004). Cette protéine de 17 kDa (Figure 5) se situe dans le cytoplasme et la membrane cellulaire des microglies, du péricaryon jusqu'aux prolongements (Imai et al., 1996). Iba1 ne fait pas partie d'une protéine multiple complexe, mais est impliquée dans la dynamique du cytosquelette. De plus, en raison de ses propriétés de liaison calcique, elle pourrait interagir avec les voies de signalisation du calcium (Gheorghe et al., 2020).

Plusieurs études ont également démontré la présence de cellules microgliales marquées avec Iba1 dans des évaluations neuropathologiques, comme dans la maladie d'Alzheimer (Hopperton et al., 2018; Kenkhuis et al., 2022; Moore et al., 2019; Singh-Bains et al., 2019), de Parkinson (Oizumi et al., 2022), dans les maladies cérébrovasculaires (Ito et al., 2001; Koizumi et al., 2019;

Singh-Bains et al., 2019) ou même dans des atteintes neurologiques comme la schizophrénie ou les troubles bipolaires (Petrasch-Parwez et al., 2020). Puisque la morphologie des microglies peut changer dans différentes conditions neuroinflammatoires, une étude de 2022 a évalué la morphologie des microglies marquées par IHC avec Iba1 (Stetzik et al., 2022). Plusieurs études ont également analysé le marquage d'Iba1 dans des cerveaux de souris normales, pour analyser la morphologie microgliale (González Ibanez et al., 2019), ou dans des études de colocalisation et d'interaction entre les microglies et d'autres protéines d'intérêts (Maurya & Mishra, 2018; Ohsawa et al., 2004; Yadav et al., 2024).

Le CD68 est un autre marqueur de monocyte/macrophages aussi utilisé pour identifier la microglie, surtout pour l'identification des processus inflammatoires dans les maladies neurodégénératives (Farso et al., 2013; Minett et al., 2016; Wetering et al., 2024). Cependant, CD68 est spécifique aux macrophages et donc, aux microglies activées (Zigmond & Echevarria, 2019), alors que les projets actuels de la thèse misaient sur l'architecture de la glie générale. Un autre marqueur grandement utilisé pour le marquage des microglies est le TMEM119. Cependant, une étude récente a démontré que celui-ci n'est pas systématiquement exprimé dans les microglies, spécialement dans les maladies neurodégénératives où il est souvent absent (Kenkhuis et al., 2022). À noter que lors de l'étude pilote et des tests de titrages des anticorps utilisés dans le cadre des projets de cette thèse, nous avons utilisé le TMEM119 (*Rabbit anti-TMEM119*, #ab209064), mais les résultats étaient inconstants. La littérature montrait l'usage fréquent d'Iba1; nous avons donc changé d'antigène pour les études subséquentes.

2.1.2.4 Myéline

Finalement, la myéline des oligodendrocytes a été marquée avec le *Proteolipid protein* (PLP) (Uniprot #P60201), un marqueur largement connu et utilisé depuis 1967 dans 3206 études (avec comme mot clé *Myelin* PLP dans Pubmed, étant donné que l'acronyme PLP tient aussi pour Pyroxidal-5'-phosphate) (Figure 4D). Le PLP, aussi appelée Lipophiline, est une protéine membranaire hydrophobe de 25 kDa (Figure 5) localisée dans la membrane cellulaire des oligodendrocytes (Sobel et al., 2019). Elle contribue à la stabilité et la fonctionnalité de la gaine de myéline en formant un complexe avec la protéine DM20, un isoforme qui aide à la régulation de la myélinisation, et agit avec d'autres protéines comme la CNPase pour s'assurer de la

biogenèse et la régénérescence de la myéline (Greer & Lees, 2002; Greer et al., 2020; Knapp, 1996; Sobel et al., 2019; Yang & Skoff, 1997).

Le PLP a été utilisé pour étudier les axones myélinisés (Lüders et al., 2019) ou pour des études qui ont établi des corrélations avec l'IRM, dont le signal est susceptible à la quantité de myéline (Garbern et al., 1997; Wang et al., 2020). PLP est aussi marqué par IHC pour des évaluations neuropathologiques de la sclérose en plaques (Adiele & Adiele, 2019; Greer & Pender, 2008; Greer et al., 2020; Kuhlmann et al., 2017) ou de la maladie Pelizaeus-Merzbacher (Simons et al., 2002). Il semblerait également que la quantité de PLP diminue dans la MB des cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer (Roher et al., 2002), ce qui suggère que la myéline et les oligodendrocytes contribuent au développement de maladies neurodégénératives (Beach et al., 2023; Festa et al., 2024; Stüber et al., 2014; Vakrakou et al., 2022).

La protéine basique de la myéline, ou *Myelin Basic Protein* (MBP) en anglais, est un autre antigène spécifique de la gaine de myéline largement utilisé. D'ailleurs, une étude antérieure de notre groupe a utilisé le MBP par IF sur les cerveaux fixés avec la SSS pour une étude pilote (Maranzano et al., 2020). Le MBP de cette étude a été marqué par IF, et lorsque les tests ont été fait par IHC avec la diaminobendizine (DAB) (ce qui sera expliqué dans la prochaine section), les résultats étaient inconstants, alors nous avons adopté le PLP, qui comme expliqué précédemment, est l'autre antigène le plus répandu pour la myéline. Finalement, d'autres antigènes, comme le MOG (*Myelin oligodendrocyte glycoprotein*) sont utilisés spécialement comme précurseur de certains types de lésions démyélinisantes de la sclérose en plaques (Brunner et al., 1989; Zhou et al., 2017).

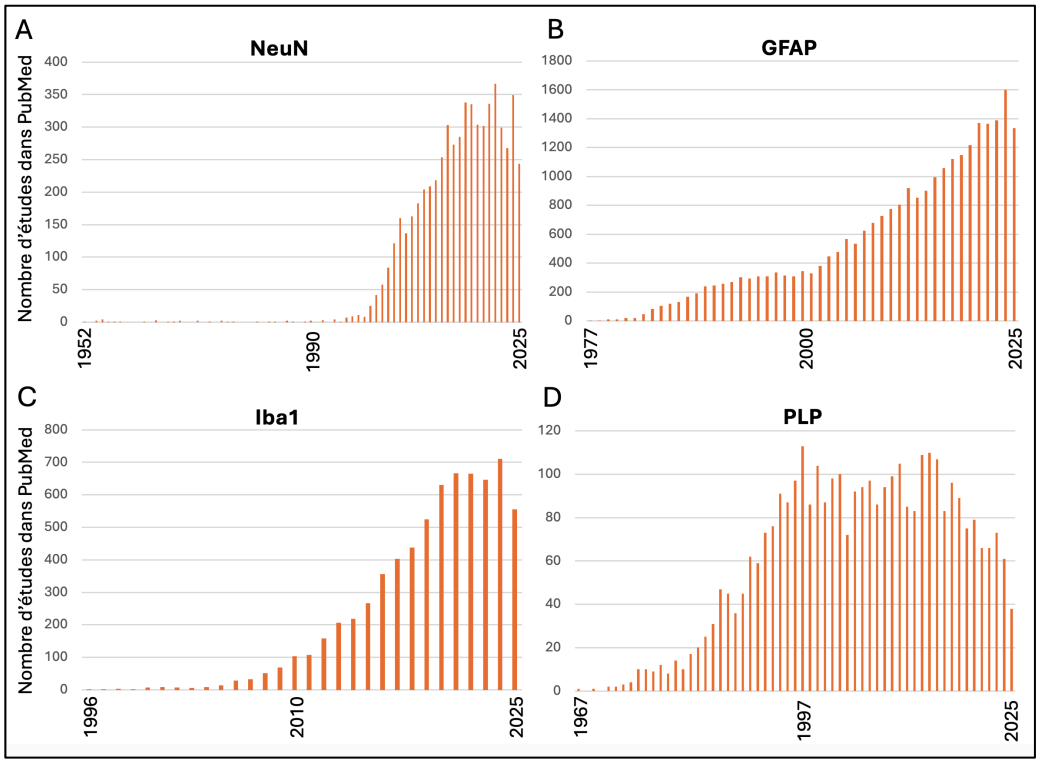


Figure 4. – Nombre de publications associées aux protéines cibles des principales populations cellulaires selon PubMed. A) *Neuronal Nuclei* (NeuN). B) *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP). C) *Ionized calcium binding adaptor molecule 1* (Iba1). D) *Proteolipid protein* (PLP).

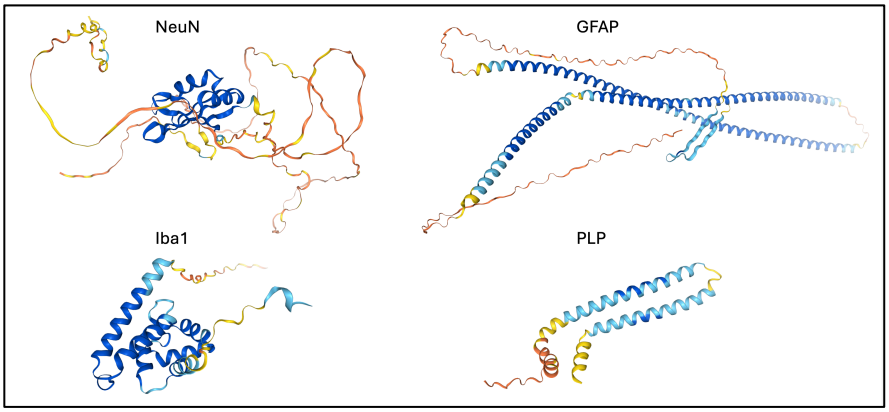


Figure 5. – Conformation des protéines de NeuN, GFAP, Iba1 et PLP. Figure adaptée de proteinatlas.org (*The Human Protein Atlas*).

2.1.3 Protocole d'immunohistochimie

Les protocoles d'IHC utilisés dans le cadre de cette thèse pour marquer les antigènes d'intérêts présentés ci-dessus sont de type indirect (anticorps primaire non-conjugué avec anticorps secondaire conjugué) et se font en 4 étapes importantes : 1- le blocage des peroxydases et des biotines endogènes afin d'éviter le marquage non-spécifique par du sérum de l'hôte des anticorps secondaires (Hussaini et al., 2023); 2- l'incubation dans les anticorps primaires qui ciblent les épitopes souhaités; 3- l'incubation dans les anticorps secondaires, qui ciblent les anticorps primaires; et 4- la révélation avec un complexe enzymatique et un chromogène. D'autres méthodes sont aussi disponibles, comme la méthode directe (c.-à-d. avec des anticorps primaires directement conjugués au complexe enzymatique), mais c'est la méthode indirecte qui est la plus utilisée en recherche (Hussaini et al., 2023). La méthode indirecte permet en effet de diminuer le marquage non-spécifique en utilisant une double détection par anticorps, en plus d'amplifier le signal (Hussaini et al., 2023; Mebratie & Dagnaw, 2024; Sukswai & Khoury, 2019; Werner et al., 1996). Les différents produits et anticorps utilisés dans ces 4 étapes sont présentées au Tableau 2.

2.1.3.1 Utilisation d'anticorps primaires

Les différents anticorps primaires utilisés pour le marquage des protéines cibles mentionnées plus haut (NeuN, GFAP, Iba1, PLP) ont été soigneusement choisis considérant différents critères. Premièrement, les anticorps devaient être tous créés chez le lapin, pour des raisons de logistique, étant donné que notre laboratoire utilisait un anticorps secondaire Anti-Lapin validé depuis longtemps. Deuxièmement, les anticorps devaient être appropriés et fonctionnels chez l'humain et chez la souris. En effet, cela permettait la réalisation d'une étude pilote conduite chez la souris (Chapitre 2) pour valider les protocoles avant de les tester sur du tissu cérébral humain (Chapitre 3), en plus d'être utile pour de futures études translationnelles. Troisièmement, les anticorps devaient être applicables et validés pour des études en IHC et en IF. Quatrièmement, des anticorps d'isotype IgG (Immunoglobuline G) étaient préférable puisqu'ils sont les anticorps les plus abondants dans le corps (Vidarsson et al., 2014). Finalement, des anticorps monoclonaux ou recombinants (anticorps monoclonaux génétiquement créés *in vitro*) étaient préférés aux anticorps polyclonaux, pour leur spécificité à un seul épitope d'un antigène (Basu et al., 2019).

Les anticorps utilisés pour reconnaître les quatre antigènes principaux présentés dans la section 2.1.2 ont tous le lapin comme hôte, sont tous monoclonaux, sont tous de type IgG, étaient tous validés à la fois dans des études d'IHC et d'IF, et étaient tous validés pour leur efficacité dans des études sur les souris et les humains (Tableau 2). L'anti-NeuN [EPR12763] a été cité dans plus de 868 études, l'anti-GFAP [ERP1034Y] dans plus de 106 études depuis sa production en 2011, l'anti-Iba1 [EPR16589] dans plus de 284 études depuis sa sortie en 2016 et Anti-PLP dans 6 publications depuis 2022. Ces anticorps étaient donc des choix justifiés pour les projets de cette thèse.

2.1.3.2 Éléments utilisés pour l'IHC indirecte

Le chromogène de choix utilisé est la 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), qui agit comme un substrat pour une enzyme, la peroxydase, principalement la HRP (*Horseradish peroxidase*). En présence de H_2O_2, la HRP oxyde la DAB par catalysation, ce qui forme un précipité insoluble brun (Humason, 1967). La HRP est couplée à la protéine Streptavidine (via l'incubation dans le kit ABC), qui a une large affinité pour la biotine, couplée à l'anticorps secondaire (Weber et al., 1989). De ce fait, le précipité brun formé se retrouve au site de l'antigène d'intérêt. C'est pour cette raison qu'un anticorps secondaire biotinylé est utilisé, afin d'augmenter la spécificité et de permettre l'arrangement enzymatique nécessaire à la transformation du substrat. De plus, la coloration à la DAB est très stable, ce qui permet de garder les coupes dans le temps (Humason, 1967).

Tableau 2. – Présentation des anticorps et des produits utilisés pour les protocoles d'IHC.

Blocage peroxydases endogènes		**Laboratoire**	**Dilution**	**Code**
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)		Millipore Sigma	0.5%	216763-100
Blocage signal non-spécifique	**Hôte**	**Laboratoire**	**Dilution**	**Code**
Sérum normal	Âne	Jackson	3%	017-000-121
Sérum d'albumine	Bœuf	Sigma Aldrich	0.5%	A4737
Anticorps primaires	**Hôte**	**Laboratoire**	**Dilution**	**Code**
Anti-NeuN	Lapin	Abcam	1:3000	Ab177487
Anti-GFAP			1:1000	Ab68428
Anti-Iba1			1:1000	Ab178847
Anti-PLP			1:3000	Ab254363
Pour IF: Anti-NeuN	Souris		1:1000	Ab104224
Anticorps secondaires	**Hôte**	**Laboratoire**	**Dilution**	**Code**
Anti-Lapin Biotinylé	Âne	NovusBio	1:500	NBP1-75274
Pour IF: Anti-Souris 488nm		Abcam		Ab150105
Pour IF: Anti-Lapin 555nm		NovusBio		NBP1-75274
Complexe enzymatique		**Laboratoire**	**Dilution**	**Code**
Streptavidin (ABC)-Peroxydase (HRP)		Vector Labs	1:50	PK-6100
Chromogène		**Laboratoire**	**Dilution**	**Code**

3,3'-Diaminobenzidine	Sigma Aldrich	0.0667%	D5905

2.1.3.3 Avantages et inconvénients des méthodes choisies

Globalement, l'IHC a été choisie pour sa spécificité (où l'utilisation d'anticorps est dépendante d'un antigène précis) (Werner et al., 1996), sa stabilité (Hussaini et al., 2023), et parce que l'IHC est plus utilisée en histopathologie (puisque l'IF se détériore dans le temps) (Jaiswal, 2016; Oyejide et al., 2017; Sukswai & Khoury, 2019). Les chromogènes d'IHC comme la DAB sont aussi reconnus pour leur spécificité aux molécules de couplage produites par les complexes enzymatiques, ce qui permet de mieux contrôler l'arrière-plan du marquage en se couplant uniquement aux molécules désirées, et ainsi diminuer les résultats faussement positifs (Humason, 1967; Hussaini et al., 2023). De plus, ces chromogènes ont une grande sensibilité, permettant une diminution de résultats faussement négatifs (Hussaini et al., 2023). Cependant, l'IHC comprend aussi quelques désavantages qui doivent être considérés lors du choix de la méthode utilisée. Par exemple, l'IHC ne permet pas de faire du marquage multiple, ou du moins, de manière beaucoup plus compliquée avec des doubles colorations (Mebratie & Dagnaw, 2024). En revanche, l'IHC doit se limiter au marquage d'un seul type cellulaire, ou marquer différents types cellulaires dans des coupes consécutives, ce qui n'est pas toujours l'idéal. De plus, l'utilisation de chromogène comme la DAB est plus critique, puisque ce produit chimique est cancérigène en raison de ses propriétés mutagènes par la liaison à l'ADN (Fairhurst, 2003). Finalement, l'utilisation de la DAB ne permet pas d'acquérir d'images en 3D, puisque l'arrière-plan est partiellement coloré. Cela limite donc aussi l'observation de la morphologie cellulaire (Hussaini et al., 2023). Pour contrer ces désavantages, l'IF est aussi utilisé en histologie et dans le cadre de cette thèse.

2.1.4 Immunofluorescence

Les techniques d'IHC comprennent aussi l'IF qui utilise le couplage des anticorps à des chromogènes fluorescents. Ceux-ci sont sensibles à la lumière et sont donc moins stables dans le temps (sensibles au photoblanchiment) que les chromogènes d'IHC (Polgár et al., 2025). L'IF est aussi une technique susceptible à des artéfacts d'autofluorescence (AF) causés par la présence d'aldéhyde dans les cerveaux fixés (Weber et al., 1978) et par l'accumulation de lipofuscines dans les neurones et cellules gliales des cerveaux vieillissants (Goyal, 1982; Schnell et al., 1999; Wang et al., 2023). De ce fait, l'AF est directement reliée à la qualité de la fixation des cerveaux. L'AF

peut cependant être diminuée avec différents traitements (Kajimura et al., 2016), comme un traitement au borohydrure de sodium, servant à neutraliser les bases de Schiff engendrées par la fixation (aldéhydes libres) en réduisant les composés amine-aldéhyde en sels non fluorescents (Clancy & Cauller, 1998). Une autre technique est le traitement de noir de Soudan, une coloration noire qui tapisse l'arrière-plan et le marquage non-spécifique (Baschong et al., 2001; Goyal, 1982; Schnell et al., 1999). D'autres traitements tel que le photoblanchiment, qui désactivent les fluorophores endogènes des molécules autofluorescentes, ou d'autres composés chimiques peuvent également être utilisés (Kajimura et al., 2016).

Malgré la présence d'AF dans les cerveaux humains vieillissants post-mortem, l'utilisation de l'IF dans ces cerveaux peut aussi être avantageuse. Entre autres, l'IF permet d'effectuer du marquage multiplex, en utilisant plusieurs chromogènes différents, qui seront excités à des longueurs d'onde différentes par microscopie confocale ou en épifluorescence (comme ici en 488 nm pour le NeuN et en 555 nm pour le GFAP, voir Tableau 2) (Sheng et al., 2023). De plus, l'utilisation de l'IF permet de marquer les cellules en 3D, étant donné que l'arrière-plan du tissu n'est pas marqué (complètement noir, lorsqu'il n'y a pas d'AF) (Cho et al., 2023). Par ailleurs, des études récentes utilisent des techniques de *Clearing tissue* (c.-à-d. de délipidation du tissu par SDS) de coupes de cerveaux ou de cerveaux entiers afin de les rendre transparents, de les marquer par IF et ensuite de les imager en 3D par microscopie à 2 photons (Cho et al., 2023; Parra-Damas & Saura, 2020; Ueda et al., 2020).

L'IHC a été choisie avant les techniques d'IF pour sa spécificité (dépendant d'un antigène précis) et parce que l'IHC est plus utilisée en histopathologie (puisque la fluorescence se détériore par photoblanchiment). Cependant, les techniques d'IF sont également avantageuses par rapport à l'IHC pour d'autres paramètres, ce qui nous a mené à évaluer la qualité de l'IF du NeuN et du GFAP dans les cerveaux de souris, dont les résultats seront présentés au chapitre 2. De plus, cela a conduit au lancement d'une étude testant la qualité de l'IF dans des cerveaux humains fixés avec les trois solutions de fixation (c.-à-d. SFA, SSS et SA) et l'efficacité de traitements contre l'AF, dont des résultats supplémentaires seront présentés en addition à l'article d'histologie au chapitre 3.

2.2 Histochimie

2.2.1 Techniques et procédés

Contrairement à l'IHC, les colorations histochimiques ne sont pas dépendantes de l'utilisation des procédés immunologiques, c'est-à-dire qu'elles n'utilisent pas la reconnaissance d'antigènes et d'épitopes par des anticorps spécifiques. De ce fait, elles sont plus stables et ne nécessitent pas de méthode de récupération d'antigène (Musumeci, 2015). L'HC utilise plutôt différents colorants, créés par des réactions entre des produits chimiques qui forment des liens covalents, ioniques ou hydrogène, avec les molécules désirées. Les colorants sont composés de chromophores, une partie chimique responsable de l'absorption de la lumière et ainsi de la couleur émise (Musumeci, 2015).

Dans le cadre de cette thèse, il était donc important d'ajouter des colorations par HC conjointement aux colorations par IHC pour valider la présence des cellules d'intérêt (ou absence si la préservation du tissu était mauvaise avec une ou l'autre des solutions de fixation). Les colorations de HC étaient donc utilisées comme « contrôle positif », puisque l'IHC aurait pu montrer une absence cellulaire, pas parce que les cellules ne sont pas présentes (puisqu'elles sont visibles par HC), mais parce que l'anticorps n'a pu les marquer. Les colorations par HC sont de plus très durables dans le temps, souvent beaucoup plus économiques à réaliser que les colorations par IHC (puisque les anticorps sont très dispendieux), et les procédés sont généralement plus simples et moins longs à réaliser (les périodes d'incubation dans les différentes étapes de l'IHC décrites plus haut durent des heures et même des jours). De plus, l'HC est la méthode la plus utilisée en histopathologie et aussi dans la recherche neuroscientifique des cerveaux normaux (Oyejide et al., 2017; Pellicciari, 2018; Wick, 2012), en plus de permettre de bien observer la cytoarchitecture et la myéloarchitecture dans l'étude de la neuroanatomie (Amunts et al., 2020; Eickhoff et al., 2005). Il est donc clair que les deux méthodes (IHC et HC) sont complémentaires; l'HC devait donc aussi être évaluée.

2.2.2 Marquage des corps cellulaires et cytoarchitecture

La cytoarchitecture est définie comme : « L'agencement des cellules dans un tissu, en particulier dans des zones spécifiques du cortex cérébral caractérisées par l'agencement de leurs cellules et

associées chacune à des fonctions particulières. »[11]. Le marquage des corps cellulaires se fait généralement par une coloration de Nissl, qui marque les accumulations de réticulums endoplasmiques rugueux (RER), présents dans le cytoplasme des cellules par un colorant basique aniline (Kádár et al., 2009). Ce type de coloration nous informe donc sur la distribution, la densité, la forme et la taille des cellules (neurones, et cellules de la glies) observées à travers les différentes aires corticales et sous corticales du cerveau (Amunts & Zilles, 2015). C'est par la cytoarchitecture que Brodmann a divisé le cortex cérébral en 6 couches distinctes (I à VI, Figure 6) et a ainsi subdivisé le cerveau en 52 aires différentes, encore utilisées aujourd'hui et reconnues à titre d'aires de Brodmann (Brodmann, 1909). Pour observer la cytoarchitecture, différentes colorations de HC sont utilisées et seront présentées ci-dessous.

Le cresyl violet (CV) est un type de coloration de Nissl, qui consiste en un colorant basique violet foncé qui marque les RER dans les corps cellulaires neuronaux et des cellules gliales (Eilam-Altstädter et al., 2021). Une coloration au CV de qualité permet de bien observer le contraste entre les corps cellulaires avec des granulations distinguables (corps de Nissl) et le neuropile beaucoup plus pâle autour. Il existe aussi la coloration d'hématoxyline et éosine (H&E), la coloration la plus utilisée en histopathologie (Wick, 2012). L'hématoxyline est un colorant acidophile qui se lie à l'ADN et l'ARN, colorant principalement en mauve foncé le noyau cellulaire (Alturkistani et al., 2015). L'éosine est un colorant basophile qui se lie au tissu conjonctif et donc, marque la matrice extracellulaire et le cytoplasme en rose (Alturkistani et al., 2015). De plus, des techniques de coloration au rouge neutre (ou du rouge de toluylène), un colorant cationique permettant de marquer les lysosomes par la liaison à des groupes anionique et phosphates, marquent aussi le cytoplasme des corps cellulaires (Schwab & Hülskamp, 2010). Ces trois colorations ont été utilisées dans le cadre de cette thèse, mais d'autres types de coloration de Nissl, comme les imprégnations d'argent, sont largement utilisées dans les études cytoarchitecturales (Amunts et al., 2020; Amunts & Zilles, 2015; García-Cabezas et al., 2020; Schleicher et al., 1999; Yurt et al., 2018). Les colorations de Nissl sont aussi utilisées dans des études de la morphologie de cerveaux vieillissants (Zachlod et al., 2022), de maladies

[11] https://www.oed.com/dictionary/cytoarchitecture_n

neurodégénératives (Bobinski et al., 2000) ou dans des études de validation par IRM (Alkemade et al., 2020; Hoffmann et al., 2011; Magnain et al., 2014).

2.2.3 Marquage de la myéline et myéloarchitecture

La myéloarchitecture est définie comme l'arrangement de la myéline dans le cortex cérébral, comme présenté dans la Figure 6. Elle permet d'observer un patron de distribution des fibres selon l'orientation (fibres verticales, horizontales, obliques) et la densité de la myéline dans le cortex cérébral (Brodmann, 1909; Vogt, 1910; von Economo & Koskinas, 1925). Elle est aussi utilisée conjointement à la cytoarchitecture afin de délimiter les aires corticales (Amunts & Zilles, 2015; Palomero-Gallagher & Zilles, 2019). Le marquage de la myéline est donc important pour une meilleure compréhension de la myéloarchitecture du cerveau normal en développement ou vieillissant (Foit et al., 2022; Lynn et al., 2021; Paquola et al., 2019), ou dans le cas de maladies neurodégénératives démyélinisantes (Festa et al., 2024), où la densité de myéline en histologie est l'étalon-or pour le diagnostic de la pathologie (Laule et al., 2008; Ouellette et al., 2020; Roseborough et al., 2020). Par exemple, la densité des bandes de Baillarger (Figure 6) (Fracasso et al., 2016) sont réduites chez des individus aveugles (Scholtz et al., 1981).

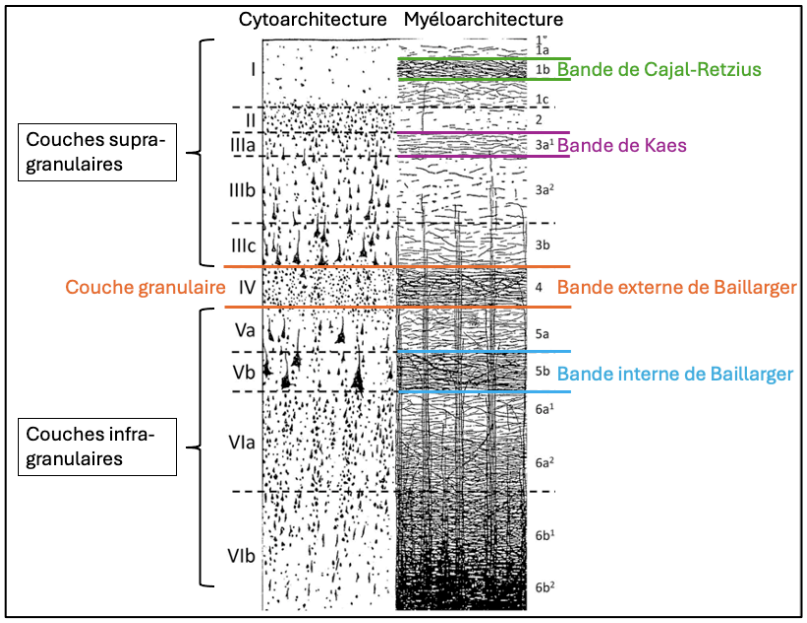


Figure 6. – Organisation du cortex cérébral selon la densité et la forme des corps cellulaires (cytoarchitecture) et la densité et l'arrangement des axones myélinisés (myéloarchitecture). Figure adaptée de Palomero-Gallagher et Zilles, 2019.

Parmi les marquages de la myéline, la coloration de HC la plus populaire en histopathologie est le bleu de luxol rapide, appelé *Luxol Fast blue* (LFB) en anglais (Lindberg & Lamps, 2018). Le LFB appartient à la famille des phtalocyanines de cuivre, un composé macrocyclique bleu soluble dans l'alcool qui se lie aux extrémités non-polaires des lipides par une réaction acide-base et des interactions hydrophobiques (Miko & Varga, 2015). De ce fait, le LFB colore les prolongements cytoplasmiques des oligodendrocytes de la myéline en bleu foncé dans la MB, et en bleu plus pâle ou même pratiquement clair dans la MG (Lindberg & Lamps, 2018). Le LFB est fréquemment utilisé dans le diagnostic de la sclérose en plaques, où les lésions de la myéline sont observées par une décoloration du tissu dans la MB (Bouman et al., 2020; Laule et al., 2008; Laule & Moore, 2018; Moll et al., 2011; Ouellette et al., 2020). De plus, le LFB est utilisé dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer ou pour observer une diminution de la densité de myéline associée avec un signal brillant en IRM, appelées les hyperintensités de la matière blanche (HMB) (Bronge et al., 2002; Gouw et al., 2011; Humphreys et al., 2019; Kuhlmann et al., 2017; Laule & Moore, 2018; Ouellette et al., 2020; Roseborough et al., 2020; Selvaraji et al., 2022).

Une autre coloration de la myéline populaire est le tétraoxyde d'osmium (OsO_4), qui permet de stabiliser la myéline et de la colorer en noir. L'OsO_4 marque cependant d'autres lipides présents dans les tissus (García-García Ó et al., 2024), ce qui est moins spécifique et donc moins utilisé.

2.2.4 Autres marquages

D'autres colorations de HC sont utilisées en neuropathologie pour marquer des populations cellulaires principales ou pour distinguer des protéines normales ou pathologiques. De ce fait, deux autres types de coloration ont été testées dans le cadre des projets de cette thèse, afin d'évaluer les effets de la fixation sur celles-ci.

2.2.4.1 Colorations à l'argent

Il existe plusieurs méthodes de coloration à l'argent utilisées pour marquer les neurones, dont la plus célèbre est la coloration de Golgi, qui marque les corps cellulaires neuronaux et leurs

prolongements (Golgi, 1873). D'autres colorations à l'argent sont utilisées afin de marquer les axones et les neurofibrilles en brun foncé ou noir, notamment la coloration de Bielschowsky, de Gallyas, de Bodian et de Campbell-Switzer (Uchihara, 2007). La coloration de Bielschowsky utilisée dans les projets de cette thèse agit par la réduction des ions d'argent en argent métallique qui précipite sur les fibres nerveuses (Ogawa, 1990). Les coupes sont soumises à un traitement avec une solution d'argent avec ammoniac, qui est ensuite développée par une solution qui agit à titre d'agent réducteur (solution de formaldéhyde et d'acide nitrique), engendrant des dépôts d'argent qui seront fixés avec du thiosulfate de sodium. Cela permet d'observer les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques séniles sur un fond jaune/beige (Uchihara, 2007). La coloration de Bielschowsky est employée dans des études portant sur les caractéristiques morphologiques, la régénération des axones, et dans les recherches sur différentes maladies neurodégénératives (p.ex., la maladie d'Alzheimer, la démence à corps de Lewy, la maladie de Parkinson), où la visualisation des enchevêtrements neurofibrillaires ou des plaques neuritiques est d'intérêt (Allsop, 2000; Elobeid et al., 2014; Fan et al., 2018; Kovacs & Budka, 2010; Love & Nicoll, 1992; Switzer, 2000; Wisniewski et al., 1989). Une ancienne étude a démontré que le Bielschowsky comme le Gallyas permettait de marquer les enchevêtrements neurofibrillaires de manière similaire (Wilcock et al., 1990), et bien que le Gallyas soit plus utilisé en histopathologie (Uchihara, 2007), nous avions plus d'expérience avec le Bielschowsky dans le laboratoire, ce qui a mené au choix de cette coloration.

2.2.4.2 Colorations de fer

Le fer est distribué de deux façon dans le cerveau : 1- par l'hémosidérine, une protéine insoluble de stockage du fer, formée d'agrégats de ferritine et 2- par la ferritine, qui est quant à elle la forme soluble et mobile de stockage du fer (Koeppen, 1995).

La coloration de bleu de Prusse, ou *Prussian blue* (PB) en anglais, aussi appelée coloration de Perls, permet de colorer le fer ionique (Fe^{3+}) de l'hémosidérine en bleu, avec une contre-coloration de rouge neutre (décrite ci-haut) afin de marquer les corps cellulaires en rose (Veuthey et al., 2014). La coloration de PB consiste à incuber le tissu dans une solution d'acide chloridrique (HCl) et de ferrocyanure de potassium ($K_4[Fe^2(CN)_6]$). Le HCl libère le Fe^{3+} de l'hémosidérine, qui réagit ensuite avec le $K_4[Fe^2(CN)_6]$ pour former un chromogène bleu (Sonoda et al., 2025). Cette

coloration n'agit pas sur la ferritine, car celle-ci est soluble dans l'eau et n'est donc pas dénaturée pour libérer le Fe^{3+}, contrairement à l'hémosidérine (Koeppen, 1995). La coloration de PB est donc connue pour révéler les dépôts de fer dans le neuropile cérébral (Churukian, 2008; Guindi, 2018; Xiao et al., 2023), un processus impliqué dans les maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer (LeVine, 1997), les maladies de petits vaisseaux (Connor & Benkovic, 1992), ou les pathologies de la substance blanche détectées par résonance magnétique (Dusek et al., 2022; Kruer, 2013; Roseborough et al., 2020).

2.3 Impact de la fixation sur l'histologie

Il est connu que la fixation impacte la qualité du tissu cérébral par sa déshydratation et entraîne donc le rétrécissement du tissu (Quester & Schröder, 1997). Cependant, la fixation est nécessaire à la préservation des différentes structures colorées. Les différentes colorations décrites plus hauts peuvent donc être influencées par les trois solutions de fixation utilisées (SFA, SSS et SA).

2.3.1 Impact sur les différents types de colorations

L'IHC est dépendante de la préservation des antigènes, qui peuvent être dénaturés ou liés de manière covalente avec d'autres protéines ou macromolécules par le formaldéhyde. Des quantités différentes d'aldéhydes libres dans ces solutions pourraient donc former plus ou moins de liens covalents et influencer le *cross-linking* et donc, la disponibilité des antigènes pour l'IHC.

De plus, la fixation peut avoir un impact sur la qualité des différentes colorations d'HC selon le procédé chimique impliqué. Par exemple, la coloration de Nissl est dépendante de la préservation du RER dans la cellule qui pourrait potentiellement être affecté par différents procédés chimiques. En effet, il a déjà été démontré dans *C. elegans* que les ribosomes et les RER sont distendus après leur fixation (Rolls et al., 2002). Il convient également de noter que le H&E marque les composés d'ADN et de matrice extracellulaire en conditions basophile et acidophile, et pourrait donc être modifié par le pH des solutions chimiques utilisées (Peter, 1958; Wick, 2019).

La coloration de LFB pourrait également être affectée par les différentes solutions de fixation, étant donné que la molécule est soluble dans l'alcool (Miko & Varga, 2015), et que différents types d'alcools font partis des formulations chimiques de la SSS et de la SA (Benet et al., 2014;

Coleman & Kogan, 1998). De plus, il est connu que la préservation de la myéline par la fixation entraîne des changements dans la densité des fibres, et donc, dans les résultats qui seront obtenus par LFB (Schmierer et al., 2010; Schmierer et al., 2008). Une étude récente à laquelle j'ai également collaboré a aussi montré qu'un déclin dans l'intensité du marquage de LFB est corrélé avec un temps de post-fixation accru (Ma et al., 2024).

La coloration de Bielschowsky est également susceptible à des changements selon la qualité de la fixation. En effet, une étude sur la technique de révélation à l'argent a montré que l'extraction des lipides à l'aide de solvants organiques tels que l'éthanol (présent dans la SA) peut entraîner une imprégnation insatisfaisante et une mauvaise coloration (Wolman, 1958). De plus, puisque la technique de Bielschowsky repose sur la réduction des ions argent en argent métallique et que ce processus est sensible, l'argent peut se déposer sur d'autres structures que les cibles, comme la poussière, ou d'autres ions (p.ex., Na^+ dans la SSS) (Humason, 1967). De ce fait, la formulation chimique ionique de chaque solution pourrait avoir un impact sur la qualité de la coloration.

Finalement, puisque la coloration de PB est dépendant de l'action du HCl et du ferrocyanure de potassium pour libérer le Fe^{3+} de l'hémosidérine, la formulation chimique des différentes solutions de fixation pourrait aussi avoir un impact sur la qualité de PB. En effet, un fixateur acide pourrait causer la dissolution ou la diffusion du fer (Sonoda et al., 2025).

2.3.2 Études qui utilisent la SSS ou la SA en histologie

Comme mentionné précédemment, les trois solutions de fixation pourraient exercer une influence sur la qualité du marquage histologique des populations cellulaires selon différentes méthodes. Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est concentrée sur l'évaluation histologique des cerveaux humains fixés avec la SSS ou la SA. Certaines études ont évalué la préservation de d'autres types de tissu avec des SA différentes, comme le foie et le tissu musculaire (Shetty et al., 2020), le foie, le rein, les poumons et le cœur (Rae et al., 2018), la glande thyroïde, la moëlle osseuse, le foie et les muscles (Hammer et al., 2012) ou le testicule bovin (Cabrera et al., 2017). Ces études montrent d'ailleurs que les solutions d'alcools sont appropriées pour une bonne fixation et préservation des structures lorsque colorées par H&E.

De plus, une étude a montré un tissu neuronal de qualité suffisante dans des cerveaux de chiens fixés avec la SSS et colorés par H&E uniquement (Lombardero et al., 2017). Une autre étude a comparé la qualité des cerveaux de rats Wistar fixés avec la SFA, la SSS et une SA dont la composition diffère légèrement de celle utilisée dans le laboratoire d'anatomie de l'UQTR (Martins-Costa et al., 2022). Finalement, Tomalty et al., (2019) montrent, par des colorations de H&E et de bleu de toluidine, la préservation des neurones de cerveaux de cochons fixés avec une SA à base de phénol.

Les études présentées dans cette thèse montrent ainsi pour la première fois des protocoles d'histologie avec différents types de colorations (IHC, IF et HC) sur des cerveaux humains des laboratoires d'anatomie fixés avec plusieurs solutions (SFA, SSS, SA). Plusieurs antigènes et populations cellulaires importantes ont été considérées afin d'inclure les cellules gliales qui sont parfois négligées dans des études de cytoarchitecture et myéloarchitecture. Puisque l'histologie est l'étalon-or, mais comporte des désavantages, l'IRM a aussi été évaluée dans le cadre de cette thèse, ainsi que le recalage d'images entre l'IRM et l'histologie à des fins de corrélations multimodales. Ces sujets sont présentés dans les sections suivantes (Chapitre 1, sections 3 et 4, respectivement).

3. L'imagerie par résonance magnétique

L'IRM est un type d'imagerie médicale non invasive courante qui a été mise sur pied entre 1950 et 1970 par le biophysicien américain R. Damadian qui observe les caractéristiques magnétiques des tissus (Kastler, 2011a). La première image de résonance magnétique a été conçue ensuite par le professeur P. Lauterbur et le physicien P. Mansfield en 1973. Damadian a ensuite développé le tout premier scanneur en 1977, où à l'époque, cinq heures étaient nécessaires à l'acquisition d'une seule image du corps entier (Kastler, 2011a).

3.1 Concepts généraux

3.1.1 Phénomènes physiques de la résonance magnétique

L'IRM utilise des champs magnétiques et des ondes de radiofréquences (ORF) qui agissent sur les protons d'hydrogène (H^+) présents dans l'eau et donc, présents dans les différents tissus du corps

humain (Kastler, 2011b; Schild, 1990; Weishaupt et al., 2006). Les protons ont une magnétisation intrinsèque : la précession et le *spin* (Kastler, 2011b; Schild, 1990; Weishaupt et al., 2006). Lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique puissant (appelé B_0) comme dans un scanneur d'IRM, les protons s'alignent (parallèlement ou antiparallèlement à B_0) et tournent autour d'un axe de magnétisation longitudinal (phénomène de précession), mais aussi sur eux-mêmes (phénomène de *spin*) (Kastler, 2011b; Schild, 1990; Weishaupt et al., 2006). Dans leur précession, les protons parallèles sont en phase de basse énergie (E_1), alors que les protons antiparallèles ont une énergie plus élevée (E_2) (Kastler, 2011b; Schild, 1990; Weishaupt et al., 2006). Pour l'acquisition d'une image, une ORF est envoyée (perturbation de B_0 en B_1), ce qui perturbe l'énergie des protons qui changent d'axe (certains protons E_1 deviennent E_2) et dont leur précession se rephase, pour créer une magnétisation transversale. C'est lorsque l'ORF est arrêtée, que les protons retournent vers leur état d'équilibre dans B_0 : on appelle ce phénomène, la relaxation (Figure 7A). Le temps que prennent les protons à revenir à leur état d'équilibre peut être mesuré dans leur axe longitudinal, où l'aimantation change à nouveau les états d'énergie des protons parallèles et antiparallèles (Figure 7B); c'est le temps de relaxation 1 (T1) (Figure 7C). De plus, la précession des protons se déphasent dans l'axe transversal (Figure 7D), ce qui est reflété par un temps de relaxation 2 (T2) (Figure 7E) (Kastler, 2011b; Schild, 1990; Weishaupt et al., 2006).

C'est par l'utilisation de différents paramètres d'envois de l'ORF que différentes images peuvent être créées (Kastler, 2011c). La pondération d'une séquence signifie que les paramètres sont spécifiquement choisis capturer l'état de *spin* et de précession des H^+ lors de leur relaxation, à différents moments, pour obtenir des contrastes distincts entre les différents types de tissu (Brown et al., 2014). Des paramètres comme le temps d'écho (TE), le temps d'inversion (TI), le temps de répétition (TR) et l'angle de basculement (*flip angle* (FA)) sont utilisés pour pondérer les séquences en T1 ou en T2 (Brown et al., 2014; Kastler, 2011b). Le TE est la durée qui sépare le milieu de l'ORF et le milieu du temps de lecture ou d'acquisition de l'image (moment où le signal est capté), qui est court pour des séquences pondérées T1 et long pour des séquences pondérées T2 (Kastler, Vetter, Patay, et al., 2011). De plus, pour accentuer la pondération en T1, on peut ajouter le TI, qui est un intervalle de temps qui sépare une impulsion de 180° initiale et la suite du rephasage des protons et d'acquisition de l'image (Kastler, Vetter, Patay, et al., 2011). Le TR

est l'intervalle de temps qui séparant deux excitations successives des *spins* des protons (en d'autres mots: temps entre les envois des ORF) (Kastler, Vetter, Patay, et al., 2011), qui sera court pour une pondération en T1 et long pour pondérer en T2. Finalement, le FA est le degré auquel l'ORF fait basculer le vecteur de magnétisation loin de sa position le long de B_0.

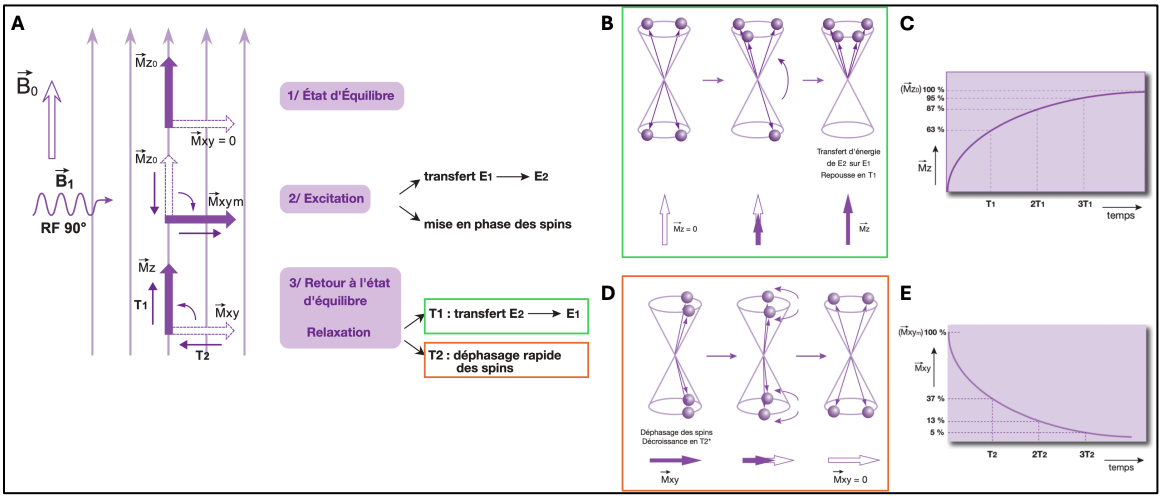


Figure 7. – Interactions entre l'ORF et les protons dans le champ magnétique pour la création des phénomènes de relaxation. A) Perturbation de l'état d'équilibre par une ORF et phénomène de relaxation lors de l'arrêt de l'ORF. B) Relaxation longitudinale C) Temps requis pour la relaxation longitudinale. D) Relaxation transversale. E) Temps requis pour la relaxation transversale. Figure adaptée de Kastler and Vetter, 2011, Elsevier Masson.

3.1.2 Les appareils d'IRM et le concept de Tesla

Tesla (T) est la mesure de la force du champ magnétique (c.-à-d. puissance de l'aimant) (Schild, 1990). En règle générale, plus le nombre de tesla augmente, plus l'image peut être acquise à une plus haute résolution (Schild, 1990), et plus on a de signal par rapport au bruit de fond (ce qui représente une meilleure qualité d'image), appelé le rapport signal-bruit (en anglais, *signal-to-noise ratio).* Cela peut être utile dans la délimitation de petites structures anatomiques ou de petites lésions dans le cerveau, par exemple (Vachha & Huang, 2021).

En général, les machines d'IRM utilisés dans les hôpitaux ont 0.5T, 1.5T, ou 3T (ce dernier dit de haut champ magnétique; *high-field*) (van Zijl & Knutsson, 2019). Des machines d'IRM à plus de 3T sont dites à ultra-haut champ magnétique, mais celles-ci ne sont généralement pas utilisées en

clinique, puisque les champs magnétiques sont trop puissants, entraînant des artéfacts d'inhomogénéité ou de susceptibilité magnétique, en plus de provoquer un inconfort chez les patients ou avec des malaises vestibulaires (Boulant et al., 2024; van Zijl & Knutsson, 2019). Ces appareils sont toutefois grandement utilisés en recherche sur des cerveaux *ex vivo*, soit des appareils de 7T (Alkemade et al., 2020; Edlow et al., 2019; Laule et al., 2008; Roseborough et al., 2020), 9.4T (Fatterpekar et al., 2002; Kwan et al., 2017; Nazemorroaya et al., 2022; Reeves et al., 2016; Yushkevich et al., 2009), ou même des appareils de 11.7T (Beaujoin et al., 2018). Récemment, grâce à la modification de certains paramètres et des tests de santé concluants, un groupe de scientifiques Parisiens a scanné des patients *in vivo* dans un appareil 11.7T appelé Iseult (Boulant et al., 2024), permettant d'obtenir des images des cerveaux à une résolution de 0.19 x 0.19 x 1 mm^3 en seulement 5 minutes (Boulant et al., 2024; Eisenstein, 2024).

Pour les projets utilisés dans cette thèse, pour un même temps d'acquisition (15 heures) (Dadar et al., 2024), des scans (avec plusieurs séquences différentes) de blocs de tissus d'environ 3 x 3 x 3 cm ont été acquis à une résolution de 0.13 x 0.13 x 0.5 mm dans une machine 7T (chapitre 4), alors que des scans d'hémisphères cérébraux *ex vivo* à 3T ont été acquis avec une résolution entre 0,5 et 0,58 mm^3. Il faut noter que la résolution de l'image dépend aussi du temps d'acquisition (Dadar et al., 2024), où plus le temps est long, plus on peut augmenter la résolution. Le temps d'acquisition est différent entre des IRM *in vivo* et *ex vivo* (voir la section 3.3 plus bas pour une explication exhaustive des différences entre les IRM *in vivo* et *ex vivo*), d'où la différence de résolution observée entre nos études *ex vivo* et celle de Boulant et al., bien que le champ magnétique de leur machine soit beaucoup plus puissant que les nôtres (Boulant et al., 2024).

3.2 Comment classifier les séquences d'IRM?

On peut classifier l'IRM en trois grandes catégories : 1- L'IRM qualitative, aussi appelée l'IRM structurelle, déterminée par des séquences pondérées, où les voxels qui composent l'image ont une valeur numérique arbitraire et dynamique (Brant-Zawadzki et al., 1992; Wu et al., 2022);

2- L'IRM quantitative, où les temps de relaxation des images sont mesurés en millisecondes (ms), ce qui produit des cartes de relaxation comparables (Goldman, 2001). L'IRM quantitative inclue aussi certaines séquences qui produisent des images avec des voxels dont la valeur est non-

arbitraire, mais qui n'est pas mesuré avec une unité de temps (mesure de ratios, proportions ou qui mettent en relation deux unités différentes) (Cloney et al., 2018; Roebroeck et al., 2019; Tax et al., 2022; Yiannakas et al., 2020). Ces images sont donc parfois considérées comme semi-quantitatives, puisqu'elles n'informent pas sur l'unité de temps du phénomène de la relaxation;

3- L'IRM fonctionnelle, qui consiste en des séquences BOLD (*Blood Oxygen Level Dependent*) qui mesurent l'activité cérébrale en détectant les changements dans les propriétés magnétiques de l'hémoglobine du sang en circulation (Glover, 2011). (Note : l'IRM fonctionnel ne sera pas abordée plus en détails puisqu'elle sort du concept de cette thèse : nos cerveaux sont *ex vivo*).

3.2.1 L'IRM qualitative – les séquences pondérées

L'IRM fonctionne par la transformation des signaux en échelle de gris, basée sur les différences dans la relaxation des H^+ (Kastler & Vetter, 2011). Cette échelle de gris est construite arbitrairement et est dite dynamique (en anglais, *intensity dynamic range*) : elle se base sur la valeur la plus brillante (c.-à-d., la plus hyperintense) et la valeur la moins brillante (c.-à-d., la plus hypointense) de l'objet (cerveau) imagé (Mafraji, 2023). En principe, l'IRM qualitative n'est donc pas quantifiable de façon absolue, puisque la valeur numérique de chaque voxel de l'image est arbitraire, mais elle reflète le contraste de gris visible relatif aux autres contrastes. Cependant, les échelles de gris (c.-à-d. les valeurs numériques des voxels) de deux images différentes peuvent être comparées si 1-les acquisitions sont faites dans la même machine avec les mêmes paramètres d'acquisition (c.-à-d., TE, TR, TI, etc.), et 2-que l'on procède à la normalisation de l'échelle de gris en donnant des valeurs numériques de 1 à 100 entre le voxel le plus hypointense et le voxel le plus hyperintense (Shah et al., 2011). Ces séquences sont souvent appelées « Séquences structurelles », puisqu'elles sont utilisées pour observer et quantifier (p. ex., par volumétrie) la structure normale et pathologique de l'anatomie du cerveau.

Les séquences structurelles les plus utilisées exploitent le phénomène de relaxation des protons tant longitudinale que transversale, en produisant les séquences pondérées T1 et en T2 respectivement (Goldman, 2001), séquences qui ont été utilisées dans le cadre de cette thèse. Il existe aussi d'autres séquences pondérées fréquemment utilisées, mais plutôt *in vivo* qu'*ex vivo*, comme la séquence pondérée en densité protonique (DP) (avec un TR long et un TE court)

(Kastler, Vetter, Patay, et al., 2011) et la séquence FLAIR (*Fluid-attenuated Inversion Recovery*) (comme un T2 mais avec un TI long) (Kastler, 2011c).

L'IRM pondérée du cerveau permet de distinguer trois types de tissu différents : la MB, la MG et le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Kastler, Vetter, Patay, et al., 2011). De plus, l'IRM pondérée, spécialement en T2 (et aussi en DP et FLAIR *in vivo*) permet d'observer les HMB dans des cerveaux vieillissants normaux ou dans des cerveaux pathologiques (Debette & Markus, 2010). En T1, la MG est hypointense en relation avec la MB et le LCR est le signal le plus hypointense (Figure 8A). En revanche, en T2, la MG est hyperintense en relation avec la MB et le LCR est le signal le plus hyperintense (Figure 8B). En DP, la MG est hyperintense en relation avec la MB, et le LCR est le signal le plus ou moins hyperintense, dépendamment du TR. En FLAIR, la MG est hyperintense en relation avec la MB, et le LCR est le signal le plus hypointense. Comme expliqué précédemment, PD et FLAIR sont des séquences généralement utilisées *in vivo* (Kastler, Vetter, Patay, et al., 2011). Elles n'ont donc pas été utilisées dans le cadre de cette thèse puisqu'elles ne fournissent pas plus d'information qu'un T2 pondéré traditionnel dans les cerveaux *ex vivo* (puisque le fluide n'est pas du LCR pur, les HMB sont visibles sur un T2 même si le signal des ventricules n'est pas supprimé, p.ex., dans un FLAIR) (Kastler, Vetter, Patay, et al., 2011).

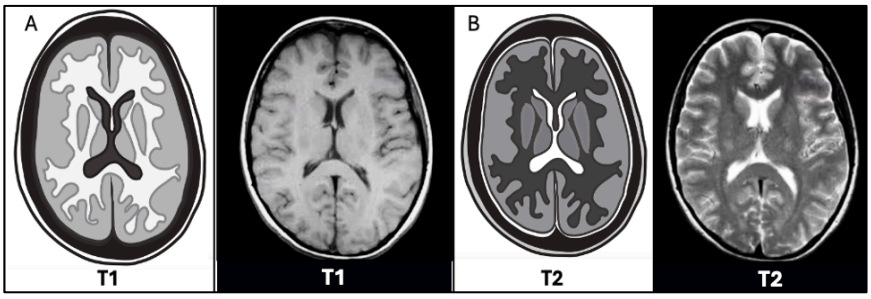


Figure 8. – Contrastes de gris entre la matière blanche, la matière grise et le liquide céphalorachidien dans différentes séquences pondérées. A) Séquence pondérée en T1. B) Séquence pondérée en T2. Figure adaptée de Kastler and Vetter, 2011.

3.2.1.1 Types de stimulation pour créer des images pondérées

Les scanneurs de résonance magnétique produisent différents types d'images, dépendamment du type d'impulsion et d'ORF sélectionnée (différents B_1 peuvent être produits). Les différentes

séquences dépendent donc de la manière dont les protons sont excités (Zhernovaia, 2021). Avec des ORF, on obtient des images dites « Spin Echo (SE) », mais on peut aussi combiner une ORF avec un gradient d'inversion pour générer des images « Gradient Echo (GRE) » (Carpenter & Williams, 1999). Après l'ORF, le gradient provoque une dispersion des phases de spins des protons (*dephasing gradient*). Le gradient est ensuite inversé (ce qu'on appelle *rephasing gradient*) et les spins se réalignent pour produire un écho de gradient.

Dans les séquences GRE, une seule ORF est utilisée, ce qui permet d'obtenir l'écho plus rapidement que dans les séquences SE; le TE est donc plus court dans les GRE que les SE (Elster, 1993; Markl & Leupold, 2012). De plus, un faible FA est utilisé, ce qui permet de réduire le TR et permet aux temps d'acquisition d'être réduits dans les séquences GRE (Elster, 1993; Markl & Leupold, 2012). En contrepartie, le rephasage du GRE refocalise seulement les spins déphasés par le gradient lui-même; les autres déphasages (à cause de B_0 ou de la susceptibilité magnétique du tissu) ne sont pas corrigés, contrairement aux séquences SE (Elster, 1993; Markl & Leupold, 2012). De ce fait, les GRE sont plus sensibles aux artéfacts liés aux variations du champ magnétique. Les SE ou les GRE sont donc plus ou moins employées selon les conditions, considérant leurs avantages et inconvénients (Kakite et al., 2011).

3.2.1.2 Séquences pondérées T1 et T2 utilisées

La séquence pondérée T1 est le type d'imagerie structurelle le plus utilisé en recherche (Trampel et al., 2019), car elle permet d'évaluer le volume du cerveau (Jung et al., 2025) et de visualiser la neuroanatomie normale et pathologique (MB, MG et LCR) (Heim et al., 2017). Le temps de relaxation T1 (longitudinal) est défini comme le temps auquel un proton excité retourne à son équilibre dans B_0.

Parmi les différentes séquences T1 pondérée, la *Magnetization-prepared rapid gradient-echo* (MPRAGE) est largement utilisée, puisqu'elle offre un contraste plus élevé comparativement aux autres séquences T1 pondérées (Brant-Zawadzki et al., 1992). Comme expliqué précédemment, cette séquence GRE utilise une impulsion préparatoire avant l'ORF excitatrice, ce qui accentue le contraste MG-MB (Markl & Leupold, 2012). C'est la séquence MPRAGE qui a été utilisée dans le cadre du projet présenté au chapitre 5 de cette thèse.

La séquence pondérée T2 est également grandement utilisée en clinique et dans la recherche, puisqu'elle permet de mieux visualiser les lésions ou anomalies de la MB (hyperintense en relation avec la MB considérée normale), comme des œdèmes, des kystes ou des hémorragies, qui peuvent changer dans leur degré d'intensité au fil du temps (Dadar, Mahmoud, Zhernovaia, et al., 2022). De plus, la séquence pondérée T2 est également beaucoup plus utilisée en recherche sur les cerveaux *ex vivo*, puisque le signal ressemble plus à celui des cerveaux *in vivo* que la séquence pondérée T1 (Dadar et al., 2024; Dawe et al., 2009; Tovi & Ericsson, 1992).

Dans les protocoles conduits pour les projets de cette thèse, des séquences T2-SPACE (IRM 3T des hémisphères ou des têtes) et T2-TurboRARE (IRM 7T des blocs) ont été utilisées. La séquence T2-SPACE (*Sampling Perfection with Application-Optimised Contrasts*) utilise le SE à différents FA pour accentuer le contraste et diminuer la susceptibilité aux artéfacts (Vargas & Dietemann, 2017; Wu et al., 2022). La T2-TurboRARE (*Rapid Acquisition with Refocusing Echoes*) utilise des multiples SE très rapides (*Fast spin echo*, ou FSE=Turbo) en diminuant les TR, réduisant considérablement le temps d'acquisition (Hennig et al., 1986).

3.2.2 L'IRM semi-quantitative

D'autres séquences semi-quantitatives ont été développées; elles sont mesurables et comparables entre les différents cerveaux, mais ne mesurent pas le phénomène de relaxation en unité de temps. Parmi elles, on trouve les images avec transfert de magnétisation (ou *Magnetization Transfer Ratio* -MTR-) (Yiannakas et al., 2020), l'imagerie pondérée en diffusion (ou *Diffusion-weighted imaging* -DWI-) (Kingsley, 2006) ou l'imagerie pondérée par susceptibilité (ou *susceptibility weighting imaging* -SWI-) avec la cartographie quantitative de la susceptibilité (ou *Quantitative susceptibility mapping* -QSM-) (Duyn, 2013; Haacke et al., 2009).

La MTR utilise le transfert de magnétisation, une mesure corrélée avec le contenu macromoléculaire du tissu (Arlinghaus et al., 2016). Une ORF est envoyée afin de saturer les protons des macromolécules, qui enverront leur magnétisation (c.-à-d. émet le transfert) vers les protons d'eau libres (Yiannakas et al., 2020). Des ratios Protons macromoléculaires/Protons libres sont calculés, dont les valeurs numériques de voxels sont rapportées comme pourcentages. De faibles valeurs MTR indiquent des dommages macromoléculaires et donc, des changements

structurels (perte de myéline, œdème) qui résultent en changements de contraste (Cloney et al., 2018).

La *DWI* met en évidence les mouvements des molécules d'eau dans le tissu qui varient en fonction des propriétés du milieu dans lequel elle se trouve (Kastler, Vetter, Pousse, et al., 2011). L'eau diffuse donc plus ou moins rapidement dans la MG, la MB ou le LCR, puisque leur contenu moléculaire est différent (Kastler, Vetter, Pousse, et al., 2011). La diffusion est mesurée par des cartes d'anisotropie fractionnelle (ou *Fractional Anisotropy Maps),* qui varient entre 0 et 1, calculée par des valeurs scalaires qui représentent l'amplitude de la diffusion de l'eau le long des trois axes principaux d'un ellipsoïde de diffusion (Minati & Węglarz, 2007). Des valeurs qui augmentent (se rapprochant de 1) sont un indicateur que l'eau diffuse plus rapidement et donc, que la MB est préservée (c.-à-d. des fibres nerveuses sont alignées, et préservées avec une direction), alors que des valeurs en baisse suggèrent une perte de cette organisation, qui peut être due à des lésions (Figley et al., 2021).

La QSM est une carte qui utilise une séquence SWI de multiples GRE utilisée pour détecter des changements de susceptibilité magnétique (χ), ce qui est déterminé par la présence de fer, de calcium, d'hémosidérine et de désoxyhémoglobine (Harada et al., 2022). Le dipôle magnétique interagit avec le fer et le calcium pour désorganiser la susceptibilité locale (Acosta-Cabronero et al., 2018). Des augmentations de QSM révèlent une augmentation de particules diamagnétiques comme le fer, ce qui peut être utile dans l'identification d'hémorragies cérébrale (Haller et al., 2021).

3.2.3 L'IRM quantitative

Finalement, l'IRM quantitative vise précisément à obtenir les valeurs des temps de relaxation de différentes structures du cerveau en exploitant les paramètres physiques spécifiques et micro-structurels des protons qui font parties de différents types de tissus (relaxation longitudinale=T1, relaxation transversale=T2) (Murray et al., 2012; Schmierer et al., 2008; Shatil et al., 2018; Sled & Nossin-Manor, 2013; Weiskopf et al., 2021). L'IRM quantitative permet donc de comparer des cerveaux entre eux, avec une mesure quantifiable avec l'unité de temps (c.-à-d. on mesure le

temps que prend la relaxation des protons dans le tissu dans un voxel déterminé et qui changera en fonction de la composition tissulaire dudit voxel).

Les temps de relaxation sont calculés à partir de plusieurs images (avec multiples TE, minimum 2), afin de calculer un delta (δ) représentant la différence des temps de relaxation (c.-à-d., permet de calculer la dynamique de *spin* et de précession du proton dans son processus de relaxation) (Bloch, 1946). En T1, plusieurs FA ou différents TI seront utilisés afin de faire plusieurs images d'echo et ainsi calculer le temps de relaxation (calculé en ms/voxel). En T2, plusieurs images sont acquises avec des TE différents, ce qui permet de mesurer la décroissance du signal et de calculer le temps de relaxation transvers (Goldman, 2001). De plus, les cartes T2* (temps de relaxation T2 mesurés par des images de GRE) comprennent la relaxation T2 ainsi que la décroissance supplémentaire due aux inhomogénéités du champ magnétique et des champs magnétiques locaux (où la susceptibilité magnétique est augmentée par le GRE) et sont donc proportionnelles à la quantité de fer (Weishaupt et al., 2006).

Même si les projets de cette thèse n'ont pas traité les images semi-quantitatives ou quantitatives, plusieurs de ces séquences ont tout de même été acquises (images de diffusion, de susceptibilité et des séquences de GRE avec plusieurs FA et TE pour générer de cartes de relaxation T1 et T2*), basé sur les protocoles de la Douglas-Bell Canada Brain Bank (DBCBB) (Dadar et al., 2024). Les images cérébrales produites par ces séquences, avec leurs valeurs numériques respectives, pourront être utilisées dans le futur pour des corrélations avec l'histologie (voir la section 4 du présent chapitre, le recalage), puisque les séquences pourront également être recalées aux différentes coupes histologiques.

3.3 L'IRM du cerveau *ex vivo*

3.3.1 Avantages et inconvénients en relation à l'IRM *in vivo*

Comme mentionné précédemment, l'IRM *in vivo* permet d'identifier des structures du cerveau humain normal et en conditions pathologiques, où des lésions peuvent être observées. Par exemple, c'est le seul outil disponible pour visualiser l'étendue d'un accident vasculaire cérébral (Kloska et al., 2010), mais comporte des limites. En effet, il est presque toujours impossible de

valider ces observations par l'étalon-or (l'histologie) chez les patients (c.-à-d., les biopsies cérébrales sont des procédures très invasives qui comportent des risques de morbidité élevés). De plus, les protocoles d'IRM utilisés en milieu médical (soit en clinique ou en recherche médicale *in vivo*) sont optimisés pour réduire le temps d'acquisition de chaque séquence le plus possible, puisque généralement, les protocoles demandent plusieurs séquences différentes (p.ex. une étude d'IRM peut combiner T1 pondéré, T2 pondéré, FLAIR, diffusion, etc.). La combinaison de séquence s'additionne et augmente les temps d'acquisition, où le patient peut se sentir inconfortable, ce qui réduira la qualité des images par des artéfacts de mouvements. Pour contrer ces inconforts, les temps d'acquisition doivent être diminués, ce qui détermine que la résolution doit aussi être diminuée (et cela se combine toujours avec les artéfacts d'image créés par les mouvements des patients) (Nárai et al., 2022). Ces séquences d'utilisation médicale ne donnent pas d'indice sur les limites anatomiques microscopiques (p.ex. les aires de Brodmann) et cellulaires du cerveau (Augustinack & van der Kouwe, 2016). De ce fait, l'IRM *ex vivo* se développe depuis les dernières décennies, afin de permettre des corrélations plus précises avec l'histologie et de profiter des avantages considérables de l'IRM *ex vivo* pour la recherche neuroscientifique (Humphreys et al., 2019).

En effet, les scans *ex vivo* peuvent être acquis à très haute résolution, étant donné que le temps d'acquisition peut être augmenté considérablement, comparativement aux temps d'acquisition en clinique, où un patient ne peut rester des heures dans la machine. Par exemple, des scans *ex vivo* sont acquis dans des scanneurs 3T à des résolutions de voxel entre 0.5 et 0.7 mm^3 pendant 15h (Dadar et al., 2024), ou même dans des scanneurs 7T ou 11.4T, ce qui permet d'augmenter grandement la résolution des images et les détails observés (Vachha & Huang, 2021). Ceci facilite ainsi les corrélations avec l'histologie, comme montré dans le cas d'un cerveau scanné avec une résolution de voxel isotropique de 100 μm^3 (Edlow et al., 2019). En comparaison, une IRM 3T *in vivo* avec une résolution de voxel isotropique entre 1 et 3 mm^3 peut prendre (selon le nombre de séquences acquises) jusqu'à 1 heure ou plus (Dadar et al., 2024; Maranzano et al., 2019; Maranzano et al., 2016), ce qui peut limiter les détails observés dans les structures anatomiques normales ou pathologiques. Par exemple, une étude a comparé des hippocampes de cerveaux *in vivo* vs *ex vivo,* où l'IRM *in vivo* s'est fait à 3T avec une résolution de 1 mm^3 et de 0.4 x 0.4 x 2 mm

pour les séquences T1 et T2 pondérées, respectivement, alors que les IRM *ex vivo* ont été acquises avec un scanneur 9.4T à haute résolution de 0.2 mm^3 pour chaque séquence (Wisse et al., 2017).

De plus, les cerveaux *ex vivo* sont immobiles dans le scanneur, entraînant moins d'artéfacts d'images (Nárai et al., 2022), contrairement aux patients qui peuvent être inconfortables et bouger, surtout dans le contexte où ils sont atteints de pathologies motrices, comme la maladie de Parkinson (Duffy et al., 2021). De plus, l'IRM *ex vivo* a été prouvée comme le type d'imagerie le plus précis pour détecter et déterminer la taille des lésions du cerveau (Augustinack & van der Kouwe, 2016). C'est pour ces raisons que les chercheurs qui utilisent l'IRM se tournent aussi vers des cerveaux *ex vivo* fournis par les banques de cerveaux et ont développé des protocoles qui considèrent le tissu fixé avec une SFA (Dadar et al., 2024).

Cependant, les IRM *ex vivo* comportent aussi des désavantages par rapport à l'IRM *in vivo*. En effet, les cerveaux post-mortem sont déshydratés (perte d'eau lors de la mort), en plus d'être fixés (Roebroeck et al., 2019), ce qui modifie les propriétés des tissus puisque le contenu en H^+ change. Le changement de quantité de protons entraine des différences dans la relaxation et explique les changements observés dans le contraste des séquences pondérées *ex vivo* (Raman et al., 2017; Shatil et al., 2018). En effet, les temps de relaxation T1 des tissus plongés en immersion dans la SFA diminue progressivement entre 2 semaines d'immersion et atteint un plateau après 6 mois (Raman et al., 2017). Plusieurs autres études ont démontré des changements dans la diffusion et dans les temps de relaxation en raison de la fixation (Pfefferbaum et al., 2004; Shatil et al., 2018; Tovi & Ericsson, 1992; Yong-Hing et al., 2005). De plus, le contraste MB-MG des cerveaux post-mortem en T1 pondéré est inversé par rapport aux IRM *in vivo*: la MB devenant hypointense par rapport à la MG du cortex qui apparait hyperintense (Kojima et al., 2024). Par ailleurs, les figures des études qui ont montré des changements dans les temps de relaxation appuient l'inversion de contraste en T1 (Figure 1 de Raman et al., 2017 (Figure 9A); Figure 3 de Yong-Hing, et al., 2005 Figure 9B). Les protocoles d'IRM *ex vivo* à haute résolution développés récemment par Dadar et al., montrent également ces changements dans la séquence T1 lors de la fixation où entre la MB et la MG est inversé (Dadar et al., 2024) (Figure 9C).

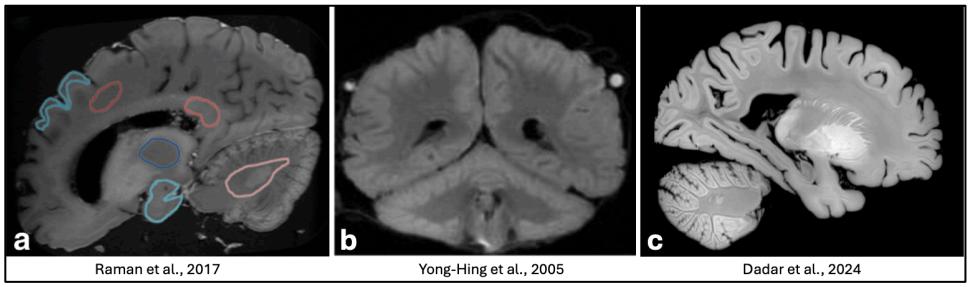


Figure 9. – Contrastes entre la matière blanche et la matière grise inversé dans les cerveaux post-mortem fixés avec formaldéhyde en séquence T1 pondérée. A) Figure 1 de Raman et al., 2017; B) Figure 3 de Yong-Hing et al., 2005; C) Figure 2 de Dadar et al., 2024.

Quant aux séquences pondérées T2, ce changement de contraste n'est pas observé; le contraste MB-MG *ex vivo* est plus similaire au contraste MG-MB *in vivo* (Dadar et al., 2024). Cependant, les temps de relaxation de T2 diminuent progressivement pendant la fixation, mais de manière moins accentuée qu'en T1, et surtout dans les structures profondes (Dawe et al., 2009; Shatil et al., 2018).

3.3.2 IRM du cerveau *in situ*

Les cerveaux *in situ* (c.-à-d. cerveaux encore dans la boîte crânienne, fixés par perfusion de solutions anatomiques), ont été scannés par IRM afin de corréler les résultats avec : 1- des scans d'IRM *ex situ* (IRM des hémisphères complets et IRM de blocs de tissu), 2- des coupes histologiques de blocs de tissu, et 3- des scans *in vivo*, quand ils sont disponibles (Note : ce point sera expliqué plus en détails dans la section 4. Recalage). Par exemple, la courte communication présentée dans cette thèse (chapitre 6) est issue d'observations faites sur les scans *in situ* des têtes qui sont fixées au laboratoire d'anatomie.

Pour les scans *in situ*, la tête est préparée par une dissection des muscles trapèzes, splénius, semi-épineux et érecteurs du rachis afin d'accéder aux vertèbres cervicales (idéalement entre C4 et C7). Une laminectomie permet ensuite d'accéder à la moelle épinière pour fermer le sac dural par ligature, permettant ainsi de conserver le LCR à l'intérieur des méninges et donc, des ventricules. Par la suite, les vertèbres sont désarticulées et la dissection des tissus mous se poursuit antérieurement afin de détacher complètement la tête (Maranzano et al., 2020). Ensuite, la tête est mise dans un sac hermétique, et emballée sous vide (avec processus d'aspiration de l'air par

une *vacuum*). Ce processus est nécessaire puisque les séquences GRE utilisées sont très sensibles aux artéfacts d'air (l'air a une susceptibilité magnétique très faible qui cause une perte de signal très marquée dans les séquences T2 pondérées) (Jeon & Kang, 2009).

Il est essentiel de scanner les cerveaux *ex vivo in situ*, c'est-à-dire encore dans la boîte crânienne, si l'on veut imager le cerveau dans l'environnement qui se rapproche le plus de celui d'un cerveau *in vivo.* En effet, l'extraction de cerveau entraîne des distorsions (Insausti et al., 2023) qui peuvent donc biaiser les résultats obtenus par IRM, soient dans des études de volumétrie de différentes structures ou d'intensité du signal (Dawe et al., 2009; de Guzman et al., 2016; Grinberg et al., 2008; Kotrotsou et al., 2014; Neuhaus et al., 2025). De ce fait, l'IRM *in situ* permet d'imager le cerveau complet et de possiblement faire des liens directs avec des IRM qui auraient été obtenus avant la mort du patient. Cependant, ces avantages ne viennent pas sans inconvénients. Le LCR est difficile à garder à l'intérieur de la boîte crânienne et pourrait se mélanger au fixateur, ce qui pourrait également changer les contrastes visibles en IRM. De plus, par l'embaumement des corps, ainsi que la dissection de la tête, l'air est susceptible d'entrer dans les vaisseaux et dans l'espace subarachnoïdien (et donc dans les ventricules) (Garrood et al., 2025). Les artéfacts d'air sont nuisibles aux analyses quantitatives du signal subséquentes (Jeon & Kang, 2009). De plus, scanner des têtes *in situ* est logistiquement plus compliqué si l'IRM n'est pas à portée de main, comme au laboratoire d'anatomie de l'UQTR. En effet, la tête doit être prélevée afin d'être transportée au scanneur, ce qui empêche l'utilisation du corps complet à des fins de dissection, simulations chirurgicales, etc.

Bien que l'IRM *in situ* comporte des avantages directement en relation avec des usages dans la recherche médicale (c.-à-d., recalage et corrélations avec les IRM des patients *in vivo* avant leur mort), elle comporte aussi des désavantages, qui peuvent être contré par l'IRM des cerveaux *ex situ*. De plus, l'IRM *ex situ* facilite également les protocoles de recalage d'images, qui seront abordés dans la prochaine section.

3.3.3 IRM du cerveau *ex situ*

Le cerveau est extrait selon une procédure standard des laboratoires d'anatomie et des banques de cerveaux (Insausti et al., 2023). Dans notre laboratoire de recherche, le volume cérébral par

déplacement de l'eau (considéré comme l'étalon-or dans des mesures de volumes) est mesuré afin de corréler les volumes segmentés sur IRM (Gérin-Lajoie et al., 2025). Après son extraction et la sagittalisation des deux hémisphères, un hémisphère est placé dans un contenant hermétique rempli de SFA 1%. Les protocoles d'IRM de base ont été créés par le Centre d'imagerie cérébrale du Centre de Recherche Douglas et permettent d'acquérir plusieurs séquences à haute résolution d'hémisphères *ex situ* fixés avec SFA de la DBCBB (Dadar et al., 2024). Les scans de cerveaux *ex situ* sont aussi souvent acquis en submergeant le cerveaux dans des contenants remplis de liquide à haute densité et libres de protons, qui est donc libre de signal (Miller et al., 2011), comme du *Fomblin* (Perfluoropolyéther) (Miller et al., 2011; Shatil et al., 2018), du *Fluorinert* (Perfluorocarbone) (Iglesias et al., 2018; Roebroeck et al., 2019) ou du Christo-lube (*fluorine-based lubricant*) (Kwan et al., 2017; Santini et al., 2025).

L'IRM *ex situ* comporte des avantages clairs comparativement aux scans d'IRM *in situ* (Neuhaus et al., 2025). En effet, ils permettent un lien direct avec l'histologie, facilitant les corrélations entre les structures observées par IRM et la référence standard (Alkemade et al., 2018). De plus, les scans de cerveaux *ex situ* ne sont pas susceptibles aux artéfacts d'air, puisque les cerveaux sont extraits et en immersion dans un liquide (Neuhaus et al., 2025). Cependant, les cerveaux *ex situ* sont sujets à des déformations ou des déchirures durant l'extraction (Insausti et al., 2023). Les IRM *ex situ* sont également plus difficiles à corréler avec des scans *in vivo* étant donné qu'ils ne sont pas dans le même espace et que les volumes, la diffusion et la relaxométrie different entre des IRM *ex situ* et des IRM *in situ* (Neuhaus et al., 2025).

Le chapitre 5 de cette thèse présentera, pour la première fois, des IRM *ex vivo ex situ* de cerveaux fixés avec des solutions des laboratoires d'anatomie, en plus de déterminer les effets de la fixation sur l'intensité du contraste MB-MG des images obtenues par des séquences pondérées en T1 et en T2. De plus, le chapitre 4 de cette thèse présentera une méthode de recalage entre l'histologie et l'IRM *ex vivo* de blocs de cerveaux fixés avec les différentes solutions anatomiques, qui représente la première étape des *pipelines* de recalage. Cela peut ouvrir la porte à de futures études qui pourraient corréler l'histologie à des IRM *in vivo*, par le biais de l'IRM *ex situ*, i*n situ*, et ensuite *in vivo*. La section suivante du traitera des procédés de recalage généraux ainsi que des méthodes d'alignement entre l'IRM et l'histologie en particulier.

4. Recalage des images

Le recalage est un alignement spatial de deux ou plusieurs images acquises à différents moments, avec différentes modalités (appareils ou technologies différentes), ou à partir de différents points de vue ou différents angles (Dauguet, 2005). Le recalage a pour but de corréler une « image sujet » (*subject image*), qui est l'image d'intérêt ou l'image source à une autre image, qu'on appellera « image cible » pour comparer des régions d'intérêt (Brown, 1992; Dauguet, 2005). Cet alignement se fait par déformation de l'image source vers l'image cible par des transformations mathématiques appliquées à des coordonnées géométriques de l'image source. L'image résultante est ce qu'on appelle « l'image recalée » (Joshi et al., 2018).

Comme expliqué dans les sections antérieures, l'histologie reste l'étalon-or pour caractériser les changements normaux et pathologiques des cerveaux observés par IRM, la modalité d'imagerie la plus utilisée en neurosciences. Par conséquent, le recalage d'images d'histologie et d'IRM peuvent donner lieu à des corrélations qui permettraient de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires des changements détectés par IRM (Augustinack & van der Kouwe, 2016; Choe et al., 2011; Dauguet et al., 2007; Goubran et al., 2013; Goubran et al., 2015; Goubran et al., 2019; Maintz & Viergever, 1998; Stille et al., 2013).

De ce fait, cette section présentera brièvement les méthodologies de base du recalage, ainsi que les procédés détaillés du recalage histologie-IRM d'usage actuel, ainsi que les études qui utilisent ce type de recalage afin de mieux comprendre la structure normale du cerveau vieillissant et des maladies neurodégénératives.

4.1 Méthodologie et classification du recalage

Pour bien corréler deux images ensemble, (une image source vers une image cible) qu'elles soient en deux dimensions (2D) (de surface) ou en 3D (de volume), qu'elles soient du même sujet ou entre deux échantillons, qu'elles viennent d'un même appareil ou non, etc., il existe plusieurs techniques de recalage, qui sont classées différemment (Maintz & Viergever, 1998). L'approche utilisée pour effectuer le recalage de deux images dépend donc de trois aspects majeurs:

1- Des images source et cible à recaler et comment s'y prendre, ce qui implique la considération des modalités impliquées (1), du sujet (2) et de l'objet mesuré (3), qui auront un impact direct sur la dimension (4) et la nature de la transformation (5);

2- Du choix des modèles de transformation, et donc, ce que l'usager devra faire pour mettre en correspondance les images et ainsi procéder au recalage. Les modèles de transformation sont définis par la nature de la transformation (5), le domaine de transformation (6), la base de la transformation (7) et l'interaction (8); et

3- Des procédures d'optimisation (9), qui influenceront l'interaction (8), et qui vont permettre le recalage optimal (Maintz & Viergever, 1998):

1. Modalités impliquées

Les images à recaler peuvent venir du même appareil/objet/méthode (p.ex. deux séquences d'IRM différentes du cerveau). Dans ce cas, le recalage est dit "monomodal"; cela est très habituel lorsqu'il s'agit d'un suivi médical ou dans la recherche sur le développement d'une pathologie (Parent et al., 2023; Tremblay et al., 2025), ou même dans le cas de recalage d'IRM d'un même cerveau, *in vivo* et *ex vivo* (Wisse et al., 2017), ou avant et après la fixation (Schmierer et al., 2008). Cependant, si les images à recaler ne viennent pas d'un même appareil, et ne sont donc pas des images du même type (p.ex. une IRM avec un scan de tomodensitométrie), le recalage est dit "multimodal" (Pelizzari et al., 1989). Ce recalage est très utilisé dans les cas de diagnostics (validation grâce à deux méthodes différentes) (Delzescaux et al., 2010; Parent et al., 2023; Tremblay et al., 2020), ou pour voir la relation entre l'anatomie et la fonction (Nunez & Silberstein, 2000). De plus, le recalage peut se faire entre une modalité et un modèle créé mathématiquement au préalable, comme entre les images d'un cerveau et un atlas stéréotaxique du cerveau (Dadar et al., 2018; Fonov et al., 2022; Fonov et al., 2009). Finalement, il peut aussi y avoir du recalage entre un patient et une modalité, notamment lorsqu'un patient est monitoré par caméra ou positionné à l'aide d'une radiographie pendant une chirurgie (Fitzpatrick, 2010).

2. Sujets

Les images à recaler peuvent venir du même sujet (recalage intra-sujet) si les images sont prises d'un même patient. Le recalage intra-sujet est le plus commun en clinique, où deux images

doivent être comparées à la suite d'interventions, de suivis médicaux qui impliquent l'évaluation ou l'évolution d'une pathologie, ou pour confirmer un diagnostic (Fitzpatrick, 2010; Parent et al., 2023; Tremblay et al., 2020). Le recalage inter-sujets, quant à lui, réfère à deux images de patients différents, ou d'un patient avec un modèle. Le recalage inter-sujets est souvent appliqué dans le recalage en 3D des cerveaux (Grachev et al., 1999). De plus, le recalage peut se faire entre un sujet et un atlas (Dadar et al., 2018; Dubost et al., 2020; Zhernovaia, 2021). En IRM, les cerveaux sont généralement recalés à des modèles (atlas stéréotaxiques conçus avec une moyenne de plusieurs cerveaux) (Denis de Senneville et al., 2020; Fonov et al., 2022; Manera et al., 2020; Zhernovaia et al., 2022), comme le gabarit MNI-ICBM 152[12], construit avec la moyenne de 152 cerveaux jeunes et sains (Fonov et al., 2009). En effet, les hémisphères scannés dans le projet 4 de cette thèse ont été recalés dans cet espace afin que les deux séquences structurelles utilisées pour la quantification des intensités (T1- et T2-pondérées) soient superposées l'une à l'autre et toujours orientées de manière standardisée. Cet atlas permet également que tous les cerveaux qui y sont recalés soient dans la même orientation radiologique (c.-à-d., dans l'espace Talairach), où les trois axes passent par les mêmes points (x=médio-latéral; y=antéro-postérieur ligne qui passe entre les commissures antérieure et postérieure; z=supéro-inférieur) (Mazoyer, 2008).

3. Objets

Le type de recalage dépend toujours de l'objet (partie de l'image globale) mesuré. L'objet d'intérêt ici étant le cerveau, c'est cet objet qui sera davantage considéré dans les prochaines sections de ce texte.

4. Dimension

4.1 Spatiale

Le recalage peut se faire entre deux images 2D, parfois même pour reconstruire des images 2D en un volume (Alkemade et al., 2020; Goubran et al., 2013), entre une image 2D et une autre en 3D (Adler et al., 2012; Choe et al., 2011), ou deux volumes d'images 3D ensemble (Augustinack & van der Kouwe, 2016; Dadar et al., 2024; Edlow et al., 2019; Goubran et al., 2013). Le recalage

[12] https://nist.mni.mcgill.ca/icbm-152-nonlinear-atlases-2009/

2D-2D est moins complexe que le recalage 3D-3D, étant donné qu'il y a moins de paramètres à corréler. Pour une image T1-pondérée d'un cerveau, il y a deux types de recalage : le recalage basé sur la surface d'une coupe du cerveau (2D), ou le recalage basé sur le volume total du cerveau (3D) (Avesta et al., 2023). En ce qui a trait au recalage entre l'histologie (2D) et l'IRM (3D), le recalage sera basé sur la surface, puisque l'image cible, qui est toujours considérée comme la référence standard (dans ce cas, l'histologie) est en 2D (Goubran et al., 2013; Hoffmann et al., 2011; Jacobs et al., 1999).

4.1.1 Basé sur la surface (2D)

Le recalage basé sur la surface consiste à aligner des pixels ensemble (c.-à-d. les carrés avec 2D - antéro-postérieur et droite-gauche : les axes y et x- qui forment l'image). En neuroanatomie par IRM, le recalage basé sur la surface implique l'alignement du cortex cérébral, de manière 2D (Pantazis et al., 2010; Van Essen, 2004). Certains logiciels, comme BrainSuite[13], FreeSurfer[14] ou Brain-Visa[15], utilisent une représentation des surfaces corticales par un « maillage triangulaire » pour aligner les images ensemble.

4.1.2 Basé sur le volume (3D)

Le recalage basé sur le volume consiste à aligner des voxels (c.-à-d. les cubes ou pixels avec une 3^{e} dimension -supéro-inférieur : l'axe z-) afin de recaler le volume complet de l'image source à l'image cible, comme le volume total du cerveau. Par exemple, cette approche est grandement utilisée lors du recalage de différentes séquences d'IRM du cerveau, qui sont toutes acquises en 3D (Despotović et al., 2015).

4.2 Temporelle

La dimension temporelle concerne le recalage qui implique le temps, c'est-à-dire entre des images prises à différents moments longitudinalement (Dadar, Mahmoud, Narayanan, et al., 2022). Cette classification est importante cliniquement pour suivre l'évolution de la croissance d'un enfant et dans le neurodéveloppement (long terme) (Shuvaev et al., 2022; Sled & Nossin-Manor, 2013),

[13] https://brainsuite.org
[14] https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu
[15] https://brainvisa.info/web/

d'une tumeur (moyen terme) (Alnawafleh et al., 2024), ou pour monitorer lors d'une opération (court terme) (Fitzpatrick, 2010). Cette dimension est également utilisée dans les études longitudinales d'IRM qui montrent les changements de contraste qui se produisent pendant la période de fixation, puisque chaque solution de fixation prend une période (des semaines ou des mois) jusqu'à la fixation complète du spécimen (Raman et al., 2017; Shatil et al., 2018).

5. Nature de la transformation (types de recalage)

La nature de la transformation est généralement classée en deux groupes, c'est-à-dire le recalage rigide et le recalage non-rigide. Le recalage rigide implique que les images superposées conservent leur taille d'origine en incluant des translations et des rotations (Chumchob & Chen, 2008; Crum et al., 2004; Maintz & Viergever, 1998). Le recalage non-rigide inclut des étirements ou des déformations appelées non-paramétriques, où les paramètres inconnus sont proportionnels au nombre de pixels de l'image (Chumchob & Chen, 2008). Les subdivisions de la nature de la transformation sont présentées dans la figure 10 (Maintz & Viergever, 1998).

Le recalage rigide est basé sur des modifications selon une matrice vectorielle (qu'on appelle aussi « paramétrique ») qui permet des translations et de la rotation des images seulement. Cela n'entraîne aucune modification de la taille (mise à l'échelle) des images (Chumchob & Chen, 2008; Crum et al., 2004; Maintz & Viergever, 1998).

Un recalage affiné est une modification de l'image pour que toutes les lignes qui sont parallèles restent parallèles sans changer la taille des objets, comme un rectangle qui devient un losange par cisaillement (appelé *shearing*, en anglais) (Maintz & Viergever, 1998). Ce type de recalage est donc parfois considéré dans la grande classe du recalage rigide (Crum et al., 2004), bien qu'il comprenne 6 paramètres inconnus et qu'il soit utilisé comme étape préliminaire au recalage non-rigide (Chumchob & Chen, 2008).

Le recalage de projection est un alignement d'une ligne sur une ligne, mais de manière élastique, ce qui étire l'image. Cela est généralement utilisé pour les recalages 2D-3D, ou comme une transformation élastique (Maintz & Viergever, 1998). Ce type de recalage utilise des transformations appelées *scaling* (mise à l'échelle de l'image), ce qui est aussi considéré comme du recalage non-rigide (Chumchob & Chen, 2008).

Le recalage de courbe, ou élastique, est un alignement de lignes sur des courbes, qui est généralement utilisé lorsqu'un usager doit identifier l'anatomie. Elle est particulièrement utilisée dans le recalage d'images anatomiques (CT scan, IRM) des têtes (des cerveaux *ex vivo in situ* ou *in vivo*) et sont également très utiles pour le recalage inter-sujet ou sur des atlas (Pantazis et al., 2010), ou même lors du recalage entre l'histologie et l'IRM (Huszar et al., 2023). Il s'agit d'une transformation intrinsèque de segmentation déformable, et donc, un recalage de type non-rigide. Ce type de transformation ne peut être représenté par une matrice vectorielle, et sera généralement considéré comme une transformation polynomiale avec un vecteur de déplacement disparate local, et sera donc en majorité non-linéaire (Maintz & Viergever, 1998).

6. Domaine de transformation

Les domaines de transformation sont également présentés dans la Figure 10 ci-dessous, conjointement à la nature de la transformation (Maintz & Viergever, 1998).

6.1 Global, ou plus communément appelé recalage linéaire

La transformation s'applique à l'image complète. Toute l'image est transformée en même temps, à la même proportion. C'est le domaine de transformation qui est majoritairement utilisé pour les cerveaux, généralement lorsque les transformations sont rigides (translations, rotations) ou affinées (cisaillement) (Dadar et al., 2018). Cette transformation est une mise à l'échelle proportionnelle de l'image, ou bien l'échelle n'est tout simplement pas modifiée. Cela respecte les vecteurs d'addition et les relations de multiplications scalaires (donc mathématiquement proportionnel) de l'image source vers l'image cible (Maintz & Viergever, 1998). Dans le cadre du projet 3 de la thèse, c'est le recalage linéaire qui a été appliqué, puisque l'image complète a été utilisée pour l'alignement (recalage rigide : 3 translations et 3 rotations ont été utilisées, et recalage affiné : 1 cisaillement).

6.2 Local, ou plus communément appelé recalage non-linéaire

La transformation ne s'applique pas à toute l'image. Au contraire, plusieurs sous-sections de l'image auront leurs propres coordonnées et méthodes de transformation (minimum deux sections de l'image) (Maintz & Viergever, 1998). Ce type de recalage ne préserve pas l'addition vectorielle et permet donc de mieux corriger les distorsions dans les images. Le recalage non-

linéaire est généralement utilisé lorsque les transformations sont de courbe ou de projection, ce qui démontre une grande élasticité/flexibilité de la méthode locale: l'image n'est plus à l'échelle originale (Modersitzki et al., 2015). Le recalage non-linéaire est souvent utilisé pour donner suite à une transformation globale (linéaire) d'abord, pour augmenter la précision du recalage, surtout lorsque le recalage est multimodal (entre deux appareils) (Maintz & Viergever, 1998).

Le recalage non-linéaire est une technique grandement utilisée dans le recalage entre l'histologie et l'IRM, puisque l'histologie produit une image souvent elle-même déformée (par les artéfacts de rétrécissement, d'enroulement du tissu sur lui-même ou des déchirures occasionnées par la manipulation du tissu très mince et fragile) (Choe et al., 2011; Dauguet et al., 2007; Pitiot et al., 2006). De ce fait, le recalage non-linéaire peut corriger les artéfacts intrinsèques de l'image, alors que le recalage linéaire ne peut prendre en compte ces déformations (Maintz & Viergever, 1998).

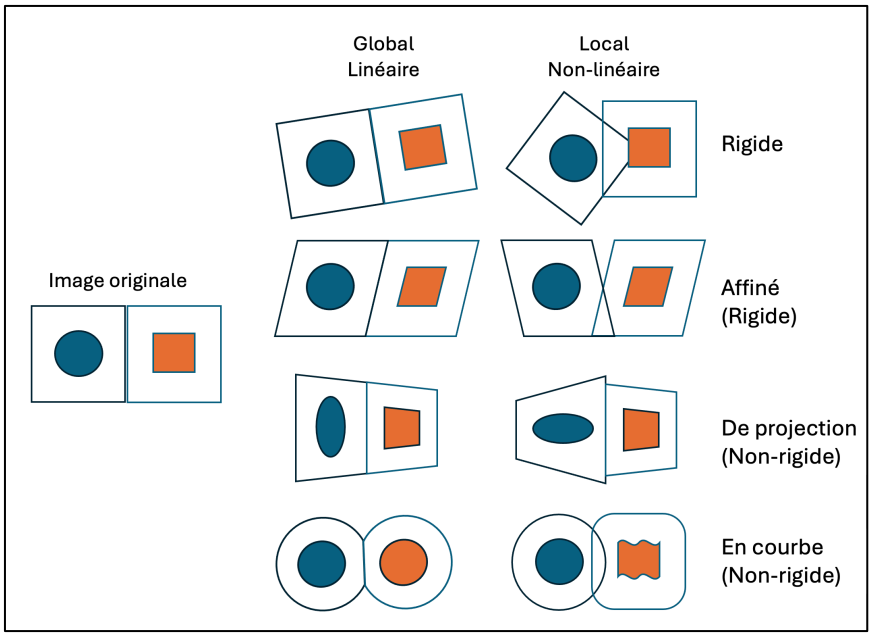


Figure 10. – Domaines de recalage (global/linéaire ou local/non-linéaire) et nature de la transformation (rigide, affiné, de projection et en courbe/non-rigide) 2D-2D. Figure basée de Maintz and Viergever, 1998.

7. Base de la transformation

Le recalage doit se faire selon des repères (Maintz & Viergever, 1998), soit de manière extrinsèque (Górecka et al., 2016) ou intrinsèque (S. Wang et al., 2021). Les repères peuvent également être basés sur un système de calibration (Maurer et al., 1997).

7.1 Repères extrinsèques

Un objet est attaché au patient, soit de manière invasive (p.ex. des vis ou des appareils stéréotaxiques) ou non invasive (adaptateurs dentaires, moules, collants, quadrillés, vitamines ou autres objets ayant un signal dans l'appareil d'imagerie), pour ajouter un point de repère facilement identifiable au sein de l'image, ce qui rend le recalage plus rapide et précis (Górecka et al., 2016; Maintz & Viergever, 1998; Maurer et al., 1997; S. Wang et al., 2021). Par exemple, dans les projets de notre laboratoire, une vitamine E (signal hyperintense en IRM) est parfois installée sur le bord de la tête pour les scans des cerveaux *in situ* comme repère extrinsèque (Figure 11A). En ajoutant un objet qui n'est pas relié au patient, ce type de recalage est généralement réservé uniquement au recalage rigide.

7.2 Repères intrinsèques

Les méthodes intrinsèques peuvent être basées sur des points de repères géométriques ou anatomiques (Figure 11B), sur un protocole de segmentation (donc des points de repères ajoutés électroniquement à l'image) (Figure 11C), ou selon les propriétés de l'intensité de l'objet/sujet dans l'image (Figure 11D) (Maintz & Viergever, 1998).

7.2.1 Géométriques et anatomiques

Ces types de repères intrinsèques sont versatiles et peuvent être appliqués à n'importe quel type d'image et à n'importe quel sujet (Maintz & Viergever, 1998). Habituellement, ils servent aux transformations rigides (qui utilisent des translations et rotations, sans déformation ni étirement) ou affinées (qui utilisent en plus de translations et rotations, l'échelle (ou *scaling*) et le cisaillement, et qui constituent la forme plus simple de recalage non-rigide) où l'ensemble des points qui seront identifiés est choisi aléatoirement au travers de l'image (Chumchob & Chen, 2008). Des algorithmes permettront ensuite de mesurer la distance entre deux points de repères

ou la distance entre un point de repère et son homologue le plus proche de l'image qui suit pour les aligner ensemble (Maintz & Viergever, 1998).

Les repères géométriques (Figure 11B, rouge) sont généralement des points créés automatiquement pour repérer des formes, des petites courbes locales, des coins, etc. (Maintz & Viergever, 1998). Les repères anatomiques (Figure 11B, jaune) sont plutôt manuellement cartographiés par l'usager en référence à des points évidents (bien délimités) de l'anatomie visible du sujet (p.ex. pour le cerveau: noyaux, ventricules, limites entre la MB et la MG, etc.(Han et al., 2015)). Dans le cadre du chapitre 4 de cette thèse, l'histologie et l'IRM ont été alignés grâce au positionnement de marqueurs sur des surfaces anatomiquement homologues dans les deux images, c.-à-d., un même sillon, la limite entre la MB et la MG, etc. Des repères géométriques ont parfois été utilisés, comme des artéfacts présents dans les deux images (i.e., déchirure visible dans l'IRM et l'histologie).

7.2.2 Basés sur la segmentation

Cette méthode permet de placer des points sur des structures complexes comme des grandes courbes, des surfaces, des volumes, etc. (Figure 11C) (Maintz & Viergever, 1998). Cependant, cette méthode limite la qualité du recalage en ajoutant une deuxième variable au processus: le risque d'insérer des biais de segmentation. La segmentation peut être rigide (la plus populaire en clinique), qui utilise majoritairement des surfaces (habituellement les mêmes lignes, c.-à-d., intra-sujet) pour aligner une image l'une sur l'autre (Maintz & Viergever, 1998). La segmentation peut aussi être déformable (p.ex. les gyrus peuvent être modifiés élastiquement pour s'aligner sur l'IRM suivante), ce qui est un bon modèle de recalage pour des atlas ou du recalage inter-sujets (Pantazis et al., 2010; Van Essen, 2004; Zhernovaia, 2021).

7.2.3 Par intensité de pixels ou de voxels

Cette méthode est différente des autres méthodes intrinsèques, car elle fonctionne directement sur l'intensité de gris de l'image (histogramme de l'image), sans faire de délimitation ou d'autres manipulations avant le recalage (Abdel-Basset et al., 2017). La variation dans l'intensité du signal provient du contenu structurel et est donc une source valable pour l'alignement (Stille et al., 2013). Pour aligner les images en fonction de l'échelle d'intensité de l'image, il y a deux méthodes:

la réduction en vecteurs, ou l'utilisation de toute l'image (Figure 11D). Pour la réduction en vecteurs, c'est le « centre de gravité de l'image » qui est calculé en fonction de vecteurs et de matrices d'intensité qui seront alors manipulés mathématiquement pour aligner les centres de gravités des deux images ensemble (Maintz & Viergever, 1998). Cependant, la méthode d'utilisation de toute l'image est la plus flexible: elle est applicable dans presque tous les domaines biomédicaux et peut se faire en utilisant n'importe quel type de transformation (Maintz & Viergever, 1998). Par exemple, une méthode appelée morphométrie basée sur les voxels (ou *voxel-based morphometry)* est utilisée dans l'alignement des cerveaux afin de pouvoir comparer l'intensité des voxels par IRM (Kurth et al., 2015; Matsuda, 2013).

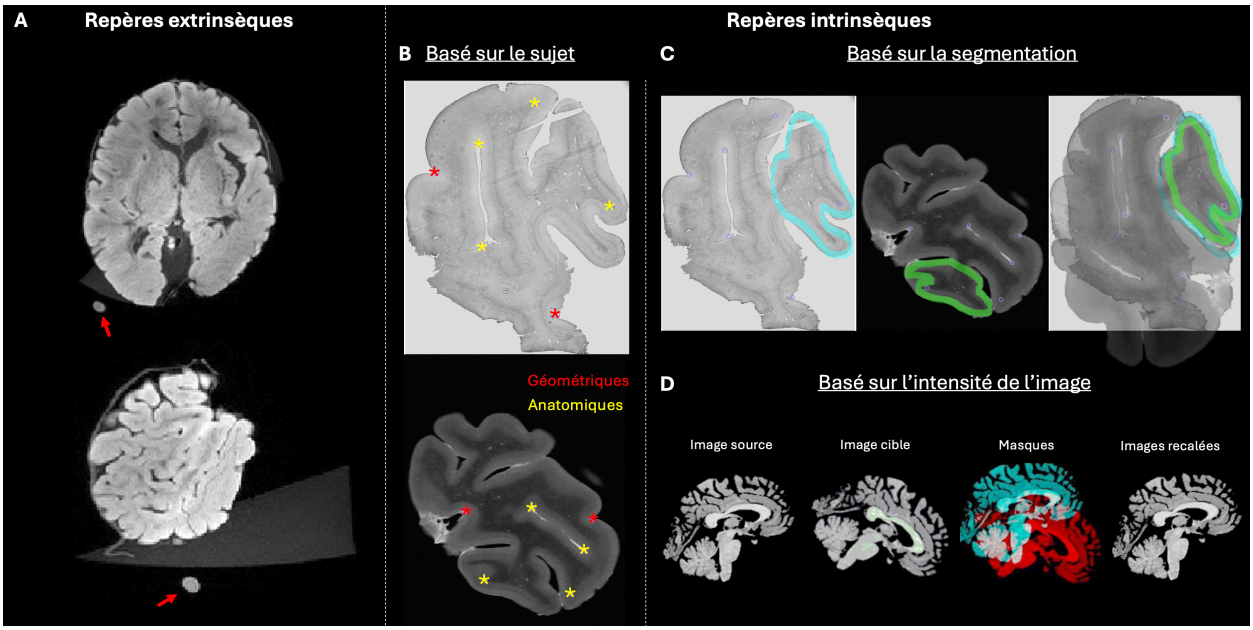


Figure 11. – Bases de la transformation selon des repères. Les repères peuvent être extrinsèques (A), comme lorsqu'une vitamine est introduite dans le scanneur (flèches rouges). Les repères peuvent être intrinsèques et basés sur le sujet (B), comme des repères géométriques ou anatomiques (étoiles jaunes et rouges). Les repères intrinsèques peuvent aussi être basés sur la segmentation de l'image (C) (lignes verte et cyan) ou sur l'intensité de l'image (D). La figure D a été adaptée de Abdel-Basset et al., 2017.

8. Interaction

Le recalage se fait de trois manières différentes : manuellement, semi-automatiquement, ou automatiquement par des algorithmes (Schmitt et al., 2007). La précision du recalage manuel, semi-automatique ou automatique est souvent évaluée avant d'être utilisé, puisque les trois méthodes comportent des avantages et des inconvénients (Dubost et al., 2020; Hayes et al., 2014; McGrath et al., 2020; Schneider et al., 2020).

Le recalage manuel est interactif lorsque l'usager fait le recalage lui-même, en alignant les deux images manuellement à l'aide de repères intrinsèques ou extrinsèques. Il existe aussi la méthode semi-automatique, lorsque l'usager crée l'algorithme, ou qui dirige ou corrige le processus de la transformation. Pour les méthodes extrinsèques, l'usager pointe le marqueur de repère pour lancer la transformation. Les méthodes intrinsèques de repères anatomiques ou de segmentation sont toujours semi-automatiques, car l'usager doit les identifier pour lancer le processus (Maintz & Viergever, 1998).

Dans le cadre du chapitre 4 (étude 3), nous avons manuellement placés des marqueurs anatomiques intrinsèques sur les deux images afin de lancer le processus de recalage. Ensuite, le recalage a été complété par les informations de transformation (valeurs numériques de l'algorithme) du logiciel Register (MINC Toolkit, https://bic-mni.github.io). Il faut placer un minimum de quatre marqueurs afin que Register puisse calculer la distance entre les points de chaque image (et établir une moyenne) et ensuite minimiser la distance entre ces marqueurs grâce à l'algorithme.

Dans un cas de recalage purement automatique, l'usager ne fournit que les paramètres d'image et c'est l'algorithme qui va lancer la transformation. Le recalage se fera automatiquement, ce qui est habituellement le cas pour les méthodes extrinsèques, ou intrinsèques (repères géométriques et basés sur les voxels), puisque ces repères sont facilement reconnaissables par les méthodes automatiques et ne requièrent donc pas l'assistance ou l'intervention de l'usager, comme le nécessiterait le recalage par repères anatomiques (Maintz & Viergever, 1998).

9. Procédure d'optimisation

La procédure d'optimisation est basée sur des paramètres qui vont appliquer la transformation, pour qu'elle soit la plus précise possible (Maintz & Viergever, 1998). L'optimisation peut se faire à partir de données calculées, ou de données recherchées, c'est-à-dire à l'aide de la formulation d'une fonction mathématique des paramètres de transformation qui sont à optimiser (Jenkinson & Smith, 2001). Cette fonction va quantifier la similarité entre les deux images soumises à la transformation (Maintz & Viergever, 1998). Des méthodes manuelles peuvent aussi se faire, comme en quantifiant le degré de superposition des images en faisant des masques, comme il sera présenté dans le chapitre 4.

4.2 Recalage entre l'IRM et l'histologie du cerveau

Comme mentionné précédemment, l'IRM est le type d'imagerie le plus utilisé en clinique et en recherche neuroscientifique, alors que l'histologie reste le *gold standard* dans l'identification cellulaire et moléculaire du cerveau (Choe et al., 2011; den Bakker, 2017; Durand-Martel et al., 2010; Filippi et al., 2019; Pietrzak et al., 2018). Effectivement, l'histologie permet de mieux visualiser l'anatomie du cerveau normal grâce à la cytoarchitecture, la myéloarchitecture et la chimioarchitecture (Augustinack & van der Kouwe, 2016; Beaujoin et al., 2018; Frigerio et al., 2021; Wisse et al., 2017), et permet aussi de valider les changements cellulaires et morphologiques à l'origine de lésions observées sur les IRM (Caplan et al., 2011; Dauguet et al., 2007; de Flores et al., 2020; Grinberg et al., 2008; Stille et al., 2013; Wisse et al., 2017). Cependant, les protocoles histologiques ont leurs propres désavantages, puisqu'ils endommagent (déchirures lors de la manipulation), déshydratent, déforment et rétrécissent les tissus (Mouritzen Dam, 1979; Stille et al., 2013), ce qui n'est pas le cas avec l'IRM.

Il est donc clair que l'IRM et la microscopie (type d'imagerie qui permet d'observer les coupes histologiques) sont complémentaires dans plusieurs applications en neurosciences, que ce soit pour la recherche (compréhension de la neuroanatomie, neurophysiologie ou de la neuropathologie), ou pour effectuer un diagnostic clinique (IRM *in vivo* et biopsie (Quick-Weller et al., 2018)). Pour se faire, il faut procéder au recalage des deux modalités (c.-à-d., recalage multimodal) : il faut corréler les IRM *in vivo* avec les IRM *ex vivo,* et ces dernières avec l'histologie

en alignant les images ensemble, ce qui permettra de visualiser, p. ex., une lésion (visible sur IRM) causée par une modification des cellules (visible par histologie) exactement au même endroit du cerveau (Roseborough et al., 2020; Solé-Guardia et al., 2023).

4.2.1 Approches et méthodologies de recalage utilisées

La première étape dans le recalage de l'histologie à l'IRM est de s'assurer que les images histologiques soient elles-mêmes "réparées" par un pré-traitement de l'image, pour améliorer les distorsions (surtout en raison du rétrécissement en lien avec la fixation et les procédés de colorations, et les déchirures, coupes manquantes, séparation de structures, etc.) (Adler et al., 2012; Adler et al., 2014; Augustinack & van der Kouwe, 2016; Ceritoglu et al., 2010; Choe et al., 2011; Goubran et al., 2013; Li et al., 2009; Magnain et al., 2014; Stille et al., 2013; Yushkevich et al., 2009). Ce pré-traitement nécessite l'intervention de l'usager pour corriger les artéfacts histologiques (Beare et al., 2008). Premièrement, les déchirures du tissu peuvent être refermées par une méthode 2D (Goubran et al., 2013; Goubran et al., 2015). Ensuite, les cortex/hémisphères séparés peuvent être repositionnés grâce à un algorithme multiple interactif du point le plus proche (Choe et al., 2011). Dans le cas d'une coloration histologique qui n'est pas homogène, il faut aussi procéder à la normalisation de l'image à l'aide d'un histogramme de l'intensité de l'image (Ceritoglu et al., 2010; Stille et al., 2013). À cause de ces artéfacts histologiques, le recalage aux IRM est plus complexe. Il requiert une première procédure de recalage linéaire global rigide (rotations et translations linéaires), permettant de minimiser l'erreur et de viser les transformations locales qui seront nécessaires (manipulation locale des voxels) (Meyer et al., 2006; Osechinskiy & Kruggel, 2011a, 2011b), suivie d'un deuxième alignement non-linéaire local déformable (Adler et al., 2014; Augustinack & van der Kouwe, 2016; Ceritoglu et al., 2010; Choe et al., 2011; Goubran et al., 2013; Yushkevich et al., 2009). À la suite du pré-traitement des images d'histologie, celles-ci peuvent être recalées aux IRM 3D selon deux méthodes intermédiaires différentes: l'une utilise le recalage vers le bloc de tissu (Choe et al., 2011; Singh et al., 2008), l'autre utilise le recalage des images d'histologie 2D en un volume 3D (Adler et al., 2012; Goubran et al., 2013; Meyer et al., 2006; Stille et al., 2013). Il est à noter que cette première étape n’a pas été employée dans le cadre des projets de cette thèse, puisque le but n'était pas d’éliminer les

distorsions histologiques, mais plutôt de comparer la qualité du recalage malgré ces distorsions engendrées par les différents fixateurs.

4.2.1.1 Recalage de l'histologie vers le bloc de tissu

En plus d'utiliser des méthodes linéaires et non-linéaires pour augmenter la précision du recalage de l'histologie, certains vont ajouter une étape intermédiaire avant le recalage avec l'IRM: le recalage aux images des faces du bloc histologique de tissu (macroscopique) prises durant la coupe (p.ex. photo de la surface du cerveau avant chaque tranche au microtome/cryostat). Cela permet d'avoir un repère supplémentaire (données complètes) et d'éviter les problèmes de recalage dus aux déformations non-linéaires histologiques (déchirures, coupes manquantes, séparation des hémisphères) (Dauguet et al., 2007; Denk & Horstmann, 2004; Magnain et al., 2014; Mega et al., 1997; Ourselin et al., 2001; Stille et al., 2013; Zarow et al., 2004). Pour recaler les images histologiques aux photos de la surface du bloc de tissu (surfaces coronales des cerveaux, généralement) l'algorithme ICP (*iterative closest point*), généralement utilisé pour le recalage « surface-base » des images biomédicales, permet de calculer les transformations nécessaires et la distance entre deux points (Choe et al., 2011). Cet algorithme est appliqué aux différentes régions de tissus qui sont désalignées histologiquement (p.ex. hémisphères décollés) pour les replacer sur la photo des blocs, ce qui correspond à des transformations rigides et non-linéaires (Choe et al., 2011; Goubran et al., 2015). Les images du bloc de tissus macroscopiques peuvent ainsi être recalées sur l'IRM et ainsi fournir une étape intermédiaire qui contient moins de distorsions pour optimiser le recalage. Dans le cadre de l'étude 3, c'est cette méthode qui a été employée afin de déterminer exactement l'anatomie et la taille du bloc de tissu qui a été coupé au vibratome, comparativement au bloc initial qui a été scanné au 7T. C'est d'ailleurs une technique largement utilisée dans des études qui ont besoin de recaler l'histologie à un IRM d'un hémisphère ou du cerveau complet, à titre de guide intermédiaire (Choe et al., 2011).

4.2.1.2 Reconstruction des coupes histologiques en un volume

De plus, pour que le recalage de l'histologie (2D) à l'IRM (3D) soit de qualité satisfaisante, il est possible d'assembler et d'aligner les images d'histologie 2D pour former un volume, et ainsi procéder à un recalage 3D-3D par la suite (Alkemade et al., 2020; Beare et al., 2008; Goubran et

al., 2015; Osechinskiy & Kruggel, 2011a, 2011b; Paquola et al., 2021; Stille et al., 2013; Xiao et al., 2011). Il y a plusieurs procédures de transformations possibles pour aligner les images histologiques en un volume. Premièrement, la surface externe corticale du cerveau pourrait être utilisée (recalage linéaire global, basé sur une segmentation de surface rigide), mais cela peut produire un mauvais alignement des structures internes, puisque les repères utilisés sont trop loin, ce qui mènera à un recalage local seulement (Cifor et al., 2011). Deuxièmement, des repères anatomiques pourraient être utilisés, mais les points de repères sont faiblement distribués (éparpillés), en plus d'être dépendants des structures observées. Cela résulte en un recalage qui varie en fonction du contraste de l'image (et donc, il faudrait rajouter un recalage basé sur l'intensité de l'image) (Jacobs et al., 1999; Li et al., 2009; Pelizzari et al., 1989; Zhan et al., 2007). De ce fait, il est préférable d'utiliser l'approche basée sur l'intensité de pixel pour créer le volume (Ourselin et al., 2001; Stille et al., 2013). Cette dernière n'est pas dépendante de la structure anatomique ou de points de repères et ne sera donc pas biaisée s'il y a une anomalie (p.ex. lésion, tumeur, sang accumulé dans le cas d'AVC, etc.). La méthode basée sur l'intensité de gris est donc préférable pour des études qui évaluent la neuropathologie, puisque des lésions (visibles comme HMB) ne seraient pas masquées par le retrait de pixels anormaux (Stille et al., 2013), comme le ferait les autres méthodes mentionnées. Finalement, il faut retirer l'arrière-plan des images 2D (avec un seuil d'intensité) et aligner les coupes en utilisant leur centre de gravité (vecteurs) pour finaliser avec un recalage linéaire de chacune des coupes sur la coupe voisine (Stille et al., 2013). C'est à la suite de cette procédure que les structures anatomiques colorées en histologie seront visibles en 3D. Cependant, il y a un effet « banane » dans la reconstruction 3D des images histologiques (Dauguet et al., 2007; Stille et al., 2013). Ce paradoxe de la « banane » est décrit comme une perte de la courbature lorsqu'on aligne des éléments 2D ensemble (si on coupe une banane en tranche et qu'on l'aligne, on obtient une banane cylindrique qui n'est plus courbée (Malandain et al., 2004)). Finalement, la résolution, le champ visuel et le contraste ne sont pas équivalents aux paramètres de l'IRM. Le volume histologique est donc ensuite transformé à une résolution isotrope du voxel de l'IRM et réorienté sur le gabarit 3D d'IRM (Choe et al., 2011; Paquola et al., 2021).

C’est la méthode de reconstruction en 3D qui est la plus populaire dans la littérature , puisqu’elle est utilisée dans des études qui évaluent des structures neuroanatomiques spécifiques (comme l’hippocampe, par exemple) (Adler et al., 2012; Stolp et al., 2018). Cependant, cette méthode n’a pas été utilisée dans le cadre de cette thèse, étant donné qu’elle requiert que toutes les coupes histologiques soient colorées et disponibles, ce qui n’était pas le cas dans le cadre de l’étude du chapitre 4.

4.2.1.3 Traitement de l’IRM

Avant de finaliser le recalage entre l’histologie et l’IRM, les IRM ont également besoin d'un pré-traitement. Premièrement, il faut délimiter la surface corticale pour supprimer les voxels qui n'appartiennent pas à du tissu cérébral (p.ex., crâne, voies nasales, orbites) (Despotović et al., 2015). Il faut ensuite homogénéiser le signal pour retirer les voxels flous (c.-à-d., les artéfacts d'image ou parfois de mouvement du patient) (Tax et al., 2022). Finalement, il faut corriger l'inhomogénéité de l'intensité de l'image (c.-à-d., la variation de signal de l'image qui crée des régions hyperintenses non uniformes à certains endroits) (Milles et al., 2007; Sled et al., 1998; Wicks et al., 1993).

La procédure se termine par le recalage 3D-3D du volume des images histologiques au volume des images d'IRM qui nécessite trois autres étapes: 1- alignement des centres de gravité des volumes et normalisation des résolutions et de l'épaisseur des coupes, puisqu'il s'agit d'un recalage multimodal (Lebenberg et al., 2010), 2- transformation rigide globale (recalage linéaire), 3- transformation locale affinée pour corriger la translation, la rotation, le cisaillement et l'échelle 3D (recalage non-linéaire) (Paquola et al., 2021).

Dans le cadre du projet de cette thèse (Chapitre 4), l’IRM des blocs de cerveaux *ex situ* ont été acquis à très haute résolution de voxel (0.13 x 0.13 x 0.5 mm) dans un scanner 7T et sont, grâce à cette haute résolution, plus facilement recalés aux images d’histologie qui sont, elles-mêmes, d’une plus haute résolution. Des marqueurs ont été placés sur des repères anatomiques intrinsèques manuellement, et des transformations linéaires rigides et affinées ont été appliquées par le logiciel Register. Les images d’histologie ont d’abord été recalées aux images photographiques des blocs de tissus, et ensuite aux blocs d’IRM.

4.2.2 Applications dans la recherche en neurosciences

4.2.2.1 La neuropathologie

Le recalage et la validation entre l'IRM et l'histologie est aussi utilisé en neuropathologie (Jonkman et al., 2019), surtout pour l'analyse d'images provenant de patients souffrant de maladies neurodégénératives (Khandelwal et al., 2024; Li et al., 2023; Schrag et al., 2010). Par exemple, des études récentes ont étudié la relation entre le volume de l'amygdale (Auer et al., 2025), du lobe temporal médial (Yushkevich et al., 2009) et de l'hippocampe, avec la perte neuronale dans la maladie d'Alzheimer (Adler et al., 2012; Adler et al., 2014; Apostolova et al., 2015; Augustinack & van der Kouwe, 2016; Bobinski et al., 2000; Goubran et al., 2013; Stolp et al., 2018; Wisse et al., 2017; Yushkevich et al., 2009). De plus, Dawe et ses collègues (2011) ont combiné des IRM *in vivo*, *ex vivo* et l'histopathologie pour les mêmes fins, et ont démontré que le recalage et la corrélation entre ces images sont importants cliniquement, pour renforcer le diagnostic de la maladie d'Alzheimer à partir des IRM *in vivo* (Dawe et al., 2011). Également, il est connu que l'épaisseur corticale peut avoir un lien avec certaines maladies neurodégénératives, comme l'Alzheimer, ou la maladie de Huntington (Augustinack & van der Kouwe, 2016; Kerchner et al., 2012; Rosas et al., 2002). Par conséquent, les mesures corticales sur l'IRM *in vivo* pourraient devenir importantes comme outil de diagnostic clinique (Dickerson et al., 2009; Feczko et al., 2009; Salat et al., 2004), alors que l'imagerie *ex vivo* et l'histologie permettraient de confirmer les changements cellulaires et moléculaires associés à cette diminution d'épaisseur corticale (Cardinale et al., 2014; Rosas et al., 2002).

D'autres altérations souvent visualisées par IRM et étudiées aussi par histologie, telles les HMB (lésions hyperintenses visibles sur une séquence T2-pondérée ou FLAIR) des cerveaux vieillissants, sont associées au déclin cognitif qui se manifeste en cours de vieillissement, dans certaines maladies neurodégénératives et dans des maladies cérébrovasculaires (Bos et al., 2018; Dadar, Mahmoud, Narayanan, et al., 2022; Dadar, Mahmoud, Zhernovaia, et al., 2022; Debette & Markus, 2010; Kamal et al., 2023; Lahna et al., 2022; Lee et al., 2016; Morrison et al., 2022; Roseborough et al., 2020). C'est en corrélant l'IRM avec l'histologie que certaines études ont démystifiés que ces hyperintensités sont un biomarqueur pour des pathologies de petits vaisseaux (Bos et al., 2018; Braffman et al., 1988; Gouw et al., 2011; Grinberg et al., 2009; Haller

et al., 2021; Humphreys et al., 2019; Lin et al., 2017; Nag et al., 2021; Tatsumi et al., 2008; S. Wang et al., 2021; Wardlaw et al., 2013; Wardlaw et al., 2015), de démyélinisation (Roseborough et al., 2020; Vakrakou et al., 2022), de l'œdème et de la gliose (Fazekas et al., 1993; Grinberg et al., 2009; Solé-Guardia et al., 2023).

Une autre pathologie très étudiée par IRM où l'on observe des lésions de la MB est la sclérose en plaque (Laule et al., 2008; Laule & Moore, 2018). Encore une fois, ce sont les études de la corrélation entre l'IRM et l'histologie qui ont permis d'observer la perte axonale, l'activation de la glie et de différencier les types de protéines des oligodendrocytes atteintes dans les différentes lésions démyélinisantes (Filippi et al., 2019; Hametner et al., 2018; Jonkman et al., 2015; Kuhlmann et al., 2017; Lassmann, 2018; Lassmann et al., 2007; Lycklama à Nijeholt & Barkhof, 2003; Moll et al., 2011; Zhou et al., 2017).

4.2.2.2 Les atlas multimodaux

En plus de l'étude du cerveau vieillissant normal et des différentes neuropathologies, le recalage a permis le développement de multiples atlas multimodaux très populaires en neurosciences. Par exemple, Insausti et ses collègues ont développé des protocoles d'IRM (1.5T 3D MPRAGE) de 52 patients sains avec validation histologique afin de mesurer le volume du lobe temporal et la délimitation histologique (coloration avec thionine) pour segmenter les cortex entorhinal, périrhinal, parahippocampique et temporopolaire par la cytoarchitecture (Insausti et al., 1995). Le travail de Pruessner et ses collègues a aussi permis le développement d'un protocole de segmentation volumétrique sur IRM pour mesurer l'hippocampe, l'amygdale (Pruessner et al., 2000) et le lobe temporal médial (Pruessner et al., 2002) avec des scans de 40 personnes jeunes et en santé grâce à leur alignement à l'espace du MNI (IBM-152, (Fonov et al., 2009) et segmentation par Display (MINC Toolkit[16])).

Le Human Brain Project (Europe, 2013-2023 : https://www.humanbrainproject.eu/en/) a aussi développé le Jülich Brain, un atlas probabilistique basé sur la cytoarchitecture de 10 cerveaux humains qui ont été scannés avec une séquence pondérée T1, coupés et traités avec colorations à l'argent pour délimiter les aires corticales (aires de Brodmann) et reconstruire les cerveaux en

[16] https://bic-mni.github.io

3D avec une résolution cellulaire (Eickhoff et al., 2005). Les cerveaux ont ensuite été recalés à la séquence pondérée T1 du gabarit MNI afin de superposer les aires homologues et ainsi déterminer la carte probabilistique de chaque aire corticale en combinant IRM et histologie. Dans un même ordre d'idée, un modèle de cerveau humain 3D, basé sur la résolution cellulaire du cerveau complet a été créé : Le BigBrain data, disponible à https://bigbrainproject.org. 7400 coupes coronales de 20 μm d'un cerveau humain de 65 ans traitées avec coloration de Nissl ont été digitalisées et reconstruites en 3D (alignement non-linéaire) afin de recaler le cerveau complet à l'IRM préalablement acquis (Amunts et al., 2013).

De plus, Mai, Majtanik et Paxinos ont créé la 4^{e} édition du « Atlas of the Human Brain » (2015) avec les aspects morphologiques et topographiques en utilisant les travaux « Three Atlases of the Brain in the Head » et « Myelo-and Cytoarchitectonic Atlas of the Human Brain in Stereotaxic (MNI) Space » (Mai et al., 2015). Le premier a utilisé trois têtes *ex vivo* qui ont été scannées et recalées à l'IRM d'un participant *in vivo,* ce qui limitait les déformations dues à l'extraction de cerveau. En plus, cela a facilité la reconnaissance de la topographie des structures vers l'IRM *in vivo* (crâne, nerfs, vaisseaux, etc.), un avantage considérable pour corréler l'histologie avec l'IRM *in vivo*. Le deuxième a utilisé des coupes de 100 μm de chaque coupe d'IRM de 1 cm et traité 50 d'entre elles avec une coloration de Nissl (cytoarchitecture) et 99 avec colorations des fibres (myéloarchitecture), qui ont été reconstruites en 3D et recalées au gabarit MNI (Mai et al., 2015).

Finalement, un autre bien connu provient du Allen Brain Institute, qui a été considéré comme un atlas histologique moderne qui inclue l'histologie des cellules pyramidales (protéines de neurofilaments), cellules parvalbumines (non-pyramidales, Nissl), la chimioarchitecture et l'IRM 7T d'un cerveau de femme de 34 ans (Ding et al., 2016). Les images histologiques sont toutes corrélées (cytoarchitecture corticale avec gyrus/sillons) grâce au recalage avec l'IRM.

Ces études (atlas multimodaux) résumées ci-haut ont permis de créer un pont entre la délimitation corticale macroscopique déjà connue, et la délimitation microscopique. Évidemment, d'autres études et applications de la neuroscience fondamentale, clinique ou pathologique peuvent bénéficier du recalage d'image, et particulièrement du recalage entre l'IRM, étant la modalité d'imagerie la plus utilisée en neuroscience, et de l'histologie, étant

l'étalon-or qui informe sur la spécificité cellulaire et moléculaire. D'autres méthodes que celles qui ont été présentées ici peuvent également être utilisées; le développement de nouvelles technologies et de recalage automatique est toujours en expansion. D'ailleurs, une recherche rapide sur PubMed avec comme mot clé « image registration » a passé de 342 études en 2004 à 1698 études en 2014, à 4093 études en 2024. La figure 12 ci-dessous montre l'évolution du nombre d'études qui utilisent le recalage ou qui s'intéressent au développement des différentes méthodes (Pubmed, 2025). Pour la première fois, cette thèse présentera une méthode et la faisabilité du recalage d'IRM 7T de blocs de cerveaux fixés avec des solutions utilisées dans les laboratoires d'anatomie humaine avec différentes colorations d'IHC et HC (Chapitre 4).

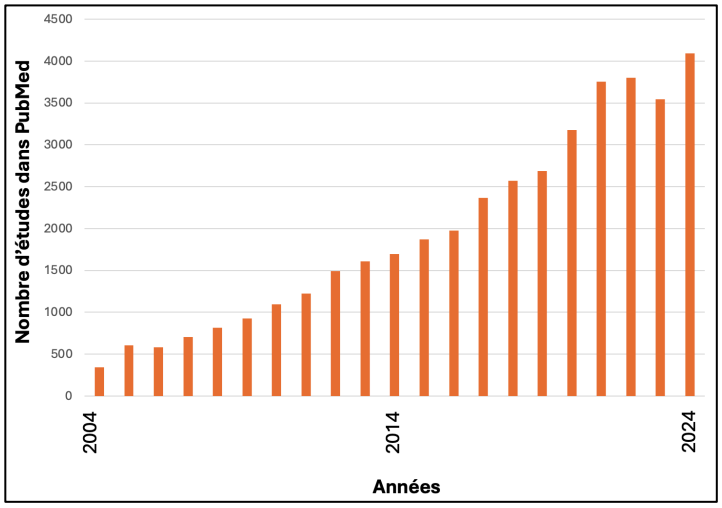


Figure 12. – Graphique à barres du nombre d'études publiées dans PubMed qui incluent comme mot clé « image registration » dans les 20 dernières années.

Le chapitre 1 a présenté les quatre concepts en lien avec les protocoles développés dans le cadre des projets de cette thèse, soit la fixation, l'histologie, l'IRM et le recalage. Les chapitres 2 à 6 suivants présenteront les publications associées.

Chapitre 2 – Article 1 – Antigenicity is preserved with fixative solutions used in human gross anatomy: A mice brain immunohistochemistry study

2.1 Préface

Ce chapitre inclut le premier article de cette thèse qui a été publié en octobre 2022 dans la revue Frontiers in Neuroanatomy. Cet article de type Preuve de concept a été élaboré dans le but d'observer les interactions des différents fixateurs sur le cerveau de souris, c'est-à-dire en l'absence de variables confondantes retrouvées chez l'humain. Des protocoles d'histologie ont été réalisés sur des cerveaux fixés avec la SFA, typique des banques de cerveaux, et la SSS et la SA, typiques des laboratoires d'anatomie. La manipulation du tissu, la qualité de l'immunohistochimie et la qualité de l'immunofluorescence ont été comparés entre les trois solutions.

Cet article a été publié comme :

Frigon E-M, Dadar M, Boire D and Maranzano J (2022) Antigenicity is preserved with fixative solutions used in human gross anatomy: A mice brain immunohistochemistry study. *Front. Neuroanat.* 16:957358. doi: 10.3389/fnana.2022.957358

2.1.1 Contribution des auteurs

Eve-Marie Frigon : Protocoles expérimentaux, organisation des données, analyses statistiques, écriture du manuscrit.

Mahsa Dadar : Révision du manuscrit

Denis Boire : Conception et devis de recherche, révision du manuscrit.

Josefina Maranzano : Conception et devis de recherche, écriture du manuscrit.

2.1.2 Contribution scientifique

Cette étude pilote a été publiée en libre accès dans un journal où la communauté scientifique pourra utiliser les protocoles histologiques qui ont été développés.

2.2 Abstract

Background: Histology remains the gold-standard to assess human brain biology, so *ex vivo* studies using tissue from brain banks are standard practice in neuroscientific research. However, a larger number of specimens could be obtained from gross anatomy laboratories. These specimens are fixed with solutions appropriate for dissections, but whether they also preserve brain tissue antigenicity is unclear. Therefore, we perfused mice brains with solutions used for human body preservation to assess and compare the tissue quality and antigenicity of the main cell populations.

Materials and methods: Twenty-eight C57BL/6J mice were perfused with 4% formaldehyde (FAS, *N* = 9), salt-saturated solution (SSS, *N* = 9), and alcohol solution (AS, *N* = 10). The brains were cut into 40 µm sections for antigenicity analysis and were assessed by immunohistochemistry of four antigens: neuronal nuclei (NeuN), glial fibrillary acidic protein (GFAP astrocytes), ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1-microglia), and myelin proteolipid protein (PLP). We compared the fixatives according to multiple variables: perfusion quality, ease of manipulation, tissue quality, immunohistochemistry quality, and antigenicity preservation.

Results: The perfusion quality was better using FAS and worse using AS. The manipulation was very poor in SSS brains. FAS- and AS-fixed brains showed higher tissue and immunohistochemistry quality than the SSS brains. All antigens were readily observed in every specimen, regardless of the fixative solution.

Conclusion: Solutions designed to preserve specimens for human gross anatomy dissections also preserve tissue antigenicity in different brain cells. This offers opportunities for the use of human brains fixed in gross anatomy laboratories to assess normal or pathological conditions.

2.3 Introduction

Histology remains the gold-standard method to assess pathological and normal aging changes in the human brain, accurately depicting cellular morphology and the presence of specific antigens (Durand-Martel et al., 2010; Hoffmann et al., 2011; den Bakker, 2017; Pietrzak et al., 2018; Filippi et al., 2019). *In vivo* brain samples can only be obtained through biopsies, which provide small amounts of tissue and are very invasive, hence rarely performed (Quick-Weller et al., 2018). Neuroscientific histology research typically uses *ex vivo* brains obtained from brain banks, as they provide larger tissue samples, but infrequently complete brains (Vonsattel et al., 2008; Carlos et al., 2019). There are presently few active brain banks in Canada.[17] As an alternative, the brains of bodies donated to human gross anatomy laboratories could expand the availability of tissue to the neuroscientific research community, since there are numerous body donation programs in Canada.[18]

Both brain banks and anatomy laboratories use chemical fixation to prevent the decay of the tissues (Brenner, 2014; McFadden et al., 2019). The two most widely used chemicals for tissue preservation are alcohol and formaldehyde, because of their antiseptic and antibacterial properties and their capacity to reduce autolysis (Fox et al., 1985; Brenner, 2014; Musial et al., 2016). However, they increase the cross-linking of proteins affecting the structure of antigens (Puchtler and Meloan, 1985; Eltoum et al., 2001; Dawe et al., 2009; van Essen et al., 2010; Birkl et al., 2016; Im et al., 2019). In addition, formaldehyde distorts (Mouritzen Dam, 1979; Weisbecker, 2011) and hardens the tissue, making it less flexible (Richins et al., 1963; Tolhurst and Hart, 1990; Hayashi et al., 2014), and it is a health hazard (Fisher, 1905; Raja and Sultana, 2012; Musia et al., 2016). Therefore, high concentrations, such as that used in brain banks and animal fixation (i.e., 4%) (Yamaguchi and Shen, 2013; McFadden et al., 2019), are avoided in human gross anatomy laboratories (Brenner, 2014).

Consequently, human anatomists have developed alternative fixative solutions that combine various chemicals, allowing lower concentrations of formaldehyde. For example, a salt-saturated

[17] https://www.cbc.ca/news/science/brain- banks- crucial- for- research- clamouring- for- donors- 1.757008
[18] https://www.afmc.ca/en/faculties

solution preserves the body flexibility, optimizing dissection procedures (Coleman and Kogan, 1998; Hayashi et al., 2014). Another example is a solution of multiple alcohols tailored to perform neurosurgical simulations, since the density and retraction properties of the tissue remain closer to the *in vivo* brain (Benet et al., 2014). Despite the good tissue preservation and dissection properties provided by salt and alcohol solutions, it is unclear whether they preserve cellular morphology and antigenicity of the main brain cell populations (Lyck et al., 2008; Benet et al., 2014).

Finally, in gross anatomy laboratories, the fixation/embalming procedures are performed by arterial perfusion within 48 h following death (Frølich et al., 1984; Nicholson et al., 2005; Brenner, 2014; Maranzano et al., 2020). This inconstant post-mortem delay introduces a variable degree of clotting, which combined with vascular stenosis may negatively impact the perfusion, confounding the fixation quality (Turkoglu et al., 2014). Moreover, human brains may take up to 6 months to be fully fixed, which is an important delay to consider when designing human studies (Dawe et al., 2009; Raman et al., 2017).

In this study, we avoided the post-mortem, and fixation delays by using mice brains, which are fixed immediately by transcardial perfusion of the deeply anesthetized animals. We then assessed the overall histology procedures and quality (i.e., perfusion quality, ease of manipulation of the slices, and tissue quality), as well as antigenicity preservation (assessed by immunohistochemistry of four antigens) using three solutions. We also performed (in a subgroup of animals) an assessment of immunofluorescence (IF), to determine its feasibility, since it is another frequently used staining technique that allows simultaneous visualization of several target antigens. Since 4% formaldehyde (FAS) is the fixative of choice of brain banks and animal fixation protocols, we hypothesized that the histology quality and antigenicity would be superior in mice brains fixed with FAS than those fixed with a salt-saturated solution (SSS) or an alcohol solution (AS) used in human gross anatomy (Coleman and Kogan, 1998; van Essen et al., 2010; Benet et al., 2014; McFadden et al., 2019).

2.4 Methods

2.4.1 Population

We used 28 6-month-old C57BL/6J mice (14 females and 14 males) (**Table 1**) raised in an enriched environment with controlled ventilation (45–60% humidity) and temperature (20– 25C) on a 12-h daylight schedule. We followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care, and all procedures were approved by the Ethics Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières.

Table 1 Mice Data.

Fixative	Sex	Age (days)	Weight (g)
FAS	F	182	28.1
		182	28.2
		182	32.3
		187	26.5
		200	29.3
	M	182	33.7
		214	26.3
		214	28.4
		220	39.1
SSS	F	182	27.8
		182	27.7
		187	27.5
		200	31.1
	M	182	29.7
		183	27.7
		189	25.2
		215	27.4
		220	34.5
AS	F	182	29.6
		182	29.3
		187	26.9
		200	25.9
		200	22.9

	M	167	33.6
		182	31.6
		183	29.5
		215	27.0
		215	35.4

M, male; F, female; FAS, formaldehyde solution; SSS, salt-saturated solution; AS, alcohol solution.

2.4.2 Fixation procedure

Mice were sacrificed by transcardiac perfusion with phosphate-buffered saline (PBS) (0.1 M; 0.9% NaCl), followed by a 5-min injection of one of the following solutions (randomly assigned): (1) FAS (*N* = 9), (2) SSS (*N* = 9), and (3) AS (*N* = 10) (**Table 2**). The perfusion was performed using a gravity technique (Paul et al., 2008; Au-Rana et al., 2022), with the same caliber tubes (15 drops/ml) and cannulas. FAS and SSS bags were placed at the same level, obtaining a similar continuous fluid flow. Due to the higher viscosity and density of the AS, owing to its greater concentration of glycerol, the AS bag was placed 50 cm higher to obtain a similar continuous flow than that of the other solutions. We then extracted and assessed the brain color, which indicates the amount of remaining blood, to determine the post-fixation time by immersion in the same solution for each brain (2 h for pink brains, 1.5 h for heterogeneous color brains, and 1 h for beige brains). We then immersed the brains in 30% sucrose in 0.1 M PBS for cryoprotection overnight. Finally, the specimens were frozen in dry ice and stored at 80C for a short period (1 day to 2 weeks) until use.

Table 2 Fixative's components.

FAS	SSS (Coleman and Kogan, 1998)	AS (Benet et al., 2014)
4% Paraformaldehyde	0.296% formaldehyde	0.851% formaldehyde
0.1 M PBS	36% NaCl	62.4% Ethanol
	0.72% Phenol	10.2% Phenol
	2% Glycerol	17% Glycerol
	16% Isopropylic alcohol	

2.4.3 Histology processing

Brains were cut using a cryostat (Leica CM1950) in 40-µm coronal sections at 19C and rinsed three times for 5 min in 0.1 M PBS. We then incubated the floating sections for 30 min in an aqueous

solution of 20% methanol and 0.5% H2O2 to quench endogenous peroxidase. Sections were rinsed again three times for 5 min in 0.1 M PBS before a 2-h incubation at room temperature in blocking solution (3% Normal Donkey Serum; 0.5% Bovine Serum Albumin; 0.3% Triton X-100 in 0.1 M PBS). Then, we incubated the sections overnight at 4C in the same blocking solution with primary antibodies (**Table 3**). We rinsed again three times for 5 min in 0.1 M PBS before incubation of the sections for 2 h in donkey anti-rabbit biotinylated secondary antibody (1:500) at room temperature in the same blocking solution. Sections were rinsed again (3 ⇥ 5 min in 0.1 M PBS) and incubated in an avidin-biotin complex (ABC) kit for 30 min in the dark (Vector Laboratories, Newar, CA USA, catalog#VECTPK6100). We rinsed three times for 5 min in TRIS-buffered saline (TBS) (0.05 M; 0.9% NaCl) before the final incubation in 0.07% diaminobenzidine (DAB) (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA, catalog #D5905-50TAB) with 0.024% H2O2 in TBS for 10 min. We rinsed the slices in 0.01 M phosphate-buffered (PB) before mounting on 2% gelatin-subbed slides. Finally, sections were dehydrated in graded alcohol (5 min each: 70% ethanol, 95% ethanol, 2X 100% ethanol, and 2X xylene) and coverslipped using Eukitt.

Table 3 Immunohistochemistry antibodies.

Primary antibodies	**Animal**	**Laboratory**	**Dilution**	**Code**
Anti-neuronal nuclei (NeuN)	Rabbit	Abcam	1:3000	Ab177487
Anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP)			1:1000	Ab68428
Anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1)			1:1000	Ab178847
Anti-myelin proteolipid protein (PLP)			1:3000	Ab254363
Secondary antibody	**Animal**	**Laboratory**	**Dilution**	**Code**
Anti-Rabbit biotinylated	Donkey	NovusBio	1:500	NBP1-75274

2.4.4 Variables of interest

We qualitatively assessed five variables: 1—perfusion quality, 2—ease of manipulation, 3—tissue quality, 4—antigenicity preservation, and 5—immunohistochemistry quality. They were evaluated according to different criteria, where the highest score reflected the highest quality of the element.

2.4.4.1 Perfusion quality

We used three criteria to assess this variable, namely the presence or absence of signs of perfusion through the right ventricle, the brain color, and the presence or absence of dilated vessels.

2.4.4.1.1 Signs of perfusion through the right ventricle

When the fixative goes through the right ventricle, it will result in a poorer perfusion since the fixative goes into the pulmonary circulation and indirectly to the brain instead of accessing the systemic (left) circulation, which goes directly to the brain. This was assessed since the higher the density of a solution (namely the AS with a high concentration of glycerol), the greater the potential for damage of the thin interventricular septum, with the unintentional passage of the solution from the left to the right ventricle. The indicative signs of perfusion in the right ventricle, used for the score, were red liver, white lungs, and fluid flowing through the nose.

Scores: 3 signs = 0, 2 signs = 1, 1 sign = 2, and 0 sign = 3.

2.4.4.1.2 Brain color

The brain color is an indication of the quality of perfusion, whereas the pink color indicates remaining blood in the brain, showing that the perfusion was less effective. In these cases, brains were post-fixed for a longer period to better our odds of a good histology.

Scores: pink = 0 (**Figure 1N**), heterogenous = 1 (**Figure 1M**), and beige = 2 (**Figure 1L**).

2.4.4.1.3 Dilated vessels

A higher injection pressure during the perfusion made the vessels burst, negatively impacting the subsequent microscopic analysis, since the antigens may be masked out by these dilated vessels. This was assessed in the NeuN sections of the specimens.

Scores: presence = 0 (**Figure 1D**) and absence = 1.

2.4.4.2 Ease of manipulation

We used four signs to assess this variable that were equally assessed with scores from 0 to 1 and then summed up to obtain one variable with a possible score between 0 and 4. The criteria were

namely 1—slice consistency (soft = 0 or firm = 1), 2—tears (presence = 0 or absence = 1), 3—slices on the brush (sticking = 0 or not adherent = 1), and 4—rolling slices (presence = 0 or absence = 1).

Scores: very poor (4 signs present = 0) (**Figure 1I**), poor (3 signs present = 1) (**Figure 1H**), good (1 or 2 signs present = 2) (**Figure 1G**), or very good (no sign present = 3) (**Figure 1F**).

2.4.4.3 Tissue quality

We used three criteria to assess this variable, namely the neuropil quality, the cellular shape, and the presence or absence of peroxidase-labeled vessels.

2.4.4.3.1 Neuropil quality

A fissured neuropil reflects the degradation of the tissue. This was assessed in the NeuN sections of the specimens.

Scores: fissured = 0 (**Figure 1K**) and uniform = 1 (**Figure 1J**).

2.4.4.3.2 Cell shape

Shrunken and shriveled contours (irregular) are signs of dehydration of the neurons. This was assessed in the NeuN sections of the specimens, in the second and third layers of the secondary motor cortex. The score reflected the characteristic of all the cells in this region of interest.

Scores: irregular (shrunken/shriveled) = 0 (**Figure 1K**) and regular (smooth) = 1 (**Figure 1J**).

2.4.4.3.3 Endogenous peroxidase presence in blood vessels

The presence of endogenous peroxidase in the endothelial and red cells in the blood vessels (represented as dark brown lines, **Figure 1E**) shows that the quenching procedure was not sufficient for the specimen. This criterion was assessed because it may negatively impact the subsequent microscopic analysis by masking out the antigens. This was assessed in the GFAP sections of the specimens, since they were easily visible because of the absence of cells in the cortex (astrocytes were labeled in the white matter only).

Scores: presence = 0 (**Figure 1E**) and absence = 1.

2.4.4.4 Antigenicity preservation

We looked at slices targeted for all the antigens to verify the labeling. No labeling would show the destruction and/or too much cross-linking of this specific antigen by the fixative. This was assessed for every antigen.

Scores: absence = 0 and presence = 1.

2.4.4.5 Immunohistochemistry quality

We used two criteria to assess this variable, namely the degree of antibody penetration in the thickness of the slices and the darkness of the tissue background.

2.4.4.5.1 Antibody penetration

This was assessed by looking through the full thickness of the slices. The antibody penetration shows the permeability of the tissue. The incomplete condition means the middle of the slice was not labeled, and the complete depicts full penetration at all depth levels. This was assessed for every antigen.

Scores: incomplete = 0 and complete = 1.

2.4.4.5.2 Tissue background

The background reflects the quality of the chemical reaction of the DAB labeling. This was assessed for every antigen.

Scores: dark = 0 (**Figure 1C**), intermediate = 1 (**Figure 1B**), and light = 2 (**Figure 1A**).

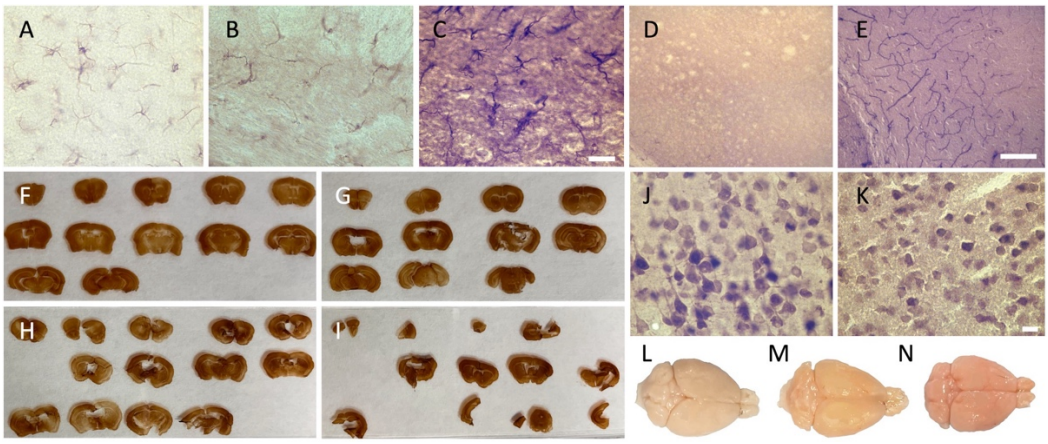


FIGURE 1 Photomicrographs of the different categorical variables that were assessed. Photomicrographs (60X) of the background intensity (A) light = 2; (B) intermediate = 1; and (C) dark = 0, acquired in the external capsule of GFAP-labeled slices, where we can see the presence of labeled astrocytes. Scale bar = 20 μm [valid for (A–C)]. (D) Photomicrographs of the presence of dilated vessels (20X) (perfusion quality) and (E) of endogenous peroxidase presence in the blood vessels (red cells and endothelial cells) (20X) (histology quality) in the cortex, also acquired in GFAP-labeled slices (no astrocyte on the picture since they were only present in the white matter). Scale bar = 100 μm [valid for (D,E)]. Ease of manipulation (F) very good = 3; (G) good = 2; (H) poor = 1; and (I) very poor = 0. Photomicrographs (60X) of (J) a uniform neuropil and regular cell contours in the secondary motor cortex, and (K) a fissured and irregular neuropil and cell contours, also acquired in the secondary motor cortex of the closest slice to figure 33 in the Mouse Brain Atlas. Scale bar = 10 μm [valid for (J,K)]. Brain color (perfusion quality) (L) beige = 2; (M) heterogenous = 1; and (N) pink = 0.

2.4.5 Microscopy

We assessed the tissue quality, the antigenicity preservation, and the immunohistochemistry quality using a bright-field microscope (Olympus, Tokyo, Japan, BX51W1) controlled by Neurolucida software (MBF Bioscience, Williston, VT, USA). We graded these variables by looking through the full thickness of sections immunolabeled for the four antigens with 60X objective (60X, UPlanSApo 60x/1.40 Oil1/0.17/FN26.5 UIS2).

First, we performed a quality control of all stained slices of each brain, to ensure that all antigens were present and homogeneously distributed in all available slices. Then, we chose to assess the slice stained for the antigen of interest that was the closest to figure 33 of the Mouse Brain Atlas (0.22 mm posterior to Bregma) (Paxinos, 2001), since it is a level of the brain easy to identify that was of sufficient quality to be assessed across specimens. We then visually assessed the variables by scanning the secondary motor cortex of these slices because it is a cortical region that is unambiguous to delineate according to neuronal morphology (Caviness, 1975). For GFAP-stained slices, we visually assessed the cells in the external capsule, since there were no astrocytes in the secondary motor cortex gray matter.

2.4.6 Statistical analyses

We compared the categorical variables across the three fixative groups using chi-square tests. All the statistical analyses were corrected for multiple comparisons using Bonferroni correction and were performed using SPSS statistics software (28.0.0 version).

2.4.7 Immunofluorescence staining

2.4.7.1 Histology processing

In a subgroup of *N* =9 mice (FAS=3, SSS=3, and AS=3), we used two free-floating slices (the remaining sections closest to the Figure 33 of the Mouse Brain Atlas) that were rinsed three times for 5 min in 0.1 M PBS. We then incubated the floating sections 20 min in an aqueous solution of 20% methanol. We rinsed again before a 2-h incubation at room temperature in blocking solution (2% Normal Donkey Serum; 0.75% Glycine and 0.3% Triton X-100 in 0.1 M PBS). We then incubated the sections in the same blocking solution with primary antibodies for double staining of neuronal nuclei (NeuN) and astrocytes (GFAP) (**Table 4**). We rinsed again three times for 5 min in 0.1 M PBS before incubation in secondary antibodies (in the same blocking solution) for 2 h (**Table 4**). Finally, sections were rinsed before mounting on 2% gelatin-subbed slides and coverslipped using Mowiol mounting medium.

Table 4 Immunofluorescence antibodies.

Primary antibodies	**Animal**	**Laboratory**	**Dilution**	**Code**
Anti-neuronal nuclei (NeuN)	Guinea Pig	Abcam	1:6000	Ab177487
Anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Rabbit		1:1000	Ab68428
Secondary antibody	**Animal**	**Laboratory**	**Dilution**	**Code**
Anti-Rabbit alexa fluor 555	Donkey	BioLegends	1:500	406412
Anti-Guinea Pig alexa fluor 488		Jackson Labs	1:500	706-545-158

2.4.7.2 Microscopy and analysis

We used a DSU spinning disk microscope (Olympus, Tokyo, Japan, BX51W1) (60X objective UPlanSApo 60x/1.40 Oil1/0.17/FN26.5 UIS2) to qualitatively assess, in a subgroup of nine mice, the immunofluorescence staining quality (IF). We visually inspected three criteria: 1—the antigenicity preservation, 2—the auto-fluorescence, and 3—the tissue quality. No statistical

analysis was applied on these results since we had no statistical power when using *N* = 3 mice per group.

2.4.7.3 Antigenicity preservation

Antigenicity preservation was assessed by the presence or absence of both labeled antigens (neurons and astrocytes) in all the immunolabeled slices of all specimens.

2.4.7.4 Auto-fluorescence

This criterion was assessed by observing the presence or absence of fluorescent artifacts in the secondary motor cortex of the negative control-stained slices (same IF protocol but incubated without primary antibodies). We qualitatively and visually assessed the auto-fluorescence by looking through the backgrounds of NeuN and GFAP-stained slices.

2.4.7.5 Tissue quality

The tissue quality was visually assessed by imaging with differential interferential contrast illumination (DIC) of the fluorescent control slices, showing the neuropil and cellular texture. We also assessed the cellular shape and the antibody penetration in the Alexa-488 for NeuN channel and Alexa-555 for GFAP channel, respectively.

2.5 Results

2.5.1 Perfusion quality

We started by assessing the perfusion quality, finding a significantly higher number of cases without signs of perfusion through the right ventricle in the FAS-fixed specimens (p = 0.0002) (**Figure 2A**). The SSS and AS show a higher number of cases with one sign and three signs of perfusion in the right ventricle, respectively, but this observation did not retain significance after Bonferroni correction. We did not find significant differences in brain color, nor dilated vessels across the three fixatives (**Figures 2B,C**). However, pink-colored brains were only observed when fixed with AS (*N* = 3) and SSS (*N* = 2). Also, although not statistically significant, there were fewer AS specimens showing dilated vessels.

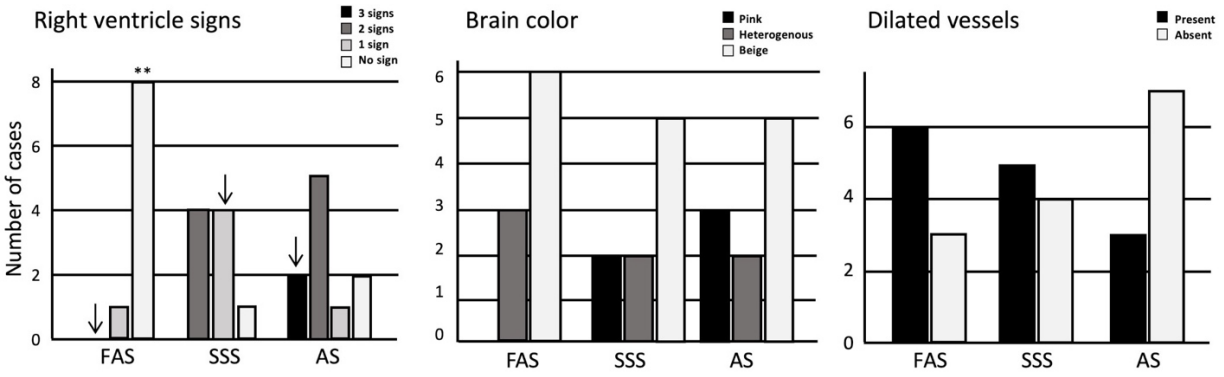


FIGURE 2 Bar charts of the perfusion quality. (A) Signs of perfusion in the right ventricle; (B) brain color; (C) presence or absence of dilated vessels. Significance after Bonferroni correction: $^{**}p < 0.001$; ↓ = significant before Bonferroni correction; FAS, formaldehyde solution; SSS, salt-saturated solution; AS, alcohol solution.

2.5.2 Ease of manipulation

We then assessed the ease of manipulation, finding that the scores obtained for the brains fixed with SSS were significantly lower (score = very poor) ($p = 0.002$) than those of the brains treated with the other two solutions (**Figure 3**). We also found that the scores of the manipulations corresponded more often to a poor manipulation of SSS slices, to a very good manipulation of FAS slices, while the AS had good scores, but these observations did not retain significance after Bonferroni correction.

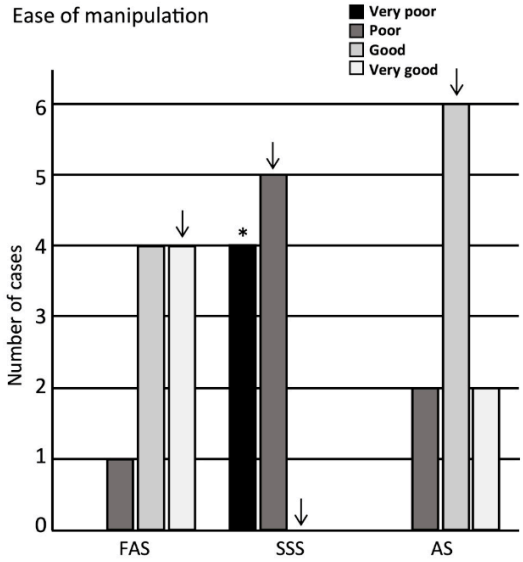


FIGURE 3 Bar charts of the ease of manipulation. Very poor = 4 signs; poor = 3 signs; good = 1 or 2 signs; very good = no sign. Significance after Bonferroni correction: *p < 0.05; ↓ = significant before Bonferroni correction; FAS, formaldehyde solution; SSS, salt-saturated solution; AS, alcohol solution.

2.5.3 Tissue quality

Regarding the tissue quality, we found that the neuropil was significantly more often uniform in FAS-fixed specimens (p < 0.001). It was significantly more often fissured in the SSS-fixed brains (p = 0.007); AS-fixed brains also showed more specimens with a fissured neuropil, which did not retain significance after Bonferroni correction (**Figure 4A**). Regarding the cellular shape, the specimens fixed with SSS showed significantly more often irregular cells (p = 0.004) compared to the brains fixed with AS or FAS (**Figure 4B**). The FAS-fixed specimens showed mostly regular cells, but this did not retain significance after Bonferroni correction. Finally, we found no significant differences for the occurrence of peroxidase-labeled vessels across the three fixatives (**Figure 4C**).

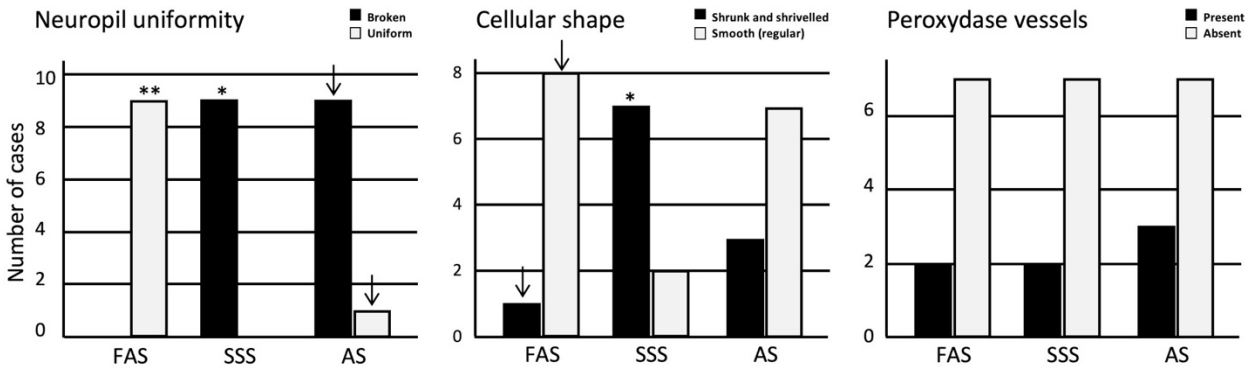


FIGURE 4 Bar charts of the tissue quality. (A) Neuropil uniformity; (B) cellular shape; (C) presence or absence of peroxidase vessels. Significance after Bonferroni correction, *p < 0.05, **p < 0.001; ↓ = significant before Bonferroni correction; FAS, formaldehyde solution; SSS, salt-saturated solution; AS, alcohol solution.

2.5.4 Antigenicity preservation

Negative control sections (**Figures 5A,F,K**) were compared to the immunolabeled sections that show that the three fixatives preserved antigenicity for the four antigens of interest. Neurons (NeuN) were labeled and showed the neuronal cell bodies (**Figures 5B,G,L**). Astrocytes (GFAP)

(**Figures 5C,H,M**) and microglia cells (Iba1) (**Figures 5D,I,N**) clearly showed cell bodies and fine cellular processes. Astrocytes were present in the white matter tracts only. Finally, PLP clearly labeled myelinated fibers (**Figures 5E,J,O**) in all the specimens. The four tested antigens were present and comparable in every mouse, and therefore, there were no differences between the three fixatives.

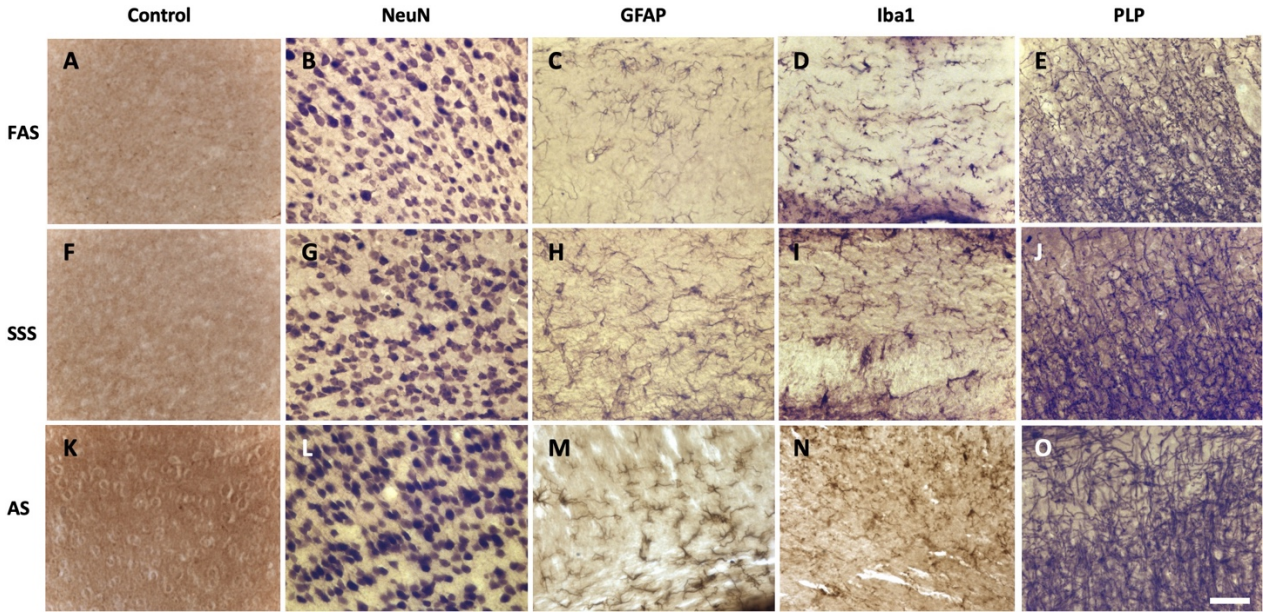


FIGURE 5 Photomicrographs (40X) of the different antigens of brain samples fixed with three different solutions. (A,F,K) Negative control sections, (B,G,L) neuronal cell bodies (NeuN), (C,H,M) astrocytes (GFAP), (D,I,N) microglia (Iba1), and (E,J,O) myelin fibers (PLP) fixed with FAS, SSS, and AS, respectively. Photomicrographs were acquired in layers 2–3 of the secondary motor cortex of sections from 0.04 to 0.46 mm posterior to Bregma (the Mouse Brain Atlas). Photomicrographs were acquired in similar background specimens (light for NeuN and Iba1, intermediate for GFAP and PLP) to increase the visual comparability of the antigens, by avoiding any dark backgrounds. Scale bar = 100 µm.

2.5.5 Immunohistochemistry quality

Since all the antigens were present, we were able to assess the quality of immunolabeling using two criteria. First, we assessed the antibody penetration in the depth of the sections for the four antigens. NeuN penetrated completely in all the specimens fixed with AS, while FAS- fixed brains

showed three specimens and SSS one specimen with incomplete penetration (**Figure 6A**). GFAP penetrated completely in the FAS- and AS-fixed brains, while three SSS specimens showed incomplete penetration (**Figure 6B**). These results were statistically significant only before Bonferroni correction. We did not find any differences in the penetration of Iba1 nor PLP between the three fixatives (**Figure 6C**). However, PLP showed the poorest antibody penetration, especially in FAS-fixed brains (seven incomplete penetration), with AS-fixed brains showing the best PLP antibody penetration (five complete penetrations) although this was not statistically different across the three solutions (**Figure 6D**).

Finally, we assessed the background intensity in slices labeled with the four antigens. The NeuN background labeling was more often darker in brains fixed with SSS, but it did not retain significance after Bonferroni correction (**Figure 6E**). The GFAP background was significantly more often lighter in brains fixed with FAS than the two other solutions (p = 0.001). In addition, SSS-fixed brains showed a higher occurrence of dark backgrounds and absence of light backgrounds of GFAP than the two other fixatives, but not retaining significance after Bonferroni correction (**Figure 6F**). In Iba1-labeled slices, we found significantly more often dark backgrounds in the specimens fixed with SSS (p = 0.0009), while more light backgrounds were present in FAS-fixed brains (p = 0.002). We also never observed dark backgrounds in the specimens fixed with FAS, but this did not retain significance after Bonferroni correction (**Figure 6G**). In the PLP-labeled slices, we found no dark backgrounds for any of the specimens. The SSS-fixed brains present more often an intermediate background and less often a light background than the two other solutions, but this did not retain significance after Bonferroni correction (**Figure 6H**).

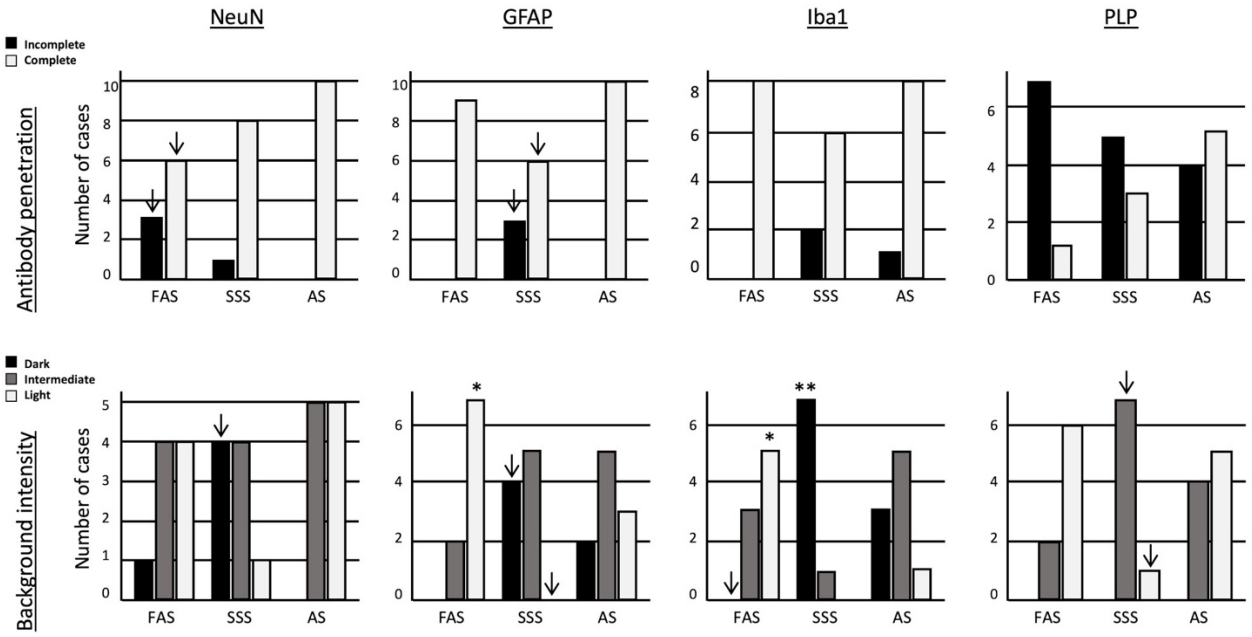


FIGURE 6 Bar charts of the immunolabeling quality. Antibody penetration of (A) NeuN, (B) GFAP, (C) Iba1, and (D) PLP. Tissue background of (E) NeuN, (F) GFAP, (G) Iba1, and (H) PLP. Significance after Bonferroni correction: *$p < 0.05$, **$p < 0.001$; ↓ = significant before Bonferroni correction; FAS, formaldehyde solution; SSS, salt-saturated solution; AS, alcohol solution.

2.5.6 Immunofluorescence staining

2.5.6.1 Antigenicity preservation

Regarding the IF staining quality of the chosen antigens, we first found that both antigens (NeuN and GFAP) were present in all stained slices in the nine mice and across the three fixatives. The labeling was homogenous for NeuN (found in the full slices), and astrocytes (GFAP) were present in the white matter and the striatum, no matter the fixative (**Figure 7**).

2.5.6.2 Auto-fluorescence

We found that AS-fixed brains showed a little more auto- fluorescence in the 555 channel (**Figure 7I**) than the brains fixed with the two other solutions. Also, FAS-fixed brains showed higher auto-fluorescence in the 488 channel (**Figure 7B**) (visible granules in the NeuN background). However, it appeared to be at a comparable level of auto-fluorescence in all the channels (**Figure 7**).

2.5.6.3 Tissue quality

Neurons labeled using IF were irregular (shrunken and shriveled) when fixed with SSS (**Figure 7E**). The antibody penetration was complete through the slice thickness in all slices of the nine specimens, no matter the fixative. **Figure 8** also shows the neuropil and cell texture of the tissue imaged with DIC optics in brains fixed with FAS, SSS, and AS. FAS-fixed slices show a smooth texture, round- shape cells with few artifacts (**Figure 8A**), while the SSS slice shows shrunken and shriveled cells (**Figure 8B**, black arrowheads). The AS-fixed brains show broken neuropil, since the contours of the cells are well delineated (**Figure 8C**, arrowheads).

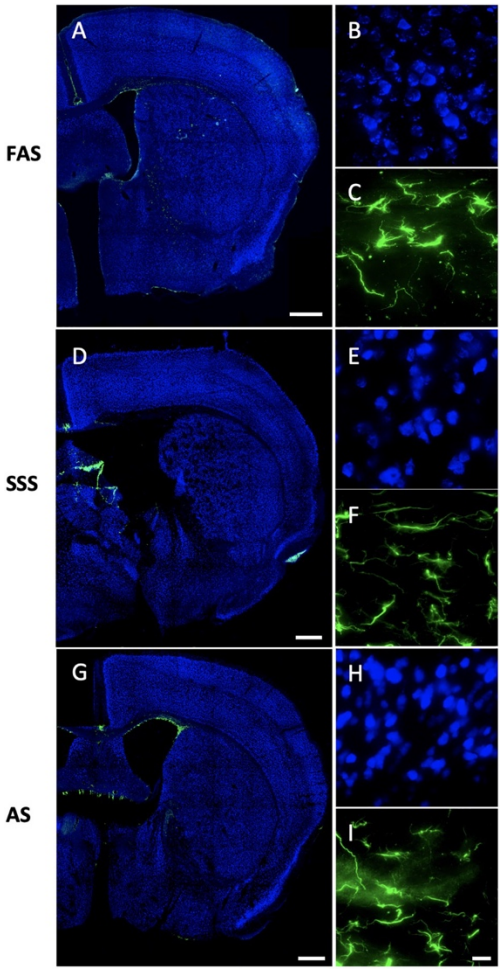


FIGURE 7 Immunofluorescence antigenicity. Slide scans (10X) (the remaining closest slices of figure 33 (0.22 mm posterior to bregma of the Mouse Brain Atlas, Paxinos, 2001) of double immunostaining of NeuN (Alexa-488 showed in fake color blue) and GFAP (Alexa-555 showed in fake color green) labeled in slices of (A) FAS-fixed brain, (D) SSS-fixed brain, and (G) AS-fixed brain.

Scale bars = 500 µm. Photomicrographs (60X) of NeuN in the layers 2–3 of the secondary motor cortex (blue) for (B) FAS, (E) SSS, and (H) AS-fixed brains. Photomicrographs (60X) of GFAP in the external capsule (green) for (C) FAS, (F) SSS, and (I) AS. Scale bar = 15 µm [valid for (B,C,E,F,H, I)].

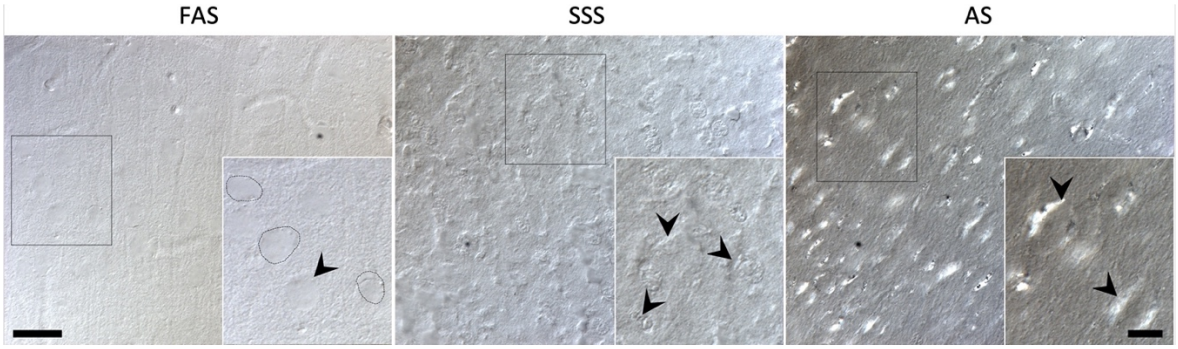


FIGURE 8 Tissue integrity of the immunofluorescence processed slices. Photomicrographs (60X) of DIC illuminated tissue slices of the immunofluorescence negative control slices showing the texture of the brain tissue when fixed with (A) FAS, (B) SSS, and (C) AS. Insert in A shows regular cell contours and smooth neuropil. Black arrowheads in insert (B) show shrunken and shriveled cells, while showing a broken neuropil in insert (C). Left scale bar = 25 µm [valid for (A–C)]. Right scale bar = 10 µm (valid for all three inserts).

2.6 Discussion

In this study, we investigated the impact of three different fixative solutions, one routinely used in brain banks and animal fixation studies, as well as two solutions used in human gross anatomy laboratories, on the histological quality of brain tissue immunostained for common antigens used in neuroscience research. Our goal was to determine whether the fixatives used in human anatomy procedures could produce histological sections of sufficient quality and preserve antigenicity when administered by perfusion without the confounding effect of post-mortem delay.

2.6.1 Perfusion quality

We first assessed the perfusion quality since it is the process by which the fixative is delivered to the organ, and potential differences in the flow through certain vessels could compromise the quality of the fixation. Specifically, we foresaw that the AS might be more difficult to perfuse

because it contains a high concentration of glycerol (17%) (Benet et al., 2014), which has a higher density and viscosity (Takamura et al., 2012; Ferreira et al., 2017). This caused the thin interventricular septum of the mouse to be broken more often, decreasing the perfusion quality of the AS specimens, which showed a higher frequency of signs of perfusion in the right ventricle, although not statistically significant. As expected, brains were easier to perfuse with FAS, showing significantly fewer signs of right ventricle injection (Winkelman and Beenackers, 2000).

Also, as anticipated, the AS-fixed brains were more often pink, reflecting a higher amount of blood in the brain after perfusion, hence a jeopardized perfusion (note that we did not exclude any of the pink-colored specimens; instead, we treated them with longer post-fixation times in the corresponding fixative solution and proceeded to assess the histology variables). Finally, we observed that AS-fixed brains were less prone to showing dilated vessels, which was an unexpected finding considering that the perfusion was done using a higher bag placement of a higher density solution, hence a higher pressure. We speculate that not the density, but the higher viscosity, which determines a slower and weaker flow through the brain vessels, is responsible for the less frequent occurrence of dilated vessels (Takamura et al., 2012; Ferreira et al., 2017; Wilkes, 2017). Alternatively, since dilated vessels may arise as a freezing artifact, the less frequent occurrence in AS specimens could be related to a protective effect against this freezing artifact determined by alcohol, namely glycerol (Bhattacharya, 2018; Kar et al., 2019; Zhang et al., 2020).

2.6.2 Ease of manipulation

We then assessed the ease of manipulation, which determines the ability to cut and mount a full slice, required for an accurate histology analysis. Softer tissue is more fragile, hence very difficult to cut into a full slice with a cryostat. Also, viscous tissue sticks to the brush used to manipulate the slices, which enhances tears or loss of tissue. In this regard, we found that the brains fixed with SSS were the most difficult to manipulate and the FAS-fixed slices were the easiest. This is in agreement with studies on human brains showing that FAS increases the rigidity of the tissue, while SSS-fixed brains are softer (Fox et al., 1985; Coleman and Kogan, 1998; Kiernan, 2000; Eltoum et al., 2001; Nicholson et al., 2005; Weisbecker, 2011; Brenner, 2014; Hayashi et al., 2014;

Balta et al., 2015; Musial et al., 2016; Haizuka et al., 2018; McFadden et al., 2019). Fortunately, even in the brains that were very soft, and most difficult to manipulate, we could still obtain analyzable slices for all the mice. Moreover, we found that the manipulation of AS-fixed brains was mostly good, and this means the fixative is sufficiently effective to produce tissue with a texture suitable for histology manipulation despite the poorer perfusion results that we obtained.

2.6.3 Tissue quality

Regarding the tissue quality, we assessed the neuropil and cellular shape since these characteristics reflect the changes in cell morphology that may be impacted by the different chemicals used for fixation (Troiano et al., 2009; Spencer and Bancroft, 2017). We speculate that the shrunken aspect of the neuronal cell bodies observed in SSS brains, but not in the FAS nor AS-fixed specimens, is related to the high concentration of isopropyl alcohol, which is a potent dehydrating fluid, only present in the SSS (Viktorov and Proshin, 2003). In addition, isopropyl alcohol could have also affected the higher occurrence of fissured neuropil in these brains. In the AS-fixed brains, the higher frequency of fissured neuropil may be due to the high concentration of ethanol, also used as a dehydrating agent (Viktorov and Proshin, 2003). However, despite the poorer tissue quality of AS- and SSS-fixed brains, all specimens clearly showed the targeted cells (**Figure 5**).

2.6.4 Antigenicity preservation

In addition to morphological tissue characteristics, we were mostly interested in assessing the presence or absence of antigens in the brains. The detection and quantification of antigens present in the main cells of the brain are essential in a wide range of topics of neuroscientific research, from demyelinating diseases to neurodegenerative processes (Durand-Martel et al., 2010; Hoffmann et al., 2011; Pietrzak et al., 2018; Filippi et al., 2019). We found that neurons were homogeneously labeled by NeuN, and myelinated axons by PLP. However, astrocytes were only present in the white matter tracts and surrounding the ventricles, while absent in the cortical gray matter. This is commensurate with multiple studies that characterize the two types of astrocytes: 1—fibrous, mostly present in the white matter tracts, and 2—protoplasmic, uniformly distributed through the cortical gray matter (Privat et al., 1995; Chen and Swanson, 2003; Sun

and Jakobs, 2012; Khakh and Deneen, 2019). Indeed, our results showed that GFAP is only expressed in the fibrous and radial populations of astrocytes, since there were no protoplasmic astrocytes labeled in the cortex, also in accordance with other studies showing that GFAP is most specific to fibrous astrocytes, and that protoplasmic astrocytes do not (or less) express GFAP (Walz, 2000; Chen and Swanson, 2003; Sun and Jakobs, 2012). Finally, microglia were labeled and homogeneously distributed throughout the slices, since Iba1 is commonly used and known to be expressed in both microglial and macrophage cells (Ito et al., 1998; Stankov et al., 2015; Hendrickx et al., 2017). Overall, our results showed that antigenicity for all the targets was equally preserved in brains fixed with any solution (**Figure 5**), opening the door to the use of brains fixed with solutions currently reserved for gross anatomy purposes.

2.6.5 Immunohistochemistry quality

Finally, we assessed two aspects of the immunolabeling quality that may impact the antigen detection. First, the background labeling, since the darker this background, the lower the contrast with the cells of interest that we aim to visualize, potentially, under-detecting them. Our work showed that SSS brains had the darkest backgrounds, but this did not preclude, in any specimens, the identification of the targeted antigens. Also, specimens fixed with the other two solutions also showed, albeit with a lower frequency, a dark background in some specimens. This reflects that backgrounds are not systematically always bright, intermediate, or dark for a given antigen or a given fixative solution, but this does not prevent an accurate antigen visualization. Second, we assessed the penetration of the antibodies in the full thickness of the slice, which will determine the visualization of the cells at any depth level. This penetration represents the permeabilization of the tissues, differently modified according to the chemical treatment. We found that the AS-fixed brains consistently showed better penetration for all antigens, including the suboptimal PLP, which was relatively less suboptimal with AS than with SSS and FAS. We speculate that this could be related to the chemical mixture of the AS, which contains ethanol

(resemblance of methanol), an alcohol known to permeabilize the membranes (Yuan et al., 2017) (Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA and Novus Biologicals, Centennial, CO, USA).[19,20]

2.6.7 Immunofluorescence staining

The antigenicity preservation was the same for NeuN and GFAP using IF and IHC, since all the antigens were present in all slices of all specimens. Neurons were labeled homogeneously through the cortex and deep gray matter, while astrocytes were present homogeneously in the white matter (internal and external capsules). Regarding the auto-fluorescence criterion, it was present in the two channels (488 and 555) of all specimens, while a little higher in NeuN for FAS-fixed brains and in 555 for AS-fixed brains. However, these levels of auto-fluorescence are still reasonable and did not hamper the visibility or the assessment of the antigens, which are still readily apparent. Finally, the IF and IHC techniques were comparable regarding the tissue quality, since the same artifacts (i.e., broken neuropil and shrunken/shriveled cells) were present in slices treated with both visualization techniques, although visible only using DIC when using IF-stained slices.

2.6.8 Study limits

Our work is not without limitations. First, when assessing the ease of manipulation of the slices, we did not quantify the number of slices that were torn and discarded. Second, although we targeted antigens present in different cells of the central nervous tissue, we did not test many other antigens that could be of interest in neuroscientific research, such as oligodendrocyte markers, cluster of differentiation (CD) markers, extracellular matrix markers, and other myelin antigens (e.g., myelin-associated glycoprotein or myelin oligodendrocyte glycoprotein) (Lyck et al., 2008). Also, we are aware that our analysis was strictly qualitative. We did not consider in-depth quantitative analyses (e.g., stereology to quantify the number of cells, standardized image software to score the backgrounds) at this stage, as we first wanted to assess the feasibility of these procedures (and therefore, their quality) before developing image and cellular counting

[19] https://www.novusbio.com/support/fixation- and- permeabilization- in- icc- if
[20] https://www.cellsignal.com/learn- and- support/protocols/ protocol- if- methanol

strategies. Finally, we could also have assessed other basic colorations (e.g., luxol fast blue or cresyl violet), but we considered the assessment of the degradation of specific antigens as a more relevant objective given their use in quantitative neuroscientific research and the impact of chemicals on antigen conformation (i.e., cross-linking) (Puchtler and Meloan, 1985; Aoki et al., 1999; Eltoum et al., 2001; Lyck et al., 2008; Yamaguchi and Shen, 2013; Kuhlmann et al., 2017; Zhou et al., 2017).

Finally, another limitation consists on the comparability of the mouse and the human fixation techniques. The perfusion of the mice is done using gravity and without post-mortem delay, while humans are perfused after variable post-mortem delays and using a pump, which could potentially produce differences in the efficiency of the fixation between the two specimens. However, it is not possible to perfuse full human bodies using a gravity technique, nor it is meaningful to assess fixation by perfusion of dead mice with delays of up to 48 h (potential maximum delay in human anatomy laboratories). Furthermore, mice brains are cryoprotected and frozen following the perfusion, while human brains are extracted after a more lengthy fixation period (up to 8 months) and kept in an aldehyde or alcohol solution until use. However, the goal of the present study was not to assess differences across species, nor to recreate in mice the confounding post-mortem variables that affect human bodies. Our goal was to assess how fixative solutions with different chemical compositions affect brain tissue obtained in optimal conditions, as it is the case with mice. In other words, we designed the study to have a single independent variable (type of solution used) determining the differences in histology procedures and quality (dependent variables). Our results are promising for further studies on human brain tissue, and we acknowledge that the present IHC results could be superior to the results that we will obtain in humans, where the confounding variables related to delayed fixation (among others) cannot be avoided.

2.6.9 Relevance for human tissue analysis

Even though there are technical and procedural differences in the fixation of mice and human tissue that add confounding variables to the latter (presented in the Study Limits section), there are some similarities in the techniques. For example, we cut blocks of human brains of similar

volume than that of mice brains and then apply an identical cryopreservation procedure (overnight immersion in a sucrose solution). Once the tissue is frozen, both mice and human samples are cut in slices of identical thickness using a cryostat. Hence, regardless of the confounding variables, we expect that brain samples will provide useful tissue using IHC stains. Furthermore, we foresee adequate IHC results, given the positive immunofluorescence signal for myelin and neurons that our group obtained in a pilot study using human brains fixed with a salt-saturated solution (Maranzano et al., 2020). Future studies, in human brains fixed with all three different solutions, will address the following: 1—the analysis of cryopreserved and paraffin-imbedded samples, given the relevance of the latter in human histopathology, 2—IHC quality of all antigens, and antigen retrieval techniques, which might be necessary if antigen structures are affected by confounding variables (e.g., long post-mortem delays may induce changes in protein tertiary conformation), and 3—weighting the impact of the confounding variables when collecting enough number of specimens (e.g., comparison of antigenicity in brains fixed 12 h post-mortem vs. 24 h, vs. 36 h, vs. 48 h post-mortem). These studies, which imply much longer periods to collect enough human brain specimens, will fully unveil the real potential of using human brains fixed in gross anatomy laboratories.

2.6.10 Conclusion

Our work is the first to compare the quality and antigenicity of mice brain tissue fixed with solutions currently used in human gross anatomy laboratories. Even if FAS, routinely used in brain banks and animal fixation, produces better histology quality, we have successfully shown that antigenicity of four cell populations is preserved with two solutions used by anatomists. This opens the door to the use of human brains fixed with SSS and AS to assess different diseases using IHC. Further studies will test the same variables in human brain samples, optimizing the IHC protocol of SSS specimens to reduce the darkness of the background. These studies will also consider the post-mortem delay as a confounding variable, to evaluate the most suitable fixation method for both human dissection and research.

2.6.11 Acknowledgements

We thank the funding resources, the Anatomy Department staff of the University of Quebec in Trois-Rivières for their support, and the Animal Care Facilities staff for their help in some procedures.

2.7 References

Aoki, T., Kobayashi, K., and Isaki, K. (1999). Microglial and astrocytic change in brains of Creutzfeldt-Jakob disease: an immunocytochemical and quantitative study. *Clin. Neuropathol.* 18, 51–60.

Au-Rana, A., Au-Massa, P. T., and Au-Chen, X. J. (2022). A Gravity-fed Transcardial Perfusion Method for Histologic Analysis of the Mouse Central Nervous System. *JOVE* 179:e63386. doi: 10.3791/63386

Balta, J. Y., Cronin, M., Cryan, J. F., and O'mahony, S. M. (2015). Human preservation techniques in anatomy: A 21st century medical education perspective. *Clin. Anat.* 28, 725–734. doi: 10.1002/ca.22585

Benet, A., Rincon-Torroella, J., Lawton, M. T., and González Sánchez, J. J. (2014). Novel embalming solution for neurosurgical simulation in cadavers. *J. Neurosurg.* 120, 1229–1237. doi: 10.3171/2014.1.JNS131857

Bhattacharya, S. (2018). "Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process," in *Cryopreservation Biotechnology in biomedical and biological sciences*, ed. Y. Bozkurt (Turkey: Iskenderun Technical University).

Birkl, C., Langkammer, C., Golob-Schwarzl, N., Leoni, M., Haybaeck, J., Goessler, W., et al. (2016). Eects of formalin fixation and temperature on MR relaxation times in the human brain. *NMR Biomed.* 29, 458–465.

Brenner, E. (2014). Human body preservation - old and new techniques. *J. Anat.* 224, 316–344.

Carlos, A. F., Poloni, T. E., Medici, V., Chikhladze, M., Guaita, A., and Ceroni, M. (2019). From brain collections to modern brain banks: A historical perspective. *Alzheimers Dement.* 5, 52–60. doi: 10.1016/j.trci.2018.12.002

Caviness, V. S. Jr. (1975). Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *J. Comp. Neurol.* 164, 247–263. doi: 10.1002/cne.901640207

Chen, Y., and Swanson, R. A. (2003). Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 137–149.

Coleman, R., and Kogan, I. (1998). An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. *J. Anat.* 192, 443–446. doi: 10. 1046/j.1469-7580.1998.19230443.x

Dawe, R. J., Bennett, D. A., Schneider, J. A., Vasireddi, S. K., and Arfanakis, K. (2009). Postmortem MRI of human brain hemispheres: T2 relaxation times during formaldehyde fixation. *Magn. Reson. Med.* 61, 810–818. doi: 10.1002/mrm.21909

den Bakker, M. A. (2017). [Is histopathology still the gold standard?]. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* 160:D981.

Durand-Martel, P., Tremblay, D., Brodeur, C., and Paquet, N. (2010). Autopsy as gold standard in FDG-PET studies in dementia. *Can. J. Neurol. Sci.* 37, 336–342. doi: 10.1017/s0317167100010222

Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R. B., and Grizzle, W. E. (2001). Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues. *J. Histotechnol.* 24, 173–190.

Ferreira, A. G. M., Egas, A. P. V., Fonseca, I. M. A., Costa, A. C., Abreu, D. C., and Lobo, L. Q. (2017). The viscosity of glycerol. *J. Chem. Thermodynam.* 113, 162–182.

Filippi, M., Brück, W., Chard, D., Fazekas, F., Geurts, J. J. G., Enzinger, C., et al. (2019). Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 18, 198–210.

Fisher, M. M. (1905). The toxic eects of formaldehyde and formalin. *J. Exp. Med.* 6, 487–517.

Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., and Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 845–853.

Frølich, K. W., Andersen, L. M., Knutsen, A., and Flood, P. R. (1984). Phenoxyethanol as a nontoxic substitute for formaldehyde in long-term preservation of human anatomical specimens for dissection and demonstration purposes. *Anat. Rec.* 208, 271–278. doi: 10.1002/ar.1092080214

Haizuka, Y., Nagase, M., Takashino, S., Kobayashi, Y., Fujikura, Y., and Matsumura, G. (2018). A new substitute for formalin: Application to embalming cadavers. *Clin. Anat.* 31, 90–98. doi: 10.1002/ca.23011

Hayashi, S., Homma, H., Naito, M., Oda, J., Nishiyama, T., Kawamoto, A., et al. (2014). Saturated Salt Solution Method: A Useful Cadaver Embalming for Surgical Skills Training. *Medicine* 93:e196. doi: 10.1097/MD.0000000000000196

Hendrickx, D. A. E., Van Eden, C. G., Schuurman, K. G., Hamann, J., and Huitinga, I. (2017). Staining of Hla-Dr, Iba1 and Cd68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J. Neuroimmunol.* 309, 12–22. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.04.007

Hoffmann, A., Bredno, J., Wendland, M. F., Derugin, N., Hom, J., Schuster, T., et al. (2011). Validation of in vivo magnetic resonance imaging blood-brain barrier permeability measurements by comparison with gold standard histology. *Stroke* 42, 2054–2060.

Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., and Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol. Biol.* 1897, 299–311.

Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., and Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 57, 1–9. doi: 10.1016/s0169-328x(98)00040-0

Kar, M., Chourasiya, Y., Maheshwari, R., and Tekade, R. K. (2019). “Chapter 2 - Current Developments in Excipient Science: Implication of Quantitative Selection of Each Excipient in Product Development,” in *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, ed. R. K. Tekade (Netherlands: Academic Press).

Khakh, B. S., and Deneen, B. (2019). The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* 42, 187–207.

Kiernan, J. A. (2000). Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do. *Microscopy Today* 8, 8–13.

Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Brück, W., and Lassmann, H. (2017). An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol.* 133, 13–24.

Lyck, L., Dalmau, I., Chemnitz, J., Finsen, B., and Schrøder, H. D. (2008). Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *J. Histochem. Cytochem.* 56, 201–221. doi: 10.1369/jhc.7A7187. 2007

Maranzano, J., Dadar, M., Bertrand-Grenier, A., Frigon, E. M., Pellerin, J., and Plante, S. (2020). A novel ex vivo, in situ method to study the human brain through Mri and histology. *J. Neurosci. Methods* 345:108903. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020. 108903

McFadden, W. C., Walsh, H., Richter, F., Soudant, C., Bryce, C. H., Hof, P. R., et al. (2019). Perfusion fixation in brain banking: a systematic review. *Acta Neuropathol. Commun.* 7:146. doi: 10.1186/s40478-019-0799-y

Mouritzen Dam, A. (1979). Shrinkage of the brain during histological procedures with fixation in formaldehyde solutions of dierent concentrations. *J. Hirnforsch.* 20, 115–119.

Musial, A., Gryglewski, R. W., Kielczewski, S., Loukas, M., and Wajda, J. (2016). Formalin use in anatomical and histological science in the 19th and 20th centuries. *Folia Med. Cracov.* 56, 31–40.

Nicholson, H. D., Samalia, L., Gould, M., Hurst, P. R., and Woodroe, M. (2005). A comparison of dierent embalming fluids on the quality of histological preservation in human cadavers. *Eur. J. Morphol.* 42, 178–184. doi: 10.1080/ 09243860500473306

Paul, C. A., Beltz, B., and Berger-Sweeney, J. (2008). Perfusion of brain tissues with fixative. *CSH Protoc.* 2008:db.rot4802.

Paxinos, G. K. B. J. F. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. The Netherlands: Elsevier.

Pietrzak, K., Czarnecka, K., Mikiciuk-Olasik, E., and Szymanski, P. (2018). New Perspectives of Alzheimer Disease Diagnosis - the Most Popular and Future Methods. *Med. Chem.* 14, 34–43.

Privat, A., Gimenez-Ribotta, M., and Ridet, J.-C. (1995). “Morphology of astrocytes,” in *Neuroglia*, eds H. Kettenman and B. R. Ransom (New York: Oxford University Press), 3–22.

Puchtler, H., and Meloan, S. N. (1985). On the chemistry of formaldehyde fixation and its eects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 82, 201–204.

Quick-Weller, J., Tichy, J., Harter, P. N., Tritt, S., Baumgarten, P., Bähr, O., et al. (2018). "Two is not enough" - Impact of the number of tissue samples obtained from stereotactic brain biopsies in suspected glioblastoma. *J. Clin. Neurosci.* 47, 311–314. doi: 10.1016/j.jocn.2017.09.032

Raja, D. S., and Sultana, B. (2012). Potential health hazards for students exposed to formaldehyde in the gross anatomy laboratory. *J. Environ. Health* 74, 36–40.

Raman, M. R., Shu, Y., Lesnick, T. G., Jack, C. R., and Kantarci, K. (2017). Regional T(1) relaxation time constants in Ex vivo human brain: Longitudinal eects of formalin exposure. *Magn. Reson. Med.* 77, 774–778. doi: 10.1002/mrm. 26140

Richins, C. A., Roberts, E. C., and Zeilmann, J. A. (1963). Improved Fluids For Anatomical Embalming And Storage. *Anat. Rec.* 146, 241–243. doi: 10.1002/ar. 1091460309

Spencer, L. T., and Bancroft, J. D. (2017). *Tissue processing* [Online]. New York: Basicmedical Key.

Stankov, A., Belakaposka-Srpanova, V., Bitoljanu, N., Cakar, L., Cakar, Z., and Rosoklija, G. (2015). Visualisation of Microglia with the use of Immunohistochemical Double Staining Method for CD-68 and Iba-1 of Cerebral Tissue Samples in Cases of Brain Contusions. *Pril* 36, 141–145. doi: 10.1515/ prilozi- 2015- 0062

Sun, D., and Jakobs, T. C. (2012). Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *Neuroscientist* 18, 567–588.

Takamura, K., Fischer, H., and Morrow, N. R. (2012). Physical properties of aqueous glycerol solutions. *J. Petrol. Sci. Engin.* 9, 50–60.

Tolhurst, D. E., and Hart, J. (1990). Cadaver preservation and dissection. *Europ. J. Plastic Surg.* 13, 75–78.

Troiano, N. W., Ciovacco, W. A., and Kacena, M. A. (2009). The Eects of Fixation and Dehydration on the Histological Quality of Undecalcified Murine Bone Specimens Embedded in Methylmethacrylate. *J. Histotechnol.* 32, 27–31. doi: 10.1179/his.2009.32.1.27

Turkoglu, E., Seckin, H., Gurer, B., Ahmed, A., Uluc, K., Pulfer, K., et al. (2014). The cadaveric perfusion and angiography as a teaching tool: imaging the intracranial vasculature in cadavers. *J. Neurol. Surg. B Skull Base* 75, 435–444. doi: 10.1055/s- 0034- 1386653

van Essen, H. F., Verdaasdonk, M. A., Elshof, S. M., De Weger, R. A., and Van Diest, P. J. (2010). Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde: influence on immunohistochemistry. *J. Clin. Pathol.* 63, 1090–1094. doi: 10.1136/ jcp.2010.079905

Viktorov, I. V., and Proshin, S. S. (2003). Use of isopropyl alcohol in histological assays: dehydration of tissue, enbessing into paran, and processing of paran sections. *Bull. Exp. Biol. Med.* 136, 105–106. doi: 10.1023/a:1026017719668

Vonsattel, J. P., Amaya Mdel, P., Cortes, E. P., Mancevska, K., and Keller, C. E. (2008). Twenty-first century brain banking: practical prerequisites and lessons from the past: the experience of New York Brain Bank, Taub Institute, Columbia University. *Cell Tissue Bank* 9, 247–258. doi: 10.1007/s10561-008-9079-y

Walz, W. (2000). Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia* 31, 95–103. doi: 10.1002/1098-1136(200008)31:2<95::aid- glia10>3.0.co;2- 6

Weisbecker, V. (2011). Distortion in formalin-fixed brains: Using geometric morphometrics to quantify the worst-case scenario in mice. *Brain Struct. Funct.* 217, 677–685. doi: 10.1007/s00429-011- 0366- 1

Wilkes, J. O. (2017). “Physical Properties: Density, Viscosity, and Surface Tension,” in *Fluid Mechanics for Chemical Engineers: with Microfluidics, CFD, and COMSOL Multiphysics 5.* 3rd ed, ed. Pearson (New York: Pearson).

Winkelman, J. G. M., and Beenackers, A. A. C. M. (2000). Correlations for the Density and Viscosity of Aqueous Formaldehyde Solutions. *Industr. Engin. Chem. Res.* 39, 557–562.

Yamaguchi, H., and Shen, J. (2013). Histological analysis of neurodegeneration in the mouse brain. *Methods Mol. Biol.* 1004, 91–113.

Yuan, F., Xiong, G., Cohen, N. A., and Cohen, A. S. (2017). Optimized Protocol of Methanol Treatment for Immunofluorescent Staining in Fixed Brain Slices. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 25, 221–224. doi: 10.1097/PAI. 0000000000000293

Zhang, T.-Y., Tan, P.-C., Xie, Y., Zhang, X.-J., Zhang, P.-Q., Gao, Y.- M., et al. (2020). The combination of trehalose and glycerol: an eective and non-toxic recipe for cryopreservation of human adipose-derived stem cells. *Stem Cell Res. Therapy* 11:460. doi: 10.1186/s13287-020-0 1969-0

Zhou, L., Huang, Y., Li, H., Fan, J., Zhangbao, J., Yu, H., et al. (2017). Mog- antibody associated demyelinating disease of the CNS: A clinical and pathological study in Chinese Han patients. *J. Neuroimmunol.* 305, 19–28. doi: 10.1016/j. jneuroim.2017.01.007

Chapitre 3 – Article 2 – Comparison of histological procedures and antigenicity of human post-mortem brains fixed with solutions used in gross anatomy laboratories.

3.1 Préface

Ce chapitre inclut le deuxième article de cette thèse qui a été publié en avril 2024 dans la revue Frontiers in Neuroanatomy. Le but de ce manuscrit était de comparer la qualité des cerveaux préservés avec différentes solutions de fixation utilisées dans les laboratoires d'anatomie humaine pour la fixation par perfusion des corps complets par rapport à la fixation traditionnelle utilisée par les banques de cerveau. Les protocoles histologiques ont été mis au point afin de démontrer les effets des différentes solutions sur les différents antigènes d'intérêt des cerveaux humains. De plus, des résultats préliminaires supplémentaires de la qualité de l'immunofluorescence sont présentés à la fin de ce chapitre, même si cela ne fait pas partie de l'article originalement publié.

Cet article a été publié comme :

Frigon E-M, Gérin-Lajoie A, Dadar M, Boire D and Maranzano J (2024) Comparison of histological procedures and antigenicity of human post-mortem brains fixed with solutions used in gross anatomy laboratories. *Front. Neuroanat.* 18:1372953. doi: 10.3389/fnana.2024.1372953

3.1.1 Contribution des auteurs

Eve-Marie Frigon : Conception et devis de recherche, protocoles expérimentaux, organisation des données, analyses statistiques, écriture du manuscrit.

Amy Gérin-Lajoie : Protocoles expérimentaux, révision du manuscrit.

Mahsa Dadar : Ressources, Révision du manuscrit.

Denis Boire : Conception et devis de recherche, analyses statistiques, révision du manuscrit.

Josefina Maranzano : Conception et devis de recherche, analyses statistiques, écriture du manuscrit.

3.1.2 Contribution scientifique

Cette étude a été publiée en libre accès dans un journal où la communauté scientifique pourra utiliser les protocoles histologiques qui ont été développés sur des cerveaux fixés dans les banques de cerveaux ou dans les laboratoires d'anatomie, en plus de démontrer la faisabilité de différentes techniques histopathologiques dans les cerveaux post-mortems.

3.2 Abstract

Background: Brain banks provide small tissue samples to researchers, while gross anatomy laboratories could provide larger samples, including complete brains to neuroscientists. However, they are preserved with solutions appropriate for gross-dissection, different from the classic neutral-buffered formalin (NBF) used in brain banks. Our previous work in mice showed that two gross- anatomy laboratory solutions, a saturated-salt-solution (SSS) and an alcohol-formaldehyde-solution (AFS), preserve antigenicity of the main cellular markers (neurons, astrocytes, microglia, and myelin). Our goal is now to compare the quality of histology and antigenicity preservation of human brains fixed with NBF by immersion (practice of brain banks) vs. those fixed with a SSS and an AFS by whole body perfusion, practice of gross-anatomy laboratories.

Methods: We used a convenience sample of 42 brains (31 males, 11 females; 25–90 years old) fixed with NBF (N = 12), SSS (N = 13), and AFS (N = 17). One cm3 tissue blocks were cut, cryoprotected, frozen and sliced into 40 µm sections. The four cell populations were labeled using immunohistochemistry (Neurons=neuronal-nuclei=NeuN, astrocytes=glial-fibrillary-acidic-protein=GFAP, microglia=ionized-calcium-binding-adaptor-molecule1=Iba1 and oligodendrocytes=myelin-proteolipid-protein=PLP). We qualitatively assessed antigenicity and cell distribution, and compared the ease of manipulation of the sections, the microscopic tissue quality, and the quality of common histochemical stains (e.g., Cresyl violet, Luxol fast blue, etc.) across solutions.

Results: Sections of SSS-fixed brains were more difficult to manipulate and showed poorer tissue quality than those from brains fixed with the other solutions. The four antigens were preserved, and cell labeling was more often homogeneous in AFS-fixed specimens. NeuN and GFAP were not always present in NBF and SSS samples. Some antigens were heterogeneously distributed in some specimens, independently of the fixative, but an antigen retrieval protocol successfully recovered them. Finally, the histochemical stains were of sufficient quality regardless of the fixative, although neurons were more often paler in SSS-fixed specimens.

Conclusion: Antigenicity was preserved in human brains fixed with solutions used in human gross-anatomy (albeit the poorer quality of SSS-fixed specimens). For some specific variables, histology quality was superior in AFS-fixed brains. Furthermore, we show the feasibility of frequently used histochemical stains. These results are promising for neuroscientists interested in using brain specimens from anatomy laboratories.

3.3 Introduction

Normal and pathological aging of the human brain are topics of extensive research in the neuroscientific community. However, *in vivo* research is limited since standard imaging techniques, such as magnetic resonance imaging (MRI), do not provide information on molecular and cellular changes in the brain (at the cellular level of microstructure). Therefore, histology remains the Gold Standard method to unveil cellular changes that directly reflect underlying physio-pathological mechanisms (Durand-Martel et al., 2010; Cardoso et al., 2014; den Bakker, 2017). Ideally, brain tissue biopsies and surgical resections could be used for histological analysis [such as seen in Kishore et al. (2023), for example] and correlated with *in vivo* MRI, but these samples are rarely available for research given the invasiveness and risks associated with brain biopsies. Hence, post-mortem (i.e., *ex vivo*) research is the preferred methodological approach, as it provides a larger amount of cerebral tissue available for histology and study of the molecular and cellular brain alterations.

Brain banks typically provide small blocks or single slices of post- mortem tissue to researchers. However, gross anatomy laboratories could potentially be an additional source of post-mortem brain tissue by providing more numerous and larger brain tissue samples, and even complete

brains. Currently, these brains are not used in neuroscientific research since they are preserved with solutions optimized for the preservation of bodies dedicated to gross anatomy dissection, that differ in composition from the classic neutral-buffered formalin solution (NBF) used in brain banks (Vonsattel et al., 2008; Beach et al., 2015; Carlos et al., 2019). Formaldehyde, along with alcohol, are the two most widely used chemicals for their antiseptic and antibacterial properties, and their capacity to reduce autolysis and therefore prevent tissue decomposition (Fox et al., 1985; Brenner, 2014; Musiał et al., 2016; Shetty et al., 2020; Martins-Costa et al., 2022). They also increase cross-linking of the proteins, affecting the antigens' conformation (Puchtler and Meloan, 1985; Beach et al., 1987; Dawe et al., 2009; van Essen et al., 2010; Birkl et al., 2016). Additionally, formaldehyde hardens and distorts the tissue (Mouritzen Dam, 1979; Weisbecker, 2011). Furthermore, formaldehyde has been proven carcinogenic (Fisher, 1905; Frølich et al., 1984; Raja and Sultana, 2012; Thavarajah et al., 2012; Musiał et al., 2016) and consequently, this has led to the search for alternative solutions in anatomy laboratories to reduce formaldehyde's harmful effects.

For instance, anatomy departments, such as ours at the University of Quebec in Trois-Rivières, have developed and use other fixative solutions that combine various chemicals, such as a saturated salt solution (SSS) (Coleman and Kogan, 1998; Hayashi et al., 2016), and an alcohol-formaldehyde solution (AFS), which contain ethanol, phenol, glycerol, and isopropylic alcohol, and a minimal concentration of formaldehyde. Comparative studies across these new fixative solutions have been exclusively anatomical (i.e., focused on the tissue flexibility and color, ease of dissection, lifespan of the specimens after dissection (i.e., time before contamination or decomposition), health hazards, costs, etc.) (Coleman and Kogan, 1998; Hayashi et al., 2014; Gulati et al., 2020; Shetty et al., 2020; Martins-Costa et al., 2022). However, to our knowledge, there are no studies on the ability of these solutions to preserve brain tissue adequately for (immuno)- histochemistry procedures. Instead, previous studies have focused on MRI (Schramek et al., 2013; Benet et al., 2014; Kanawaku et al., 2014; Maranzano et al., 2020; Nazemorroaya et al., 2022), other organs (Hopwood et al., 1989; Hammer et al., 2012; Cabrera et al., 2017; Lombardero et al., 2017; Rahman et al., 2021), or solutions with different chemical compositions than the SSS and the AFS currently employed by our laboratory (Hammer et al., 2012; Tomalty et

al., 2019; Rahman et al., 2021). Therefore, these studies were limited with regards to information on tissue quality and antigen preservation in brain specimens fixed with such solutions, which is crucial to decide whether these brains are suitable for neuroscientific research.

Our previous work in mice showed that two solutions used in human gross anatomy laboratories (i.e., SSS and AFS), and the standard solution used in brain banks (i.e., NBF), preserved antigenicity of markers of the four main brain cell populations (i.e., neurons, astrocytes, microglia, and myelin of oligodendrocytes). Our work also showed that histological sections of brains fixed with SSS were difficult to manipulate and of poor quality but were still serviceable for immunohistochemical (IHC) and immunofluorescence (IF) analyses (Frigon et al., 2022). These promising results in mice might have been attributed to the lack of confounding variables that inevitably affect human samples (i.e., post-mortem delay, lengthy fixation period, variable ages of the donors, potential presence of vascular disease). Besides, human and mice brain characteristics are not alike (Ventura-Antunes et al., 2013), and as such, fixation quality through vascular perfusion of the specimens might not be comparable. Furthermore, as cellular densities differ (Herculano-Houzel et al., 2011; Ventura-Antunes et al., 2013; Loomba et al., 2022), we cannot deduce whether antigenicity and histological quality are preserved in human brain tissue in a similar fashion. Also, conclusive evidence on whether common histochemical stains, typically used for diagnostic purposes and neuropathology research, are feasible on brains fixed with solutions such as SSS or AFS is lacking. Therefore, several histological procedures need to be explored in post-mortem human brain tissue fixed with solutions typically used by anatomists.

The goal of the present study is to compare the quality of histological outcomes applied to human brains fixed using brain banks' techniques (i.e., fixation by immersion in NBF) to those fixed with SSS or AFS by perfusion as applied in gross anatomy laboratories. We compared the ease of manipulation of the tissue, the tissue quality, the IHC labeling quality of four antigens of interest (neurons (anti- NeuN), astrocytes (anti-GFAP), microglia (anti-Iba1) and oligodendrocytic myelin protein (anti-PLP)) and the quality of various histochemical stains (i.e., Cresyl Violet, Luxol Fast Blue, Prussian blue and Bielchowsky's) across the three experimental groups.

3.4 Methods

3.4.1 Population

We used a convenience sample of 42 human brains (NBF: *N* = 12; SSS: *N* = 13; AFS: *N* = 17) from our body donation program (Université du Québec à Trois-Rivières, Canada) as well as the Douglas-Bell Canada Brain Bank (Douglas Mental Health University Institute, McGill University, Montréal, Canada). Prior to their death, the donors to the anatomy laboratory provided consent on body donation and sharing of medical information for teaching and/or research purposes. The study was approved by the University's Ethics Subcommittee on Anatomical Teaching and Research. Donors from the Brain Bank were obtained in collaboration with the Quebec Coroner's Office and with informed consent from the nearest relative, following the guidelines of the Douglas Research Center Ethic Committee.

The median age at time of death of the donors was 76 years old (range: 25 to 90). The male to female ratio was 3:1. The case number, age, sex, cause of death, post-mortem delay to the fixation treatment (i.e., post-mortem interval) and delay until the histology processing of the tissue, are reported in Table 1.

Table 1 – Specimen data

Fixative	Sex	ID	Age	Cause of death	PMI (hours)	Histology processing delay (years)	Histology block of neocortex
NBF	F	1	47	Intoxication	39	4	Frontal
		2	62	Acute coronary syndrome	48.25	3	Frontal
		3	47	Suicide	43	2	Frontal
		4	28	Undetermined	39.5	2	Frontal
		5	32	Cardiac arrest by intoxication	73.25	1.5	Frontal
	M	6	53	Alzheimer disease	24	6	Frontal
		7	61	Metastatic lung cancer	24	9	Frontal
		8	85	Pulmonary edema	12	5	Frontal
		9	74	Lung cancer	3.25	1	Temporal
		10	52	Coronary thrombosis	38.5	5	Frontal
		11	42	Suicide	47	4	Frontal
		12	63	Cardiac arrest	47.75	1.5	Frontal
SSS	F	13	67	MPOC	36	2	Frontal
		14	75	Multiple sclerosis	27	2	Frontal
		15	84	Myocardial infarction	60	1	Parietal
		16	87	Pneumonia	9.5	1	Temporal

		17	44	Oligodendroglioma	24	2	Frontal
		18	80	Pneumonia	24	2	Frontal
		19	83	Heart failure	20	1	Temporal
		20	76	Pneumonia	6	3	Parietal
	M	21	25	Glioblastoma	42	1	Frontal
		22	64	Larynx cancer	7.5	3	Temporal
		23	87	Lung cancer	7.5	3	Parietal
		24	59	Severe malnutrition	24	3	Parietal
		25	85	Lung cancer	16.5	1	Frontal
	F	26	64	Pneumonia, dementia	15.5	2	Temporal
		27	59	Metastatic lung cancer	18	9	Frontal
		28	82	Metastatic colon cancer	22	1	Temporal
		29	61	Metastatic lung cancer	24	9	Temporal
		30	90	Metastatic prostate cancer	37	2	Temporal
		31	88	Myocardial infarction	12	2	Frontal
		32	82	Pneumonia and infarction	48	10	Frontal
		33	86	Colon cancer	48	6	Frontal
AFS		34	79	Tongue, throat, lung cancer	22	1	Frontal
	M	35	80	Alzheimer disease, pyelonephritis	12	4	Frontal
		36	82	Large-cell lymphoma	21	8	Frontal
		37	70	Lung cancer	10	15	Frontal
		38	86	Myocardial infarction	42	12	Parietal
		39	81	Lung cancer	21	8	Occipital
		40	88	Sepsis	31.5	13	Occipital
		41	84	Respiratory failure	22	5	Parietal
		42	78	Lung cancer	20	2	Frontal

PMI=Post-mortem interval; NBF=Neutral-buffered formalin solution; SSS=Saturated salt solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution; F=Female; M=Male.

3.4.2 Fixation procedure

All specimens were fixed with one of three solutions (chemical components are shown in Table 2). NBF-fixed brains were extracted fresh and then immersed in 4 liters of NBF following the brain bank technique and kept in formaldehyde until use. For SSS and AFS, the bodies were perfused with 25 L of one of the solutions through the common carotid artery using a pump (41 kPa) (Duotronic III, Hygeco International Products) which is the common embalming technique performed in gross anatomy laboratories (Maranzano et al., 2020). All the specimens were kept refrigerated until use. The brains were extracted, and 1 cm3 blocks (neocortex for gray matter and subcortical white matter) were taken, choosing an area that was macroscopically of good quality (no superficial tears, good color and texture) and not damaged during the extraction and arachnoid removal procedure.

Table 2 – Fixative's components

NBF	**SSS** (Coleman and Kogan, 1998)	**AFS**
10% formalin	0.296% formaldehyde	1.42% formaldehyde
0.1M PBS	36% NaCl	69% ethanol
	0.72% phenol	1.88% phenol
	2% glycerol	20.7% glycerol
	16% isopropylic alcohol	0.01% sodium acetate
		0.13% Dettol

NBF=Neutral-buffered formalin solution; SSS=Saturated salt solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution; PBS=Phosphate-buffer saline

3.4.3 Histology processing

Blocks were rinsed in 0.1 M PBS and immersed in 30% sucrose for 2 to 5days (until the floating block sinks, which is the sign of appropriate sucrose diffusion into the tissue) for cryoprotection. Blocks were then frozen on dry ice before cutting 40 µm sections on a cryostat (Leica CM1950) at -19°C, that were either 1-mounted on 2% gelatin-subbed slides for the histochemical stains (Cresyl violet, Luxol Fast blue, Prussian blue and Bielchowsky's), or 2-placed in well plate with PBS for subsequent free-floating IHC procedures. After IHC or histochemical staining (see the sections below), the sections were dehydrated in 5-min baths of increasing grades of ethanol (70, 95, 100%) and coverslipped using Eukitt.

3.4.4 Immunohistochemistry

Free-floating sections were rinsed three times for 5 minutes in 0.1 M PBS. They were then incubated in a 20% aqueous methanol solution with 0.5% H2O2 for 5minutes to quench endogenous peroxidase. After another round of rinses (3x5minutes in 0.1M PBS), sections were incubated in blocking solution for 2 hours (3% Normal Donkey Serum; 0.5% Bovine Serum Albumin; 0.3% Triton X-100 in 0.1 M PBS), followed by the primary antibodies' (Table 3) incubation at 4°C in the same blocking solution overnight. Sections were rinsed again (3x5minutes in 0.1 M PBS) before a two-hour incubation in donkey anti-rabbit biotinylated secondary antibody (1:500) at room temperature in the same blocking solution. After another rinse, sections were incubated in an avidin-biotin complex (ABC) kit for 30 minutes in the dark (VECTASTAIN® Elite®

ABC-HRP Kit, Vector Laboratories, catalog#VECTPK6100). Sections were then rinsed for 5minutes in TRIS-buffered saline (TBS) (0.05M, 0.9% NaCl) before the final incubation in 0.07% diaminobenzidine (DAB) (Sigma, #D5905-50TAB) with 0.024% H2O2 in TBS for 10 minutes.

Table 3 – Immunohistochemical antibodies

Primary antibodies	**Animal**	**Laboratory**	**Dilution**	**Code**
Anti-Neuronal nuclei (NeuN)	Rabbit	Abcam	1:3000	Ab177487
Anti-Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Rabbit		1:1000	Ab68428
Anti-Ionized calcium binding adaptor molecule1 (Iba1)	Rabbit		1:1000	Ab178847
Anti-Myelin proteolipid protein (PLP)	Rabbit		1:3000	Ab254363
Secondary antibody	**Animal**	**Laboratory**	**Dilution**	**Code**
Anti-Rabbit Biotinylated	Donkey	NovusBio	1:500	NBP1-75274

3.4.5 Histochemical stains

All specimens were also processed for four histological stains, commonly used in brain histopathology, namely 1-Cresyl Violet (endoplasmic reticulum of the cell nuclei, Nissl bodies), 2-Luxol Fast Blue (myelin), 3-Prussian blue (iron stain with a neutral red counterstain for Nissl bodies), and 4-Bielchowsky's (neurofibrils and axons). Prior to the staining, sections were defatted in Xylene for 30 min and hydrated in increasing alcohols −100% Ethanol 2 × 1 min; 3–95% Ethanol 2 × 1 min; 70% Ethanol 2 × 1 min; H2Od 1 min. After the staining (see protocols below), a dehydration process was applied using the same baths, but in a reverse order.

3.4.5.1 Cresyl violet

Cresyl violet (CV) stains the endoplasmic reticulum and the cellular nuclei in dark purple, which includes, in the brain, cell bodies of neurons and glial cells (Eilam-Altstädter et al., 2021). The protocol followed guidelines of US Army Inst Pathol (Luna and Armed Forces Institute of, 1968), in which the sections were hydrated first, submerged for 1 h15 in 0.01% Cresyl violet (Sigma Aldrich catalog #C5042) in a 0.1 M acetate buffer (Anachemia, AC-8218) and 0.1 M acetic acid (BDH 10001CU), and then dehydrated.

3.4.5.2 Luxol fast blue

Luxol flast blue (LFB) stains myelin, and should be dark blue in the white matter, and lighter blue (or even clear) in the gray matter. We followed principal guidelines and adapted the protocol from Pathology Center-Histological methods for CNS1 (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science) for this staining. The sections were incubated 2 h at 45°C in 0.1% Luxol Fast Blue (Solvent blue 38, Sigma Aldrich, catalog #S3352) in 95% Ethanol, then rinsed in H2Od. The differentiation (clearing over-dye) was performed in 0.05% Lithium carbonate (Sigma Aldrich, catalog #62470) for 1 min before immersion in 70% Ethanol for 10 min.

3.4.5.3 Prussian blue

Prussian blue was performed to stain ferric iron in blue in combination with a Nuclear fast red counterstain which stains cell nuclei in pink. Iron Stain Kit (Abcam, ab150674) was used according to the manufacturer's protocol.2 In order to assess the feasibility of this staining, we included cases diagnosed with Alzheimer's disease in which we expected to detect iron (LeVine, 1997). Once validated, we proceeded to stain all the other specimens.

3.4.5.4 Bielchowsky silver stain

Bielchowsky's method is a silver staining protocol to label nerve fibers and neurofibrils in dark brown/black, and is commonly used to demonstrate neurofibrillary tangles and senile plaques in the central nervous system (Stahnisch, 2015). Our protocol was inspired from Bielchowsky's Silver Stain protocol by Paul Polak and Douglas Feinstein, University of Illinois, Chicago (abcam) and IHC world3 and adapted as follows: sections were placed into a 10% Silver nitrate (Sigma Aldrich, catalog #209139) solution for 20 min at 40°C, following 3 rinses in water and another 20 min incubation at 40°C in the same silver nitrate solution that was titrated with high-concentrated ammonium hydroxide (ThermoScientific, catalog #423305000). Sections were then placed 1 min in a working developer solution (8 drops of Stock Solution +8 drops of ammonium hydroxide +50 mL of water; Stock solution: 20 mL of 37% formaldehyde +0.5 g of Citric acid +2 drops of Nitric acid +100mL of water), followed by a 1% ammonium hydroxide incubation. Sections were rinsed in water three times before a 5min bath of 5% Sodium Thiosulfate (Sigma Aldrich, catalog #S7026).

3.4.6 Variables of interest

The sections were assessed for multiple variables using a brightfield microscope (Olympus BX51W1) controlled by Neurolucida software (MBF Bioscience). We scored the IHC and histochemical stains variables to create qualitative categories that were compared for the three groups (fixatives) by looking through all the sections that were available for each specific staining. All variables were scored by a rater having 5-years experience in histology procedures and microscopy analysis (EMF). Figure 1 shows scoring of the criteria for different IHC variables (tissue quality and antigenicity preservation) that were assessed, while Figure 2 shows scoring of the criteria used for the four histochemical stains (see Supplementary Table S1 for all detailed scores of each specimen).

3.4.6.1 Ease of manipulation

The first variable of interest was assessed during the processing of sections, i.e., cutting, well transfers, mounting on slides. We used four signs to assess the ease of manipulation: 1-slice consistency (soft or firm), 2- presence of tears (yes/no), 3- slices sticking to the brush that was used to manipulate/mount the slice (yes/no), and 4- presence of rolling slices (yes/no). Scores ranged from: Very poor (4 signs present = 0), Poor (3 signs present = 1), Good (1 or 2 signs present = 2) to Very good (No sign present = 3).

3.4.6.2 Tissue quality

We used two criteria to assess this variable, namely the neuropil uniformity and the cellular shape, since it reflects the integrity of the tissue and the cellular morphology, susceptible to be differentially affected by the different chemicals (Spencer and Bancroft, 2008; Troiano et al., 2009) and the histology delay, which was in some specimens longer than 5 years. These criteria were assessed in the NeuN stained sections by scanning through the thickness of sections with a 60X objective (60X, UPlanSApo 60x/1.40 Oil∞/0.17/FN26.5 UIS2).

3.4.6.2.1 Neuropil uniformity

The tissue was of lower quality when there was presence of a fissured neuropil. Scores indicated: Fissured (Figure 1A), Uniform = 1 (Figure 1B).

3.4.6.2.2 Cellular shape

The neurons showed signs of altered shape (i.e., lower quality) if they presented an irregular and shriveled contour (irregular). Scores indicated: Irregular (shrunken/shriveled) = 0 (Figure 1A), Regular (smooth) = 1 (Figure 1B).

3.4.6.3 Antigenicity preservation

We looked at sections targeted for all the antigens to verify the cell distribution across the section, using a 4X objective to have a large field of view (4X, UPlanSApo 4x/0.16∞/–/FN26.5). Antigenicity preservation was scored from worse (reflecting destruction/cross-linking of the antigen) to best (reflecting ideal preservation of the antigen) as follows: 1-absence of labeling (Figure 1C); 2-heterogeneous distribution of the cells [presence of isolated cells (Figure 1D), 3-cells' patches (Figure 1E) or 4-a homogeneous distribution (Figure 1F)]. This was assessed for all the immunolabeled sections of the four antigens of interest. Scores indicated: Absence = 0 (Figure 1C), Isolated cells = 1 (Figure 1D), Cell patches = 2 (Figure 1E), Homogeneous distribution = 3 (Figure 1F).

Specimens that showed no antigenicity for one or more antigens or heterogeneous distribution (i.e., isolated cells or cell patches) were reprocessed following an antigen retrieval protocol. To this end, sections were subjected to 20-min boiling-citrate buffer (free-floating) and then immersed into a cold-water bath for 10min. The IHC procedures were then performed following the same protocols (section 2.4), and the sections were analyzed anew.

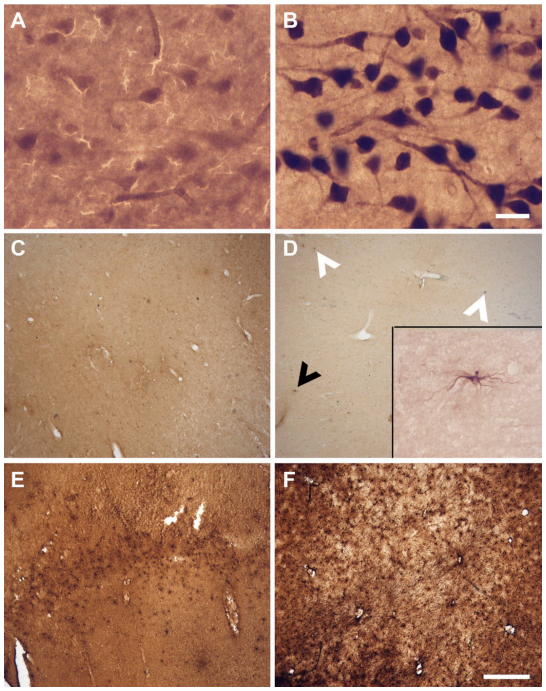


FIGURE 1 Photomicrographs of different criteria of the IHC categorical variables that were assessed. Photomicrographs (60X) of a fissured neuropil and shrunken and shriveled cells (A), compared to a uniform neuropil with regular cell contour (B) (Section 2.6.2.1 and 2.6.2.2). Scale bar = 25 µm [valid for (A,B)]. Photomicrographs (4X) of the antigenicity preservation and distribution as an example using GFAP labeling, where we can see astrocytes that were completely absent (C); isolated (D) [where arrowheads point out the cells, the black one being shown in the 60X insert; in patches (E)] or homogeneously distributed through the full analyzed sections (F) (Section 2.6.3). Scale bar = 500 µm [valid for (C–F)].

3.4.6.4 Histochemical stains' quality

We assessed four histochemical stains to evaluate the preservation of different cell populations in a non-immunological way.

3.4.6.4.1 Cresyl violet

A quality Nissl stain shows a clear contrast between well stained neuronal cell bodies with clear cytoplasmic granulations and the clear surrounding neuropil. Glial cells were strongly labeled in all cases, but neurons were heterogeneous in their staining. Therefore, a high contrast between the stained neuronal cell bodies and neuropil was considered as indicative of quality. This was

assessed at low (4X) and high (60X) magnification of all the labeled sections available. Scores indicated: No staining = 0 (Figure 2A), Pale neurons = 1 (Figure 2B), Dark neurons = 2 (Figure 2C).

3.4.6.4.2 Luxol fast blue

Luxol fast blue staining is known to dye myelinated axons and the oligodendrocytes' nuclei that produce this myelin sheath in the white matter of the brain (Lindberg and Lamps, 2018). LFB is frequently used in the diagnosis of multiple sclerosis, Alzheimer's disease, or white matter hyperintensities (Bronge et al., 2002; Laule et al., 2008; Gouw et al., 2011; Kuhlmann et al., 2017; Laule and Moore, 2018; Humphreys et al., 2019; Ouellette et al., 2020; Roseborough et al., 2020; Selvaraji et al., 2022). This staining was therefore important to assess in brains fixed with other solutions. The LFB stain was assessed by the contrast between the white matter and gray matter at low (4X) and high (60X) magnification. The white matter should show homogeneous distribution of fibers and be dark blue and should be clearly differentiated from the gray matter that should be free of staining or light blue. Scores indicated: No fibers and heterogeneous blue stain = 0 (Figure 2D); Heterogeneous fibers and differentiation = 1 (Figure 2E), Homogeneous fibers but bad differentiation = 2 (Figure 2F) and Homogeneous fibers and good differentiation = 3 (Figure 2G).

3.4.6.4.3 Prussian blue

Prussian blue staining (Perl's stain) is known to reveal ferric iron deposits in the neuropil of the brain (Churukian, 2008; Guindi, 2018; Xiao et al., 2023). This staining is of interest in neurodegenerative diseases, small vessel diseases, or white matter pathology detected by MRI, in which brains may be affected by such iron deposits (Connor and Benkovic, 1992; Kruer, 2013; Roseborough et al., 2020; Dusek et al., 2022). Since iron deposits did not occur in all specimens, this was not assessed in this staining; only the feasibility of the iron revelation in brains fixed with the three solutions was considered. However, we assessed the neutral red staining of the Prussian blue counterstain in a similar fashion as the cresyl violet. Scores indicated: No staining = 0 (Figure 2H), Pale neurons = 1 (Figure 2I), Dark neurons = 2 (Figure 2J).

3.4.6.4.4 Bielchowsky's

Bielchowsky's silver stain is known as a silver impregnation method for nervous tissue (Ogawa, 1990) which is used to visualize axons, neurofibrils and neurofibrillary tangles or neuritic plaques (Wisniewski et al., 1989; Love and Nicoll, 1992; Allsop, 2000; Switzer, 2000; Uchihara, 2007; Kovacs and Budka, 2010; Elobeid et al., 2014; Fan et al., 2018). The quality was assessed using two criteria: the fibers preservation/distribution and the background intensity.

3.4.6.4.5 Fibers' preservation and distribution

The stained sections were scanned at low (4X) magnification to obtain an overall field of view. The staining was considered of good quality when well-labeled, dark silver impregnated fibers were homogeneously distributed across the sections. Scores indicated: Absence = 0 (Figure 2K), Heterogeneous = 1 (Figure 2L), Homogeneous = 2 (Figure 2M).

3.4.6.4.6 Background

Silver stains are known to use toxic chemicals and are capricious, unpredictable and difficult to perform (Ogawa, 1990; Litchfield and Nagy, 2001), since silver binds and stains to chemicals, slides, mounting medium, dust, etc. Therefore, the background level of staining was assessed since non-specific silver deposits could vary according to the fixative solution and other variable conditions. Therefore, we observed the presence or absence of silver deposits in the background using the 60X objective, in which the presence of silver spots decreases the contrast of the well-stained fibers against the background, and therefore, a poorer quality of this staining. Scores indicated: Dark = 0 (Figure 2N), Intermediate = 1 (Figure 2O), Light = 2 (Figure 2P).

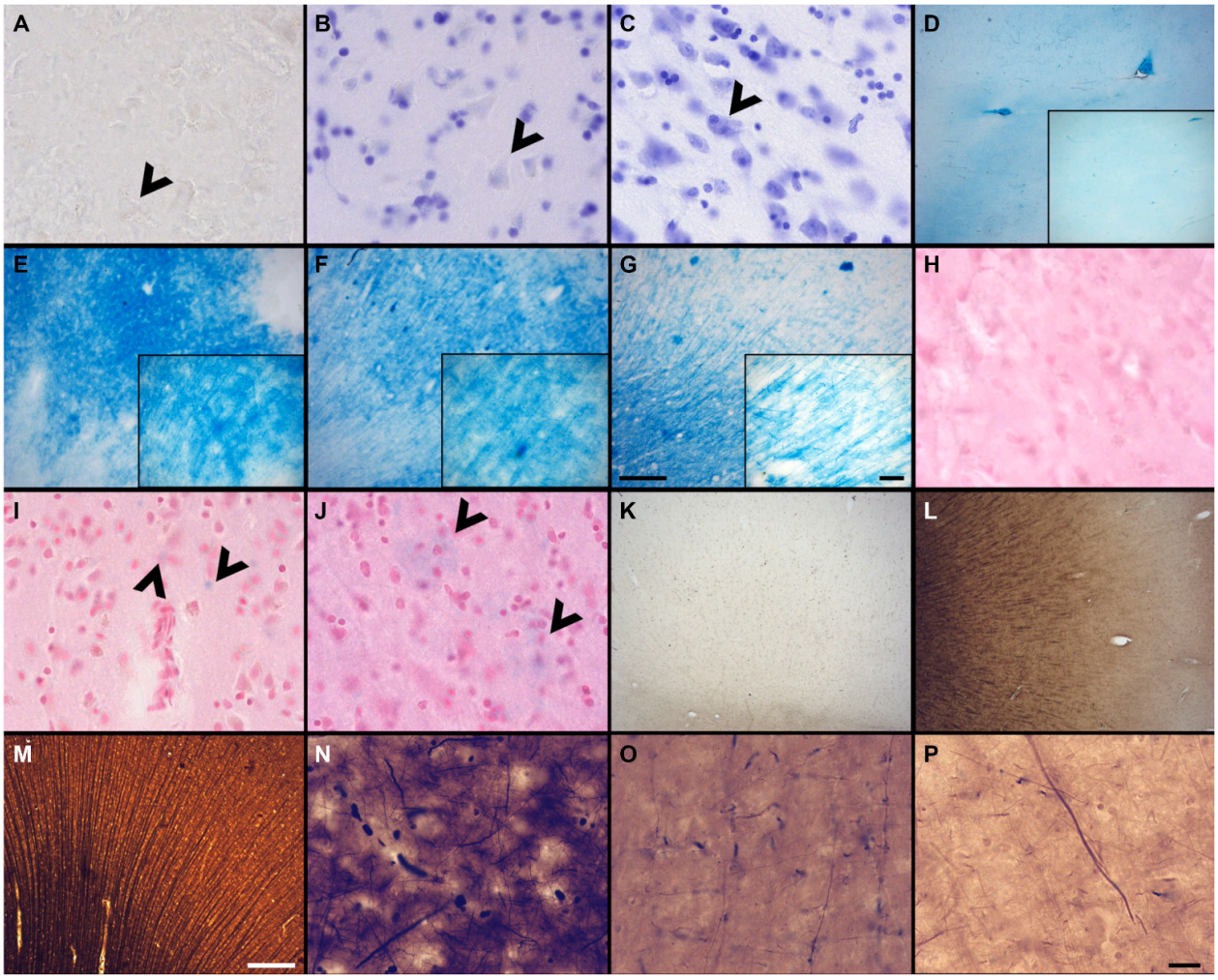


FIGURE 2 Photomicrographs of different criteria of the histochemical stains' categorical variables that were assessed. Photomicrographs (60X) of an absent cresyl violet staining (A), compared to when the neurons appear pale (B), or strongly labeled (dark) neurons (C) (Section 2.6.4.1). Arrowheads point out neurons. Photomicrographs (4X) of the distribution of fibers and white matter-gray matter contrasts of (D) no fibers and an heterogeneous blue stains; (E) heterogeneous fibers and differentiation; (F) homogeneous fibers, but bad differentiation; or (G) homogeneous fibers and good differentiation. Scale bar = 500 µm [valid for (D–G)]. Inserts in (D–G) show photomicrographs (20X) of the myelin fibers in the respective categories (Section 2.6.4.2). Scale bar = 100 µm [valid for (D–G) inserts]. Photomicrographs (60X) of an absent neutral red (counterstain of the Prussian blue) staining (H), compared to when the neurons appear pale (I), or strongly labeled (dark) neurons (J) (Section 2.6.4.3). Arrowheads show blue spots, representing iron accumulation. Photomicrographs (4X) of the fibers preservation in the

Bielchowsky's stain, where we can see absence of fibers (K), heterogeneous labeling of fiber (L) or homogeneous distribution of fibers (M). Scale bar = 500 µm [valid for (K–M)]. Photomicrographs (60X) of the background in Bielchowsky's stain (Section 2.6.4.4) that could be affected by silver deposits and therefore be dark (N), intermediate (O), or light (P). Scale bar = 25 µm [valid for (A–C,H–J,N–P)].

3.4.7 Confounding variables

All variables mentioned above were also assessed in relation to two confounding variables: the post-mortem interval and the histology delay, to determine whether they might have affected the variables of interest. Raw data is shown in Table 1. Also, see Supplementary Table S1 for all detailed scores of each specimen, and Supplementary Figures S1, S2 for scatter dot plots of all the variables of interest in relation to the confounding variables.

3.4.7.1 Post-mortem interval

The post-mortem interval (PMI) is the time elapsed between death of the donor and the administration of the fixative to the brain. The PMI could have an impact on the tissue quality since the brain could start to decompose prior to fixation. The acceptable PMI is 0 to 48 h, although in cases where the bodies have been refrigerated the interval may be extended an additional 24h. To assess this variable, we created two categories, for shorter or longer PMI: Short = 0–24 h; Long = >24 h. Note: the choice of 24 h to divide the full sample aimed to produce two groups of similar size. If the limit had been set before 24 h (i.e., 6 or 12 h), the size of the Short PMI group would have been too small to allow statistical analyses.

3.4.7.2 Histology processing delay

The histology delay (HD) corresponds to the time elapsed between the moment the brain was fixed (by perfusion in the anatomy laboratory), or from the moment it was immersed in NBF (brain bank technique), to the moment the histology procedures began. Since we used a convenience sample, this variable was not controlled for all specimens. Some brain blocks were obtained after the brains were used for years for teaching Anatomy laboratory, UQTR (and therefore immersed in 10% ethanol); immediately after the brains were extracted (if fixed by perfusion, UQTR), or after years of immersion in NBF (Douglas-Bell Canada brain bank). These differences may affect

the brains differently by causing different levels of cross-linking of the proteins (i.e., antigens). Therefore, we assessed this confounding variable creating two categories, for shorter or longer HD: Short=0–2years; Long = >2 years. Note: the choice of 2 years to divide the full sample aimed to produce two groups of similar size. If the limit had been set later (i.e., 4 or 6 years), the size of the Long HD group would have been too small to allow statistical analyses.

3.4.8 Statistical analyses

All categorical variables described above were compared across the three fixative groups using Chi-square tests. All statistical analyses were adjusted for multiple comparisons using Bonferroni correction and were performed using SPSS statistics software (28.0.0 version).

To assess for confounding variables, we also used Chi-square tests to relate the variables of interest (section 2.6) to each confounding variable (section 2.7), separately in each fixative group (NBF; SSS and AFS).

3.5 Results

3.5.1 Ease of manipulation

We found no statistically significant differences between treatment groups in the ease of manipulation scores, but we observed more cases fixed with SSS that scored poor for this criterion, while brains fixed with NBF never scored very poor for ease of manipulation. Also, a higher proportion of cases fixed with NBF and AFS scored good for this criterion (Figure 3).

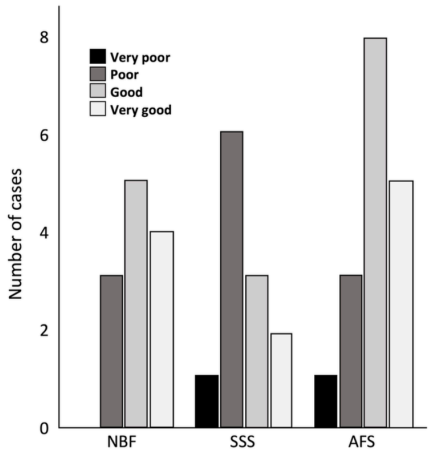


FIGURE 3 Bar charts of the ease of manipulation of the tissue. Very poor (black), 4 signs; Poor (dark gray), 3 signs; Good (light gray), 1 or 2 signs; Very good (white), no sign; NBF, neutral-buffered formalin; SSS, salt-saturated solution; AFS, alcohol-formaldehyde solution.

3.5.2 Tissue quality

Tissue quality was assessed according to two criteria, namely the uniformity of the neuropil and cellular shape. We found no significant difference in the frequency of occurrence of fissured neuropil across the three groups (Figure 4A). However, we found a significant difference in the frequency of scores for the cellular shape, between the three groups ($p < 0.001$). Regular cell contours were always observed in the NBF-fixed brains ($p < 0.001$), while irregular (shrunken and shriveled) cell contours were always found in SSS-fixed brains ($p < 0.001$) (Figure 4B).

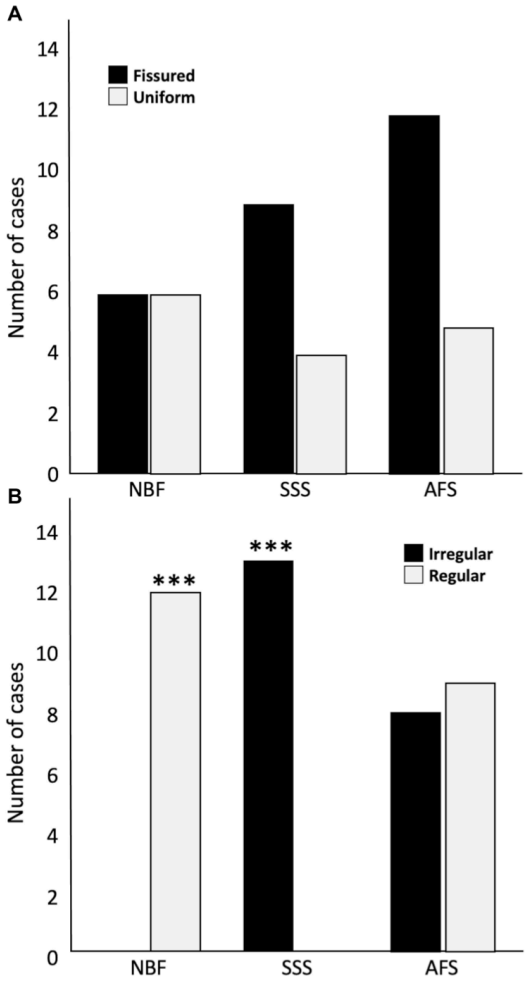


FIGURE 4 Bar charts of the tissue quality. Neuropil uniformity (A), either fissured = 0 (black) or uniform = 1 (white), and cellular shape (B), either irregular (shrunken and shriveled) = 0 (black) or regular (smooth) = 1 (white). ***, Significant after Bonferroni correction ($p < 0.001$); NBF, neutral-buffered formalin; SSS, salt-saturated solution; AFS, alcohol-formaldehyde solution.

3.5.3 Antigenicity preservation

The distribution of labeled cells of the four tested antigens was used to assess antigenicity preservation. A homogeneous distribution of NeuN labeling was significantly more frequent in AFS-fixed brains ($p = 0.0003$), whereas significantly higher occurrence of isolated labeled cells ($p = 0.0019$) and no homogeneous NeuN labeling ($p = 0.0019$) were observed in SSS fixed brains. NeuN antigenicity was preserved in most NBF-fixed specimens, except for three cases in which no labeled neurons were observed ($p = 0.005$; significant before a Bonferroni correction) (Figure 5A). Homogeneous distribution of GFAP labeling was observed in only one NBF-fixed specimen, and no labeled astrocytes were observed in three cases ($p = 0.005$; significant before a Bonferroni correction) (Figure 5B). Patchy Iba1 labeling occurred significantly more frequently ($p = 0.0037$) whereas homogeneous labeling of this marker occurred less frequently in NBF-fixed brains ($p = 0.005$; significant before a Bonferroni correction). Homogeneous distribution of Iba1 labeling was significantly more frequent, whereas patchy labeling was significantly less frequent in AFS-fixed brains ($p < 0.001$) (Figure 5C). Finally, PLP labeling was more frequently uniform (homogeneous or cell patches) in all AFS-fixed brains (more cases of cell patches: $p = 0.046$ before a Bonferroni correction). Conversely PLP labeling was absent in three SSS-fixed cases and two NBF-fixed cases (Figure 5D).

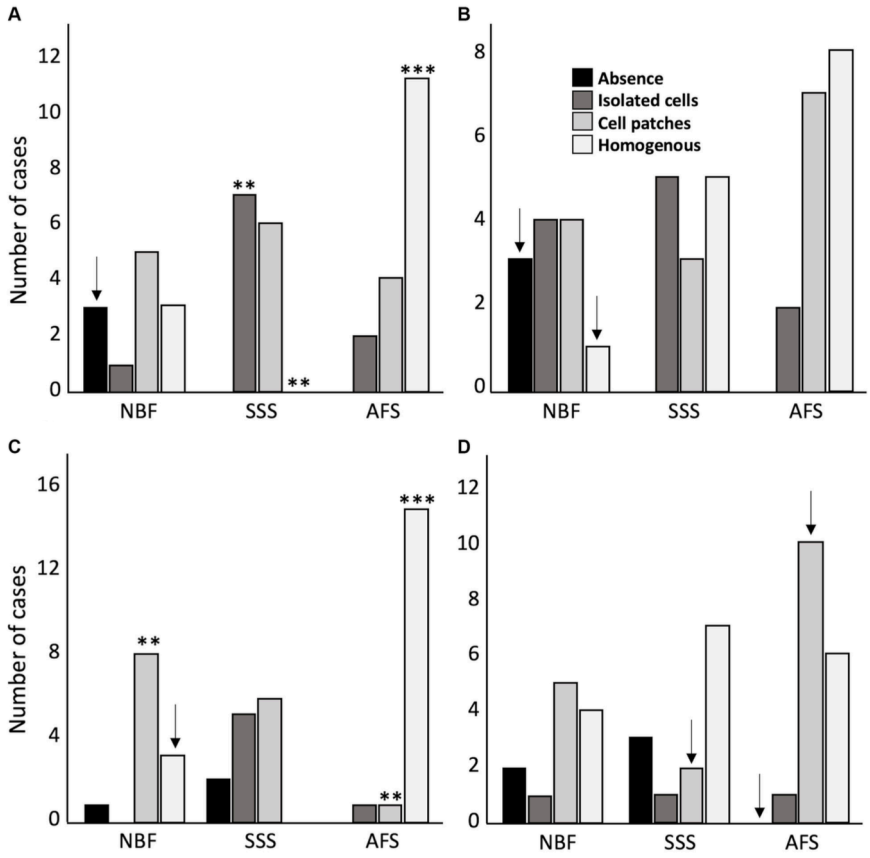


FIGURE 5 Antigenicity preservation and cellular distribution of the four main brain cell populations. Cellular distribution of Neuronal nuclei (NeuN) (A), astrocytes (GFAP) (B), microglia (Iba1) (C) and oligodendrocytic myelin fibers (PLP) (D). No antigenicity = 0 (black); Isolated cells = 1 (dark gray); Cell patches = 2 (light gray); Homogeneous distribution = 3 (white). ** = Significant after Bonferroni correction ($p < 0.01$); *** = Significant after Bonferroni correction ($p < 0.001$); ↓ = Significant before Bonferroni correction; NBF = neutral-buffered formalin; SSS = salt-saturated solution; AFS = alcohol-formaldehyde solution.

In cases where our antibodies produced no labeling or only isolated labeled cells, we repeated the IHC procedures following the application of an antigen retrieval protocol. Antigenicity was recovered and produced a homogeneous labeling for all four markers in SSS and AFS-fixed brains (Figure 6). Nonetheless, NeuN and GFAP antigenicity was not recovered in three NBF fixed cases.

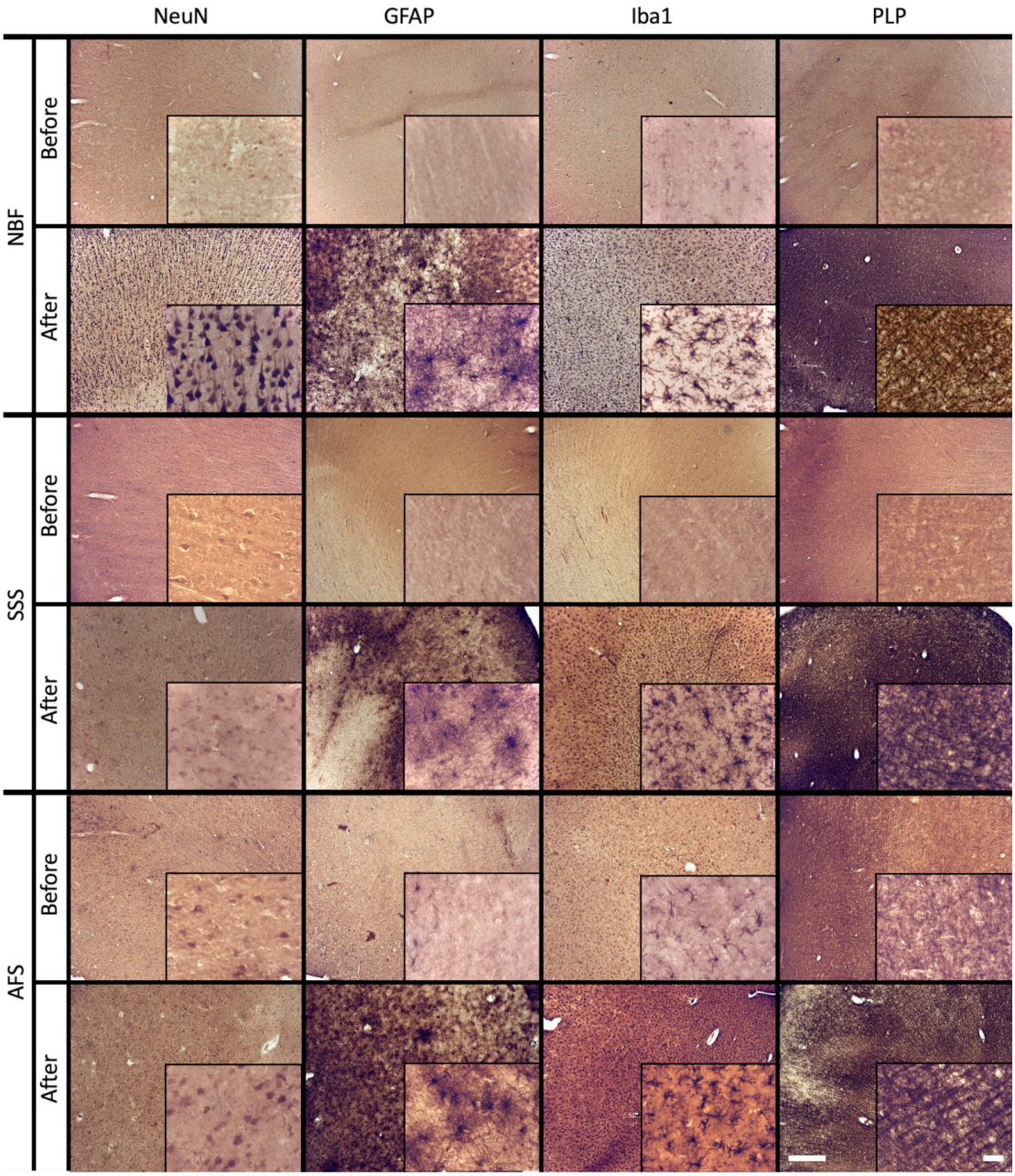


FIGURE 6 Before and after an antigen retrieval protocol in sections that showed poor antigenicity preservation. Photomicrographs (4X) (inserts are zoomed-in at 40X to see the cells) of cellular distribution of NBF-fixed cases (top), SSS-fixed cases (middle) and AFS-fixed cases (bottom line) that showed no antigenicity (before lines), while a homogeneous distribution is shown after an antigen retrieval protocol (after lines). Left scale bar is valid in all 4X photomicrographs = 500 µm. Right scale bar is valid in all inserts (40X) = 50 µm. NBF, neutral-buffered formalin; SSS, salt-saturated solution; AFS, alcohol-formaldehyde solution; NeuN,

neuronal nuclei (neurons); GFAP, glial fibrillary acidic protein (astrocytes); Iba1, ionized binding adaptor molecule 1 (microglia); PLP, proteolipid protein (oligodendrocytic myelin).

3.5.4 Histochemical stains

First, we assessed quality of the Nissl-stain. We found a significantly higher frequency of cases showing high cellular contrast in NBF-fixed specimens (strong labeling of neurons in all the cases) (p = 0.0037), and less cases with pale neurons (p = 0.016; significant before a Bonferroni correction only). The brains fixed with the other two solutions sometimes produced pale neurons staining (SSS: N=6, p=0.045; significant before a Bonferroni correction only, and AFS: N = 5), or even no staining at all (SSS: N=1; AFS: N=2) (Figure 7A).

Second, we assessed the quality of myelinated fibers labeling with LFB. NBF-fixed brains showed a higher frequency of cases in which stained fibers were absent (score = 0) (p = 0.016; significant before a Bonferroni correction only) and never homogeneous distribution (p=0.036; significant before a Bonferroni correction only). Fiber labeling with LFB in SSS and AFS-fixed brains was quite inconsistent as they showed randomly distributed scores (Figure 7B).

Cell to background contrast was high following a Nuclear fast red (Nissl) counterstain to the Prussian blue staining (Figure 7C), regardless of the fixative. High cellular contrast occurred at a higher frequency in NBF specimens (all cases showed dark neurons: score = 2) (p = 0.016; significant before a Bonferroni correction only). Also, despite that not all the specimens showed ferric iron aggregation (depending on the pathology or age of the patient), blue spots indicating iron deposits were present in 10 NBF, 6 SSS and 8 AFS-fixed brains demonstrating the likelihood of detecting these deposits when either of these fixation protocols are applied (Figure 8, inserts in B, F, J).

Finally, we found a higher frequency of cases showing homogeneous labeling of silver impregnation of axonal fibers with the Bielchowsky procedure in the NBF-fixed brains (p = 0.0093; significant before a Bonferroni correction only) (Figure 7D). However, a higher occurrence of dark or intermediate background staining, was observed in the SSS and AFS compared to the NBF fixed brains, but this difference was not statistically significant (Figure 7E).

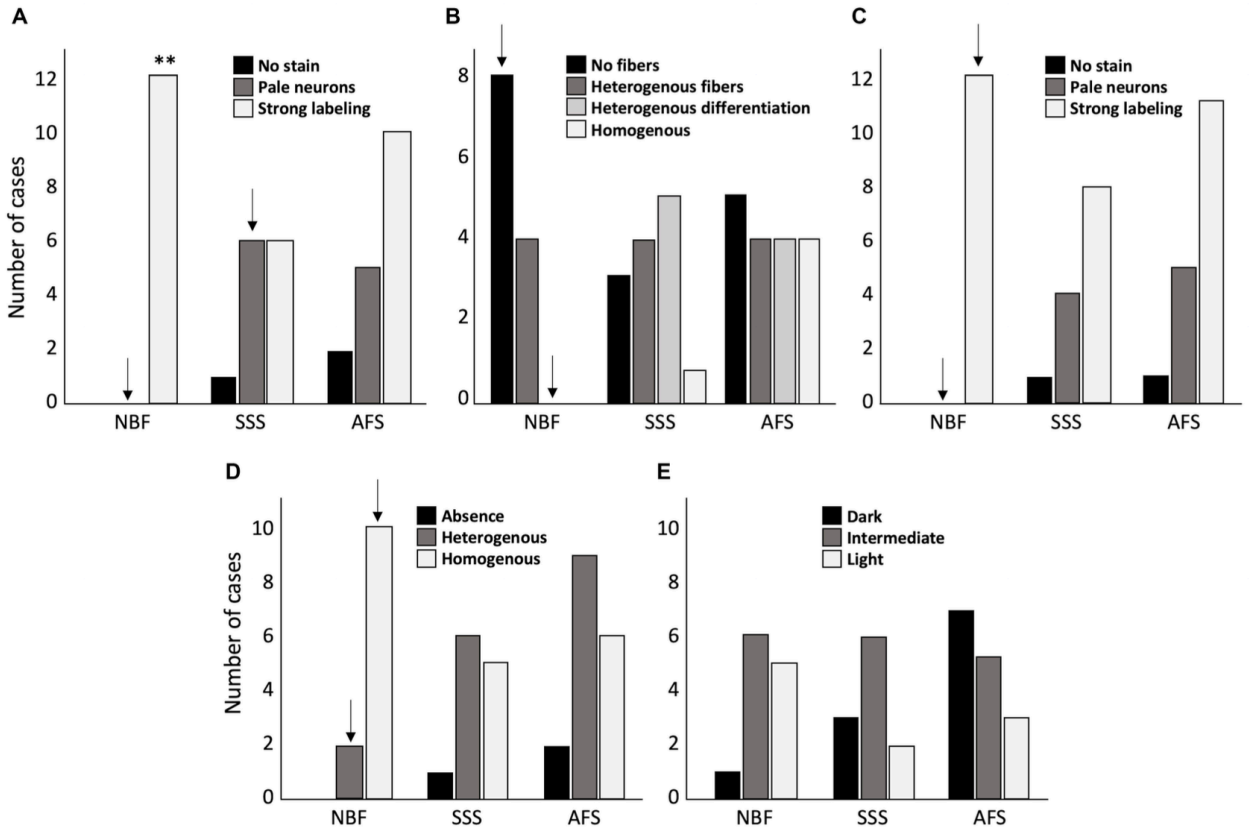


FIGURE 7 Bar charts of the quality of the histochemical stains. (A) Cresyl violet staining quality assessed by the absence of labeling = 0 (black), pale neurons = 1 (dark gray) or strong labeling = 2 (white). (B) Luxol fast blue staining quality, assessed by the absence of fibers = 0 (black), heterogeneous fibers = 1 (dark gray), heterogeneous differentiation = 2 (light gray) and homogeneous staining = 3 (white). (C) Prussian blue staining quality assessed by the absence of labeling = 0 (black), pale neurons = 1 (dark gray) or strong labeling = 2 (white). (D) Fibers preservation in Bielchowsky staining assessed by absence of fibers = 0 (black), heterogeneous distribution of the fibers = 1 (dark gray), or homogeneous distribution = 2 (white). (E) Bielchowsky's staining background which could be dark = 0 (black), intermediate = 1 (dark gray) or light = 2 (white). **, Significant after Bonferroni correction ($p < 0.01$); ↓, Significant before Bonferroni correction; NBF, neutral-buffered formalin; SSS, salt-saturated solution; AFS, alcohol- formaldehyde solution.

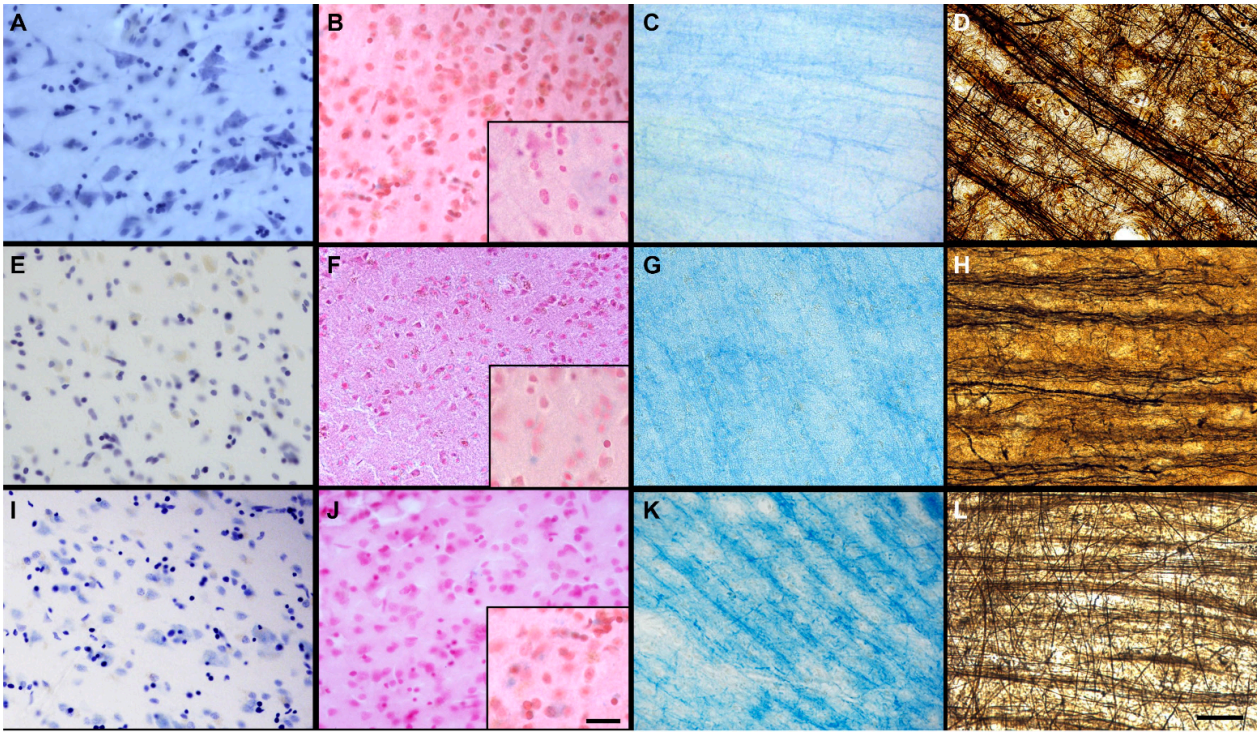


FIGURE 8 Quality of the histochemical stains. Photomicrographs (40X) of the Cresyl violet staining (neurons and glial cells in dark purple) for NBF (A), SSS (E), and AFS (I), of the Prussian blue staining (neurons and glial cells in pink, iron in blue, with iron showed in inserts (100X) Scale bar = 50 µm) for NBF (B), SSS (F), and AFS (J), of the LFB staining (myelin fibers in dark blue) for NBF (C), SSS (G), and AFS (K), and Bielchowsky's staining (axons and neurofibrils in dark brown) for NBF (D), SSS (H), and AFS (L). Scale bar = 50 µm [valid for (A–L)].

3.5.5 Confounding variables

3.5.5.1 Post-mortem interval

More than half of the specimens were harvested following a short PMI (25 of 42). Longer PMI occurred more often in the NBF-fixed group than the other two groups (8 of 12; p = 0.028; significant before a Bonferroni correction only) (See Supplementary Table S1 and Supplementary Figures S1, S2 for details). Also, when treating PMI as a continuous variable and comparing the median values across groups (NBF = 39.25; SSS = 24; AFS = 22), NBF PMIs, although considerably longer, did not reach significance using Kruskal-Wallis (p = 0.084). However, given the significant

difference obtained using Chi-square, we investigated the variables of interest separately in each of these groups.

In brains fixed with NBF, we found that specimens with shorter PMI were very easy to manipulate while specimens with longer PMI only scored good or poor (before Bonferroni correction, p = 0.028). There were no statistically significant differences in tissue quality (i.e., neuropil uniformity and cellular shape) in any of the fixative groups.

The effect of the PMI on the preservation of antigenicity was assessed separately for the four antibodies. For NeuN, we found unlabeled cells more often in NBF-fixed brains with longer PMI, and homogeneous patchy distribution of cells in the cases with a shorter PMI (before Bonferroni correction, p = 0.028). We found eight AFS cases with homogeneous GFAP distribution in the short PMI group, compared to none in the longer PMI group (statistically significant before Bonferroni correction, p = 0.012). We found no statistical difference of Iba1 labeling between the two groups (short or long PMI), in each fixative groups. In the NBF-fixed brains, there were more cases with no PLP labeling in the short PMI group (N = 2), while no such cases were observed in the group with a longer PMI (significant only before Bonferroni correction, p = 0.028).

We also assessed the quality of histochemical stains of the specimens in relation to the shorter or longer PMI. We found no statistical differences of the quality of Cresyl Violet, Luxol fast blue, Prussian blue stains and the two variables of interest for Bielchowsky staining, in each of the fixative groups.

3.5.5.2 Histology processing delay

The occurrence of short and long HDs was not statistically significant between the fixative groups; 20 specimens showed shorter and 22 showed longer delays. Within the AFS-fixed brains, we obtained more cases with a longer HD (11 of 17) but this was not statistically significant using a Chi-square test. However, when treated as a continuous variable, and assessing the differences using Kruskal-Wallis, the median HD for AFS brains was significantly longer than for the other groups (NBF = 3.5; SSS = 2; AFS = 6; p = 0.008).

We found no statistical difference neither for the ease of manipulation nor for the neuropil uniformity of sections between cases with a shorter or longer histology delay (HD), in each fixative group. There was no difference of the cellular shape scores between cases with shorter or longer HD for SSS and NBF-fixed cases. For AFS, although not statistically significant, we observed a higher occurrence of irregular (shrunken and shriveled) cells in cases with longer HD ($N = 7$), while only one case with irregular cells was observed with shorter HD.

Regarding NeuN distribution, we found no differences between the short and long HD in each fixative group. We found more homogeneous distribution of GFAP labeling in the AFS-fixed brains with shorter HD (before Bonferroni correction, $p = 0.028$), and a patchier distribution of labeled cells with a longer HD (before Bonferroni correction, $p = 0.012$). Furthermore, when comparing between HD groups in SSS and NBF groups, homogeneous distribution of GFAP labeling was never found in cases with longer HD. For Iba1 and PLP, we found no statistical difference in each fixative group.

We also assessed the quality of histochemical procedures in each group. We found no statistical differences in the Luxol fast blue staining quality. However, we found a higher frequency of unlabeled and faintly labeled cells by Cresyl violet and the Nuclear red counterstaining of Prussian blue, in AFS-fixed brains with a long HD, but these differences did not reach statistical significance. When assessing the fibers preservation in Bielchowsky staining in each fixative group, we found that SSS-fixed brains with longer HD showed absence or heterogeneous fiber labeling, but this did not reach statistical significance. In the AFS-fixed brains, no labeled fibers were observed in the shorter HD group ($p = 0.046$; significant before a Bonferroni correction only). Regarding the Bielchowsky's background, we found a higher frequency of cases with light backgrounds in the NBF-fixed brains with shorter HD and more cases with intermediate backgrounds with longer HD (before Bonferroni correction, $p = 0.021$). We also found more cases with dark Bielchowsky backgrounds with longer HD in AFS-fixed brains, but this was not statistically significant.

3.6 Discussion

3.6.1 Ease of manipulation

We were expecting that the SSS and AFS-fixed brains would be difficult to manipulate (softer tissue), according to our previous study in mice (Frigon et al., 2022). Accordingly, recent study in rat brains (Martins-Costa et al., 2022), and human anatomical studies describe these fixatives as soft-embalming solutions, which could lead to differences in the texture of the brains (Hopwood et al., 1989; Eltoum et al., 2001; Nicholson et al., 2005; Hammer et al., 2012; Hayashi et al., 2014; Balta et al., 2015; Tomalty et al., 2019; Rahman et al., 2021). The human tissue samples were relatively stiff and well-fixed macroscopically, and we found mostly that sections from AFS fixed specimens were easy to manipulate, and slightly more difficult in cases fixed with SSS. Nevertheless, SSS-fixed human sections were relatively easier to manipulate (stiffer) than the mouse sections of brains fixed with the same solutions (Frigon et al., 2022). This could be related to their different capacity to absorb the fixative (diffusion), related to their differences in shape, size, gyrification, and vascularization circuits across species (Ventura-Antunes et al., 2013).

3.6.2 Tissue quality

Integrity of the neuropil was compromised in the three groups in which we found a higher occurrence of fissures. Conversely, a more uniform neuropil was observed in NBF-fixed mouse brain sections (Frigon et al., 2022). This could be explained by the quick perfusion fixation of mice and timely histological processing soon after fixation compared to the lengthy months to years delay before histological processing of the brain bank NBF-fixed human specimens which may enhance chemical artefacts on the tissue. Regarding the broken neuropils, the high concentration of isopropyl alcohol or ethanol in SSS- and AFS-fixed brains, likely dehydrates tissues significantly (Viktorov and Proshin, 2003), and may cause fissures in the neuropil by shrinking, by changing the osmolarity of the intracellular vs. extracellular spaces. This may also explain the irregular aspect of the cells in the SSS and AFS-fixed brains, compared to the NBF-fixed brains that only show regular cell contours.

3.6.3 Antigenicity preservation

We found that NeuN and GFAP antigenicity was not well preserved in all cases, especially in NBF-fixed brains, where no cells were observed in three specimens. This was expected of the NBF-fixed brain bank specimens, which are preserved in a solution with a higher concentration of formaldehyde often for years before histology processing (i.e., longer histology delays). The cross-linking, due to the over-fixation by formaldehyde immersion (Arnold et al., 1996; Stumptner et al., 2019) likely affected the conformation of the neuronal nuclei and the glial fibrillary acidic protein more profoundly than the other two analyzed antigens, due to a higher interaction between their specific tertiary conformations and the chemicals, which is in line with the qualitative description of formaldehyde and its chemical reactions (Fox et al., 1985; Puchtler and Meloan, 1985; Helander, 1994; Kiernan, 2000; Thavarajah et al., 2012; Hade et al., 2024). Moreover, an antigen retrieval protocol recovered the antigenicity for Iba1 and PLP in all cases in a homogeneous way, whereas NeuN and GFAP did not regain antigenicity in some NBF-fixed brains.

Antigenicity was generally best preserved by the AFS fixative. SSS fixation produced mostly labeling of isolated cells or patches. However, an antigen retrieval protocol recovered all the antigens in tissue fixed with the two solutions used in anatomy laboratories, either SSS or AFS. Therefore, sufficient quality IHC procedures are possible following the application of an antigen retrieval protocol. These observations differ from what we reported in our previous study in mice, in which the antigenicity of the four main cell populations was preserved and homogeneously distributed across all the types of fixation (Frigon et al., 2022), even when no antigen retrieval protocol was applied prior to the IHC procedures. This also supports the differences in mice and human brain tissue preservation properties.

3.6.4 Histochemical stains

The clear labeling of cells with Cresyl violet and the Nuclear red counterstain of the Prussian blue procedure, demonstrates that the brains fixed with solutions from anatomy laboratories could be used for cytoarchitectonic analysis (Amunts and Zilles, 2015; Amunts et al., 2020; García-Cabezas et al., 2020), brain morphology (Zachlod et al., 2022), neurodegenerative disease (Bobinski et al.,

2000), and MRI validation (Hoffmann et al., 2011; Magnain et al., 2014; Alkemade et al., 2020). Furthermore, Prussian blue (Perl's stain) was feasible in specimens fixed with the three solution and helped detecting ferric iron deposits.

Luxol fast blue fiber staining was not homogeneous in NBF fixed brain sections. In some NBF fixed cases, labeling luxol fast blue failed to stain myelinated fibers altogether. Similarly, luxol fast blue staining of myelinated fibers was not consistent in both SSS and AFS-fixed brains suggesting that IHC (i.e., PLP in our case) might be a better approach to routinely label the myelinated axons. Indeed, IHC (i.e., MBP, MAG, PLP antigens) are widely used in neuropathology (Stüber et al., 2014; Kuhlmann et al., 2017; Adiele and Adiele, 2019; Vakrakou et al., 2022; Beach et al., 2023).

Bielchowsky silver impregnation of fibers, was best achieved in NBF-fixed brains, followed by SSS and AFS in which more cases with heterogeneous staining and intermediate density backgrounds were observed. This may be related to the ethanol and/or amount of alcohols in their chemical compositions. An old study on silver impregnation technique showed that lipid extraction with organic solvents such as ethanol can lead to unsatisfactory impregnation and poor staining (Wolman, 1958). However, we found good cases and high-quality stains following all fixation procedures, suggesting that the fixatives used in anatomy labs may be reliable for neuroscientific research.

3.6.5 Confounding variables

It is known that molecular conformations change at different paces after death, depending on the molecules being analyzed and the environmental conditions that affect the bodies (e.g., high temperatures). The changes happen within minutes for some cases, and within the first few hours of PMI for others. We therefore expected better histological results in brains with shorter PMI (Spokes, 1979; Palmer et al., 1988; Ravid et al., 1992; Hynd et al., 2003; Beach et al., 2015) and with a short HD, avoiding excessive post-mortem tissue decay and cross-linking from over-fixation (Arnold et al., 1996; Schulz et al., 2011; Stumptner et al., 2019). However, in our convenience sample, we found no evidence that neither lengthy PMI nor HD significantly affected the tissue; some good quality histology was obtained even in the cases with longer delays. This is in line with the recent work of Hade and their team, which reports good quality histology results with PMIs

up to 37 h (Hade et al., 2024). It is worth noting that some individual cases suggested a slight influence of the PMI in the NBF-fixed brains, on the ease of manipulation, and antigenicity preservation of NeuN. These NBF brain bank tissue samples had significantly greater PMI (median = 45 h) than the anatomy laboratory specimens (median = 22 h) ($p < 0.001$), so it is conceivable that brains fixed with longer delays in anatomy labs could show the same patterns than brain bank specimens. However, we could not test this, given that our laboratory generally refuses bodies with PMIs of 48 h or more. Finally, we found significantly more homogeneous GFAP distribution in cases with a shorter HD and PMI in AFS-fixed brains, suggesting that this antigen might be more affected by these confounding variables, as reported by a recent study (Hade et al., 2024). Other results were not impacted in AFS-fixed brains, in which all histological procedures were successful.

Our results suggest that overall PMI and HD do not seem to impact the tissue quality. However, we saw a bit of an impact in some specific variables, such as ease of manipulation, NeuN and GFAP antigenicity. So, we consider that the prioritization of shorter delays should be preferred when feasible. Future studies increasing the number of specimens will elucidate more precisely the impact of longer delays on specific antigens.

3.6.6 Anatomy laboratory's fixatives

3.6.6.1 Salt saturated solution

We suggest that the SSS-fixed brains could be appropriate for neuroscientific research, since all the procedures were successful. However, these tissue blocks were more difficult to manipulate, and the overall quality of the tissue was poorer, thus SSS-fixed brains require more careful manipulation. Furthermore, antigenicity preservation was inadequate, but we demonstrated that IHC is still feasible following the application of an antigen retrieval protocol. We speculate that the lighter fixation of SSS brains owing to the low formaldehyde concentration led to a poor tissue preservation. The high osmolarity of this solution might also impact the diffusion of the fixative through the capillaries and interstitial compartments of the brain. Indeed, the SSS is over saturated in salt, which could lead to absorption of the free water in the brain prior to fixation with phenol and the small amount of formaldehyde contained in the solution (Coleman and

Kogan, 1998; Hayashi et al., 2014), generating a lighter fixation. In addition, the cryoprotection in sucrose was very long (i.e., over a week compared to 1–2 days for the blocks fixed with the other two solutions) for these specimens; this might have also affected the tissue quality creating freezing artifacts.

3.6.6.2 Alcohol-formaldehyde solution

Our results show that the AFS-fixed brains provided the best quality histology. Tissue was manipulated with ease, was of good quality, and produced the best IHC antigenicity preservation and quality of histochemical stains. Here again, an antigen retrieval protocol prior to the IHC procedures was warranted for optimal results in some specimens. The brains from the AFS group were also, for the most part, the oldest specimens (with a range of HD between 1 and 15 years), but even the old specimens held up well. AFS contains a higher concentration of formaldehyde (1.4%), compared to SSS (0.3% formaldehyde), which probably improved the fixation level of the brain. On the other hand, the lower formaldehyde concentration in the AFS compared to NBF, might reduce excessive cross-linking, making for the better preservation of antigenicity. Therefore, our results suggest that fixation with approximately 1% formaldehyde might be ideal and should be tested in future studies.

It is known that alcohol solutions might be optimal for combining gross anatomy dissection, surgical training and histology assessment of different tissues (Hopwood et al., 1989; O'Sullivan and Mitchell, 1993; Barton et al., 2009; Benet et al., 2014; Tomalty et al., 2019; Venne et al., 2020; Rahman et al., 2021; Martins-Costa et al., 2022). In this work, we have extensively assessed our specific solution, as it differed, although slightly, from the other formulas that are used worldwide (Hopwood et al., 1989; O'Sullivan and Mitchell, 1993; Barton et al., 2009; Benet et al., 2014; Cabrera et al., 2017; Tomalty et al., 2019; Shetty et al., 2020; Venne et al., 2020; Rahman et al., 2021; Martins- Costa et al., 2022). To our knowledge, no brain histology quality and antigenicity preservation assessments are available in the literature for such solutions. Altogether, our results suggest that AFS-fixed brains are of sufficient quality for qualitative or/and quantitative neuroscientific research.

3.6.6.3 Neutral-buffered formalin

As explained before, 10% NBF is currently the most common fixative used in brain research but seems to be not ideal for the optimal preservation of specific antigens (e.g., GFAP). Also, NBF is generally used in brain banks that use immersion-fixation procedures, which may have a negative impact on the over-fixation and cross-linking. At the same time, gross anatomy laboratories that use chemical fixation through perfusion of the whole-body cannot use this high concentration of NBF, since the bodies are typically used for dissection which would determine a long-term exposure to hazards for the users. However, a recent study of Insausti et al. provided very good histology results following a carotid-perfusion method that enables to deliver formaldehyde to the brain, while allowing the injection of another fixative for the rest of the body (Insausti et al., 2023). This could be an ideal solution in pursuing the utilization of 10% NBF for brain fixation by perfusion (avoiding the immersion confounds), while avoiding the hazard and inconvenience of high concentrations of formaldehyde for the dissection.

3.6.7 Study limitations

First, working with human post-mortem tissue involves dealing with confounding variables, such as the post-mortem delay and the histology delay. The brains could also be affected by other variables such as the age, sex, presence of comorbidities and fixative perfusion quality (i.e., embalming of the full body). The post-mortem and histology delays have been assessed as confounding variables in each fixative group separately, and we found that they did not significantly impact our results. However, we acknowledge that the very different PMI and HD across fixative groups may affect the variables of interest, so further investigations across solutions in balanced samples with similar ranges of PMI and HD are warranted. Additionally, although our specimens were from a convenience sample, they mostly included normal-aging brains with absence of neuronal or vascular comorbidities, with a random distribution of sex. Also, all the brain specimens were removed from adequately fixed whole bodies that were used for regular dissection courses, translating an overall adequate perfusion procedure. However, a more detailed assessment of the perfusion of the fixative during the embalming (e.g., quantification of thrombi removed from the carotid arteries and jugular veins) could be used as an additional variable of interest in future studies. Second, using a convenience sample ensured that we

obtained tissues from different brain lobes. However, we confirm that we used neocortex for all the specimens. Third, free-floating tissue sections stained with IHC procedures might show heterogeneous labeling, since the staining depends on the level of antibody penetration and the tissue background. Analyses might therefore be affected by the protocol itself, which was also evaluated as a variable of interest in our previous study in mice brains (Frigon et al., 2022). Therefore, the protocols were already tested and validated for this study, so we excluded the antibody penetration and tissue background quality as variables here. Fourth, we are aware that other antigens of interest could have been tested, but we limited our study to the antigens that were previously validated in our study in mice (Frigon et al., 2022). Fifth, we acknowledge that our study was conducted in a qualitative manner. However, quantitative assessment of the four cell types would be necessary to determine whether results obtained across solutions would be valid to assess specific pathological changes of the brains (e.g., loss of neurons in an area due to neurodegeneration in a brain fixed with NBF, vs. a brain fixed with SSS or AFS). Finally, the statistical power might have been limited by our relatively small sample size, especially when dealing with confounding variables. However, availability of human brain tissue is limited, and our study included all the specimens that were available at the time of the assessments. Future studies with larger sample sizes are warranted to further our understanding of the impact of confounding factors.

3.6.8 Conclusion

In this study, we compared the quality of histochemical and immunohistochemical procedures performed on brain tissue from cases fixed by current embalming protocols in use in gross anatomy dissection laboratories and fixation protocols in use in major brain bank settings. We showed lower overall histology quality using a salt saturated solution but also a higher quality for some specific variables when using an alcohol-formaldehyde solution in comparison to the classic neutral-buffered formalin solution used in brain banks. We further showed that immunohistochemistry and histochemical stains are feasible with brains fixed with two solutions used in gross anatomy laboratories following the application of a heat-induced antigen retrieval protocol. Therefore, brains coming from body donation programs for teaching gross-anatomy

could also be used for neuroscientific research, which could increase the amount of brain tissue available to neuroscientists.

3.6.9 Acknowledgements

We would like to thank the incredibly generous body donators and their families for making our project possible. We also acknowledge funding resources and the anatomy laboratory staff (Johanne Pellerin, Marie-Eve Lemire, Sophie Plante, Sonia Gauthier) of the Université du Québec à Trois-Rivières for their support and help at the lab. We would also like to thank Weiya Ma from the Douglas Research Center who helped to elaborate some specific histology protocols.

3.7 Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2024.1372953/full#supplementary-material

Table 1 Scores and data assessment for all variables of interest.

Fixative	Sex	ID	EM	NU	CS	NeuN	GFAP	Iba1	PLP	CV	LFB	PB	FB	BB
NBF	F	1	2	0	1	0	0	0	3	2	0	2	2	1
		2	1	0	1	1	2	2	3	2	0	2	2	1
		3	2	0	1	2	0	2	3	2	0	2	2	2
		4	3	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2
		5	2	0	1	2	3	3	2	2	0	2	2	1
	M	6	3	1	1	3	1	3	2	2	0	2	2	1
		7	2	0	1	2	0	3	0	2	0	2	2	1
		8	3	1	1	2	1	2	2	2	0	2	2	0
		9	3	1	1	3	1	2	0	2	1	2	1	2
		10	2	1	1	0	2	2	3	2	1	2	2	2
		11	1	0	1	0	1	2	2	2	0	2	1	1
		12	1	1	1	3	2	2	1	2	1	2	2	2
SSS	F	13	2	0	0	1	1	1	0	2	2	2	2	1
		14	1	0	0	2	3	3	3	0	1	0	2	1
		15	NA	0	0	2	3	3	3	1	3	2	2	0
		16	2	0	0	1	1	3	3	1	1	1	1	2
	M	17	3	0	0	1	2	2	0	1	2	1	2	1
		18	1	0	0	2	3	3	3	1	2	2	1	1
		19	1	1	0	2	3	3	3	2	0	2	2	2
		20	1	0	0	1	2	3	3	1	2	2	1	1
		21	2	1	0	1	3	2	2	2	0	1	1	0
		22	3	0	0	1	1	2	2	2	1	1	1	1
		23	1	1	0	2	1	2	3	1	0	2	NA	NA

		24	0	1	0	1	1	2	1	2	1	2	0	NA
		25	1	0	0	2	2	1	0	2	2	2	1	0
	F	26	0	0	1	3	3	3	3	2	0	1	1	2
		27	2	0	1	2	2	2	2	0	3	1	2	1
		28	1	1	1	3	3	3	3	2	1	1	1	1
		29	2	0	0	3	3	3	2	2	0	2	1	0
		30	1	0	0	2	1	3	3	2	0	2	0	NA
		31	3	0	1	1	3	3	3	2	1	2	0	NA
		32	2	1	1	3	2	3	2	2	0	2	2	0
		33	2	0	1	2	2	3	2	2	3	2	1	2
AFS		34	2	1	1	3	3	3	2	2	3	2	2	0
	M	35	2	0	0	1	2	3	1	1	2	2	1	2
		36	1	1	0	3	3	3	3	1	3	2	2	0
		37	3	0	0	2	2	3	3	1	2	1	1	1
		38	2	0	1	3	2	3	2	1	2	1	2	0
		39	3	0	0	3	1	3	2	2	1	2	1	0
		40	2	0	0	3	2	1	2	0	0	0	1	1
		41	3	0	0	3	3	3	2	2	1	2	1	0
		42	3	1	1	3	3	3	2	1	2	2	2	1

NA=Non-available, F=Female, M=Male, NBF=Neutral-Buffered formalin, SSS=Saturated-salt solution, AFS=Alcohol-formaldehyde solution

EM (Ease of manipulation): Categorical, 0=Very poor, 1=Poor, 2=Good, 3=Very good

NU (Neuropil Uniformity): Categorical, 0=Fissured, 1=Uniform

CS (Cellular Shape): Categorical, 0=Irregular, 1=Regular

NeuN, GFAP, Iba1, PLP: Antigenicity distribution for the respective antigen, 0=Absence, 1=Isolated cells, 2=Cell patches, 3=Homogeneous distribution

CV (Cresyl Violet): Categorical, 0=No staining, 1=Pale neurons, 2=Dark neurons

LFB (Luxol Fast Blue): Categorical, 0=No fibers and heterogenous blue stain, 1=Heterogenous fibers and differentiation, 2=Homogenous fibers but bad differentiation, 3=Homogenous fibers and good differentiation

PB (Prussian blue): Categorical, 0=No staining, 1=Pale neurons, 2=Dark neurons

FB (Fibers preservation of Bielchowsky's staining): Categorical, 0=Absence, 1=Heterogeneous, 2=Homogeneous

BB (Bielchowsky's background): Categorical, 0=Dark, 1=Intermediate, 2=Light

Figure 1 Scatter dot plots of the variables of interest in relation to the PMI as a continuous variable



Figure 2 Scatter dot plots of the variables of interest in relation to the HD as a continuous variable



3.8 References

Adiele, R. C., and Adiele, C. A. (2019). Metabolic defects in multiple sclerosis. *Mitochondrion* 44, 7–14. doi: 10.1016/j.mito.2017.12.005

Alkemade, A., Pine, K., Kirilina, E., Keuken, M. C., Mulder, M. J., Balesar, R., et al. (2020). 7 tesla MRI followed by histological 3D reconstructions in whole-brain specimens. *Front. Neuroanat.* 14:536838. doi: 10.3389/fnana.2020.536838

Allsop, D. (2000). Introduction to Alzheimer's disease. *Methods Mol. Med.* 32, 1–22. doi: 10.1385/1-59259-195-7:1

Amunts, K., Mohlberg, H., Bludau, S., and Zilles, K. (2020). Julich-brain: a 3D probabilistic atlas of the human brain's cytoarchitecture. *Science* 369, 988–992. doi: 10.1126/science.abb4588

Amunts, K., and Zilles, K. (2015). Architectonic mapping of the human brain beyond Brodmann. *Neuron* 88, 1086–1107. doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.001

Arnold, M. M., Srivastava, S., Fredenburgh, J., Stockard, C. R., Myers, R. B., and Grizzle, W. E. (1996). Effects of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. *Biotech. Histochem.* 71, 224–230. doi: 10.3109/10520299609117164

Balta, J. Y., Cronin, M., Cryan, J. F., and O'Mahony, S. M. (2015). Human preservation techniques in anatomy: a 21st century medical education perspective. *Clin. Anat.* 28, 725–734. doi: 10.1002/ca.22585

Barton, D. P., Davies, D. C., Mahadevan, V., Dennis, L., Adib, T., Mudan, S., et al. (2009). Dissection of soft-preserved cadavers in the training of gynaecological oncologists: report of the first UK workshop. *Gynecol. Oncol.* 113, 352–356. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.02.012

Beach, T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Serrano, G., Shill, H. A., Walker, D. G., et al. (2015). Arizona study of aging and neurodegenerative disorders and brain and body donation program. *Neuropathology* 35, 354–389. doi: 10.1111/neup.12189

Beach, T. G., Sue, L. I., Scott, S., Intorcia, A. J., Walker, J. E., Arce, R. A., et al. (2023). Cerebral white matter rarefaction has both neurodegenerative and vascular causes and may primarily be a distal axonopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 82, 457–466. doi: 10.1093/jnen/nlad026

Beach, T. G., Tago, H., Nagai, T., Kimura, H., McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (1987). Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation. *J. Neurosci. Methods* 19, 183–192. doi: 10.1016/s0165- 0270(87)80001-8

Benet, A., Rincon-Torroella, J., Lawton, M. T., and González Sánchez, J. J. (2014). Novel embalming solution for neurosurgical simulation in cadavers. *J. Neurosurg.* 120, 1229–1237. doi: 10.3171/2014.1.Jns131857

Birkl, C., Langkammer, C., Golob-Schwarzl, N., Leoni, M., Haybaeck, J., Goessler, W., et al. (2016). Effects of formalin fixation and temperature on MR relaxation times in the human brain. *NMR Biomed.* 29, 458–465. doi: 10.1002/nbm.3477

Bobinski, M., de Leon, M. J., Wegiel, J., Desanti, S., Convit, A., Saint Louis, L. A., et al. (2000). The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging- determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 95, 721–725. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00476-5

Brenner, E. (2014). Human body preservation - old and new techniques. *J. Anat.* 224, 316–344. doi: 10.1111/joa.12160

Bronge, L., Bogdanovic, N., and Wahlund, L. O. (2002). Postmortem MRI and histopathology of white matter changes in Alzheimer brains. A quantitative, comparative study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 13, 205–212. doi: 10.1159/000057698

Cabrera, N. C., Espinoza, J. R., Vargas-Jentzsch, P., Sandoval, P., Ramos, L. A., and Aponte, P. M. (2017). Alcohol-based solutions for bovine testicular tissue fixation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29, 91–99. doi: 10.1177/1040638716672252

Cardoso, J. R., Pereira, L. M., Iversen, M. D., and Ramos, A. L. (2014). What is gold standard and what is ground truth? *Dental Press J. Orthod.* 19, 27–30. doi: 10.1590/2176-9451.19.5.027-030.ebo

Carlos, A. F., Poloni, T. E., Medici, V., Chikhladze, M., Guaita, A., and Ceroni, M. (2019). From brain collections to modern brain banks: a historical perspective. *Alzheimers Dement (N Y)* 5, 52–60. doi: 10.1016/j.trci.2018.12.002

Churukian, C. J. (2008). "14 - pigments and minerals" in *Theory and practice of histological techniques*. eds. J. D. Bancroft and M. Gamble. *6th* ed (London: Churchill Livingstone), 233–259.

Coleman, R., and Kogan, I. (1998). An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. *J. Anat.* 192, 443–446. doi: 10.1046/j.1469-7580.1998.19230443.x

Connor, J. R., and Benkovic, S. A. (1992). Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical, and molecular considerations. *Ann. Neurol.* 32, S51–S61. doi: 10.1002/ ana.410320710

Dawe, R. J., Bennett, D. A., Schneider, J. A., Vasireddi, S. K., and Arfanakis, K. (2009). Postmortem MRI of human brain hemispheres: T2 relaxation times during formaldehyde fixation. *Magn. Reson. Med.* 61, 810–818. doi: 10.1002/mrm.21909

den Bakker, M. A. (2017). Is histopathology still the gold standard? *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* 160:D981.

Durand-Martel, P., Tremblay, D., Brodeur, C., and Paquet, N. (2010). Autopsy as gold standard in FDG-PET studies in dementia. *Can. J. Neurol. Sci.* 37, 336–342. doi: 10.1017/ s0317167100010222

Dusek, P., Hofer, T., Alexander, J., Roos, P. M., and Aaseth, J. O. (2022). Cerebral Iron deposition in neurodegeneration. *Biomol. Ther.* 12:714. doi: 10.3390/biom12050714

Eilam-Altstädter, R., Las, L., Witter, M. P., and Ulanovsky, N. (2021). "Methods" in *Stereotaxic brain atlas of the Egyptian fruit bat*. eds. R. Eilam-Altstädter, L. Las, M. P. Witter and N. Ulanovsky (Cambridge, MA: Academic Press), 1–9.

Elobeid, A., Rantakömi, S., Soininen, H., and Alafuzoff, I. (2014). Alzheimer's disease- related plaques in nondemented subjects. *Alzheimers Dement.* 10, 522–529. doi: 10.1016/j.jalz.2012.12.009

Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R. B., and Grizzle, W. E. (2001). Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *J. Histotechnol.* 24, 173–190. doi: 10.1179/ his.2001.24.3.173

Fan, S., Zheng, Y., Liu, X., Fang, W., Chen, X., Liao, W., et al. (2018). Curcumin-loaded PLGA-PEG nanoparticles conjugated with B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *Drug Deliv.* 25, 1091–1102. doi: 10.1080/10717544.2018.1461955

Fisher, M. M. (1905). The toxic effects of formaldehyde and formalin. *J. Exp. Med.* 6, 487–518. doi: 10.1084/jem.6.4-6.487

Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., and Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 845–853. doi: 10.1177/33.8.3894502

Frigon, E.-M., Dadar, M., Boire, D., and Maranzano, J. (2022). Antigenicity is preserved with fixative solutions used in human gross anatomy: a mice brain immunohistochemistry study. *Front. Neuroanat.* 16:957358. doi: 10.3389/fnana.2022.957358

Frølich, K. W., Andersen, L. M., Knutsen, A., and Flood, P. R. (1984). Phenoxyethanol as a nontoxic substitute for formaldehyde in long-term preservation of human anatomical specimens for dissection and demonstration purposes. *Anat. Rec.* 208, 271–278. doi: 10.1002/ar.1092080214

García-Cabezas, M. Á., Hacker, J. L., and Zikopoulos, B. (2020). A protocol for cortical type analysis of the human neocortex applied on histological samples, the atlas of Von Economo and Koskinas, and magnetic resonance imaging. *Front. Neuroanat.* 14:576015. doi: 10.3389/fnana.2020.576015

Gouw, A. A., Seewann, A., van der Flier, W. M., Barkhof, F., Rozemuller, A. M., Scheltens, P., et al. (2011). Heterogeneity of small vessel disease: a systematic review of MRI and histopathology correlations. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 82, 126–135. doi: 10.1136/jnnp.2009.204685

Guindi, M. (2018). “11 - liver disease in Iron overload” in *Practical hepatic pathology: A diagnostic approach*. ed. R. Saxena. *2nd* ed (Amsterdam: Elsevier), 151–165.

Gulati, R., Ahuja, M. S., Langer, V., Gopal, P., Rustagi, S. M., and Dave, V. (2020). Comparative study of formalin solution and saturated salt solution for embalming cadavers for surgical skills training. *Indian J. Anat.* 9, 33–37. doi: 10.21088/ ija.2320.0022.9120.5

Hade, A. C., Philips, M. A., Promet, L., Jagomäe, T., Hanumantharaju, A., Salumäe, L., et al. (2024). A cost-effective and efficient ex vivo, ex situ human whole brain perfusion protocol for immunohistochemistry. *J. Neurosci. Methods* 404:110059. doi: 10.1016/j. jneumeth.2024.110059

Hammer, N., Löffler, S., Feja, C., Sandrock, M., Schmidt, W., Bechmann, I., et al. (2012). Ethanol-glycerin fixation with thymol conservation: a potential alternative to formaldehyde and phenol embalming. *Anat. Sci. Educ.* 5, 225–233. doi: 10.1002/ase.1270

Hayashi, S., Homma, H., Naito, M., Oda, J., Nishiyama, T., Kawamoto, A., et al. (2014). Saturated salt solution method: a useful cadaver embalming for surgical skills training. *Medicine* 93:e196. doi: 10.1097/md.0000000000000196

Hayashi, S., Naito, M., Kawata, S., Qu, N., Hatayama, N., Hirai, S., et al. (2016). History and future of human cadaver preservation for surgical training: from formalin to saturated salt solution method. *Anat. Sci. Int.* 91, 1–7. doi: 10.1007/s12565-015-0299-5

Helander, K. G. (1994). Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech. Histochem.* 69, 177–179. doi: 10.3109/10520299409106282

Herculano-Houzel, S., Ribeiro, P., Campos, L., Valotta da Silva, A., Torres, L. B., Catania, K. C., et al. (2011). Updated neuronal scaling rules for the brains of Glires (rodents/lagomorphs). *Brain Behav. Evol.* 78, 302–314. doi: 10.1159/000330825

Hoffmann, A., Bredno, J., Wendland, M. F., Derugin, N., Hom, J., Schuster, T., et al. (2011). Validation of in vivo magnetic resonance imaging blood-brain barrier permeability measurements by comparison with gold standard histology. *Stroke* 42, 2054–2060. doi: 10.1161/strokeaha.110.597997

Hopwood, D., Slidders, W., and Yeaman, G. R. (1989). Tissue fixation with phenol- formaldehyde for routine histopathology. *Histochem. J.* 21, 228–234. doi: 10.1007/ bf01747525

Humphreys, C. A., Jansen, M. A., Muñoz Maniega, S., González-Castro, V., Pernet, C., Deary, I. J., et al. (2019). A protocol for precise comparisons of small vessel disease lesions between ex vivo magnetic resonance imaging and histopathology. *Int. J. Stroke* 14, 310–320. doi: 10.1177/1747493018799962

Hynd, M. R., Lewohl, J. M., Scott, H. L., and Dodd, P. R. (2003). Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue. *J. Neurochem.* 85, 543–562. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01747.x

Insausti, R., Insausti, A. M., Muñoz López, M., Medina Lorenzo, I., Arroyo-Jiménez, M. D. M., Marcos Rabal, M. P., et al. (2023). Ex vivo, in situ perfusion protocol for human brain fixation compatible with microscopy, MRI techniques, and anatomical studies [methods]. *Front. Neuroanat.* 17:1149674. doi: 10.3389/ fnana.2023.1149674

Kanawaku, Y., Someya, S., Kobayashi, T., Hirakawa, K., Shiotani, S., Fukunaga, T., et al. (2014). High-resolution 3D-MRI of postmortem brain specimens fixed by formalin and gadoteridol. *Leg. Med. (Tokyo)* 16, 218–221. doi: 10.1016/j.legalmed.2014.03.003

Kiernan, J. A. (2000). Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microscopy Today* 8, 8–13. doi: 10.1017/S1551929500057060

Kishore, M., Pradeep, M., Narne, P., Jayalakshmi, S., Panigrahi, M., Patil, A., et al. (2023). Regulation of Keap1-Nrf2 axis in temporal lobe epilepsy-hippocampal sclerosis patients may limit the seizure outcomes. *Neurol. Sci.* 44, 4441–4450. doi: 10.1007/ s10072-023-06936-0

Kovacs, G. G., and Budka, H. (2010). Current concepts of neuropathological diagnostics in practice: neurodegenerative diseases. *Clin. Neuropathol.* 29, 271–288. doi: 10.5414/npp29271

Kruer, M. C. (2013). The neuropathology of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Int. Rev. Neurobiol.* 110, 165–194. doi: 10.1016/b978-0-12-410502-7.00009-0

Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Brück, W., and Lassmann, H. (2017). An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol.* 133, 13–24. doi: 10.1007/s00401-016-1653-y

Laule, C., Kozlowski, P., Leung, E., Li, D. K., Mackay, A. L., and Moore, G. R. (2008). Myelin water imaging of multiple sclerosis at 7 T: correlations with histopathology. *NeuroImage* 40, 1575–1580. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.12.008

Laule, C., and Moore, G. R. W. (2018). Myelin water imaging to detect demyelination and remyelination and its validation in pathology. *Brain Pathol.* 28, 750–764. doi: 10.1111/bpa.12645

LeVine, S. M. (1997). Iron deposits in multiple sclerosis and Alzheimer's disease brains. *Brain Res.* 760, 298–303. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00470-8

Lindberg, M. R., and Lamps, L. W. (2018). "Central nervous system" in *Diagnostic pathology: Normal histology*. eds. M. R. Lindberg and L. W. Lamps. *2nd* ed (Amsterdam: Elsevier), 108–111.

Litchfield, S., and Nagy, Z. (2001). New temperature modification makes the Bielschowsky silver stain reproducible. *Acta Neuropathol.* 101, 17–21. doi: 10.1007/ s004010000248

Lombardero, M., Yllera, M. M., Costa, E. S. A., Oliveira, M. J., and Ferreira, P. G. (2017). Saturated salt solution: a further step to a formaldehyde-free embalming method for veterinary gross anatomy. *J. Anat.* 231, 309–317. doi: 10.1111/joa.12634

Loomba, S., Straehle, J., Gangadharan, V., Heike, N., Khalifa, A., Motta, A., et al. (2022). Connectomic comparison of mouse and human cortex. *Science* 377:eabo0924. doi: 10.1126/science.abo0924

Love, S., and Nicoll, J. A. (1992). Comparison of modified Bielschowsky silver impregnation and anti-ubiquitin immunostaining of cortical and nigral Lewy bodies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 18, 585–592. doi: 10.1111/j.1365-2990.1992.tb00830.x

Luna, L. G., and Armed Forces Institute of, P. (1968). *Manual of histologic staining methods of the armed forces Institute of Pathology* (*3rd*). Blakiston Division, McGraw-Hill New York.

Magnain, C., Augustinack, J. C., Reuter, M., Wachinger, C., Frosch, M. P., Ragan, T., et al. (2014). Blockface histology with optical coherence tomography: a comparison with Nissl staining. *NeuroImage* 84, 524–533. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.08.072

Maranzano, J., Dadar, M., Bertrand-Grenier, A., Frigon, E. M., Pellerin, J., Plante, S., et al. (2020). A novel ex vivo, in situ method to study the human brain through MRI and histology. *J. Neurosci. Methods* 345:108903. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108903

Martins-Costa, C., Nunes, T. C., and Anjos-Ramos, L. D. (2022). Anatomo- comparative study of formaldehyde, alcohol, and saturated salt solution as fixatives in Wistar rat brains. *Anat. Histol. Embryol.* 51, 740–745. doi: 10.1111/ahe.12852

Mouritzen Dam, A. (1979). Shrinkage of the brain during histological procedures with fixation in formaldehyde solutions of different concentrations. *J. Hirnforsch.* 20, 115–119.

Musiał, A., Gryglewski, R. W., Kielczewski, S., Loukas, M., and Wajda, J. (2016). Formalin use in anatomical and histological science in the 19th and 20th centuries. *Folia Med. Cracov.* 56, 31–40.

Nazemorroaya, A., Aghaeifar, A., Shiozawa, T., Hirt, B., Schulz, H., Scheffler, K., et al. (2022). Developing formalin-based fixative agents for post mortem brain MRI at 9.4 T. *Magn. Reson. Med.* 87, 2481–2494. doi: 10.1002/mrm.29122

Nicholson, H. D., Samalia, L., Gould, M., Hurst, P. R., and Woodroffe, M. (2005). A comparison of different embalming fluids on the quality of histological preservation in human cadavers. *Eur. J. Morphol.* 42, 178–184. doi: 10.1080/09243860500473306

Ogawa, Y. (1990). “Silver impregnation method for neurons using synthetic surfactants: a contribution to Golgi method” in *Quantitative and qualitative microscopy*. ed. P. M. Conn (Amsterdam: Elsevier)

O'Sullivan, E., and Mitchell, B. S. (1993). An improved composition for embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching in the United Kingdom. *J. Anat.* 182, 295–297.

Ouellette, R., Mangeat, G., Polyak, I., Warntjes, M., Forslin, Y., Bergendal, Å., et al. (2020). Validation of rapid magnetic resonance myelin imaging in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 87, 710–724. doi: 10.1002/ana.25705

Palmer, A. M., Lowe, S. L., Francis, P. T., and Bowen, D. M. (1988). Are post-mortem biochemical studies of human brain worthwhile? *Biochem. Soc. Trans.* 16, 472–475. doi: 10.1042/bst0160472

Puchtler, H., and Meloan, S. N. (1985). On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 82, 201–204. doi: 10.1007/ bf00501395

Rahman, S. M. N., Alam, T., and Alam, N. N. (2021). Preservation of histology by phenol-based fixative: Mini review of recent findings %J. *Int. J. Morphol.* 39, 50–56. doi: 10.4067/S0717-95022021000100050

Raja, D. S., and Sultana, B. (2012). Potential health hazards for students exposed to formaldehyde in the gross anatomy laboratory. *J. Environ. Health* 74, 36–40.

Ravid, R., Van Zwieten, E. J., and Swaab, D. F. (1992). Brain banking and the human hypothalamus--factors to match for, pitfalls and potentials. *Prog. Brain Res.* 93, 83–95. doi: 10.1016/s0079-6123(08)64565-3

Roseborough, A. D., Langdon, K. D., Hammond, R., Cipriano, L. E., Pasternak, S. H., Whitehead, S. N., et al. (2020). Post-mortem 7 tesla MRI detection of white matter hyperintensities: a multidisciplinary voxel-wise comparison of imaging and histological correlates. *NeuroImage: Clinical* 27:102340. doi: 10.1016/j.nicl.2020.102340

Schramek, G. G., Stoevesandt, D., Reising, A., Kielstein, J. T., Hiss, M., and Kielstein, H. (2013). Imaging in anatomy: a comparison of imaging techniques in embalmed human cadavers. *BMC Med. Educ.* 13:143. doi: 10.1186/1472-6920-13-143

Schulz, G., Crooijmans, H. J., Germann, M., Scheffler, K., Müller-Gerbl, M., and Müller, B. (2011). Three-dimensional strain fields in human brain resulting from formalin fixation. *J. Neurosci. Methods* 202, 17–27. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.08.031

Selvaraji, S., Efthymios, M., Foo, R. S. Y., Fann, D. Y., Lai, M. K. P., Chen, C. L. H., et al. (2022). Time-restricted feeding modulates the DNA methylation landscape, attenuates hallmark neuropathology and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia. *Theranostics* 12, 3007–3023. doi: 10.7150/thno.71815

Shetty, J. K., Babu, H. F., and Hosapatna Laxminarayana, K. P. (2020). Histomorphological assessment of formalin versus nonformalin fixatives in diagnostic surgical pathology. *J. Lab. Physicians* 12, 271–275. doi: 10.1055/s-0040-1722546

Spencer, L. T., and Bancroft, J. D. (2008). “6 - Tissue processing,” in *Theory and practice of histological techniques (sixth edition)*. eds. J. D. Bancroft and M. Gamble. Churchill Livingstone: Edinburgh. p. 83–92.

Spokes, E. G. (1979). An analysis of factors influencing measurements of dopamine, noradrenaline, glutamate decarboxylase and choline acetylase in human post-mortem brain tissue. *Brain* 102, 333–346. doi: 10.1093/brain/102.2.333

Stahnisch, F. W. (2015). Max Bielschowsky (1869-1940). *J. Neurol.* 262, 792–794. doi: 10.1007/s00415-014-7544-z

Stüber, C., Morawski, M., Schäfer, A., Labadie, C., Wähnert, M., Leuze, C., et al. (2014). Myelin and iron concentration in the human brain: a quantitative study of MRI contrast. *NeuroImage* 93, 95–106. doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.02.026

Stumptner, C., Pabst, D., Loibner, M., Viertler, C., and Zatloukal, K. (2019). The impact of crosslinking and non-crosslinking fixatives on antigen retrieval and immunohistochemistry. *New Biotechnol.* 52, 69–83. doi: 10.1016/j.nbt.2019.05.003

Switzer, R. C. (2000). Application of silver degeneration stains for neurotoxicity testing. *Toxicol. Pathol.* 28, 70–83. doi: 10.1177/019262330002800109

Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V. K., Elizabeth, J., Rao, U. K., and Ranganathan, K. (2012). Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J. Oral. Maxillofac. Pathol.* 16, 400–405. doi: 10.4103/0973-029x.102496

Tomalty, D., Pang, S. C., and Ellis, R. E. (2019). Preservation of neural tissue with a formaldehyde-free phenol-based embalming protocol. *Clin. Anat.* 32, 224–230. doi: 10.1002/ca.23290

Troiano, N. W., Ciovacco, W. A., and Kacena, M. A. (2009). The effects of fixation and dehydration on the histological quality of Undecalcified murine bone specimens embedded in Methylmethacrylate. *J. Histotechnol.* 32, 27–31. doi: 10.1179/ his.2009.32.1.27

Uchihara, T. (2007). Silver diagnosis in neuropathology: principles, practice and revised interpretation. *Acta Neuropathol.* 113, 483–499. doi: 10.1007/ s00401-007-0200-2

Vakrakou, A. G., Brinia, M. E., Svolaki, I., Argyrakos, T., Stefanis, L., and Kilidireas, C. (2022). Immunopathology of Tumefactive demyelinating lesions-from idiopathic to drug-related cases. *Front. Neurol.* 13:868525. doi: 10.3389/fneur.2022.868525

van Essen, H. F., Verdaasdonk, M. A., Elshof, S. M., de Weger, R. A., and van Diest, P. J. (2010). Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde: influence on immunohistochemistry. *J. Clin. Pathol.* 63, 1090–1094. doi: 10.1136/ jcp.2010.079905

Venne, G., Zec, M. L., Welte, L., and Noel, G. (2020). Qualitative and quantitative comparison of Thiel and phenol-based soft-embalmed cadavers for surgery training. *Anat. Histol. Embryol.* 49, 372–381. doi: 10.1111/ahe.12539

Ventura-Antunes, L., Mota, B., and Herculano-Houzel, S. (2013). Different scaling of white matter volume, cortical connectivity, and gyrification across rodent and primate brains. *Front. Neuroanat.* 7:3. doi: 10.3389/fnana.2013.00003

Viktorov, I. V., and Proshin, S. S. (2003). Use of isopropyl alcohol in histological assays: dehydration of tissue, enbessing into paraffin, and processing of paraffin sections. *Bull. Exp. Biol. Med.* 136, 105–106. doi: 10.1023/a:1026017719668

Vonsattel, J. P., Amaya Mdel, P., Cortes, E. P., Mancevska, K., and Keller, C. E. (2008). Twenty-first century brain banking: practical prerequisites and lessons from the past: the experience of New York brain Bank, Taub institute, Columbia University. *Cell Tissue Bank* 9, 247–258. doi: 10.1007/s10561-008-9079-y

Weisbecker, V. (2011). Distortion in formalin-fixed brains: using geometric morphometrics to quantify the worst-case scenario in mice. *Brain Struct. Funct.* 217, 677–685. doi: 10.1007/s00429-011-0366-1

Wisniewski, H. M., Wen, G. Y., and Kim, K. S. (1989). Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques. *Acta Neuropathol.* 78, 22–27. doi: 10.1007/ bf00687398

Wolman, M. (1958). Studies on the impregnation of nervous tissue elements. IV. Mechanism of impregnation of oligodendroglia and microglia. *Lab. Investig.* 7, 52–57.

Xiao, G., Li, H., Zhao, M., and Zhou, B. (2023). “Chapter eight - assessing metal ion transporting activity of ZIPs: intracellular zinc and iron detection” in *Methods in enzymology*. ed. J. Hu, vol. *687* (Cambridge, MA: Academic Press), 157–184.

Zachlod, D., Kedo, O., and Amunts, K. (2022). Anatomy of the temporal lobe: from macro to micro. *Handb. Clin. Neurol.* 187, 17–51. doi: 10.1016/b978-0-12-823493-8.00009-2

3.9 Résultats supplémentaires

Ces résultats préliminaires sont issus d'une publication en préparation pour soumission au journal Brain communications. Ce manuscrit sera soumis comme :

Eve-Marie Frigon, MSc*, Victoria Perreault, BSc*, Amy Gérin-Lajoie, BSc, Denis Boire, PhD, Josefina Maranzano, MD, PhD. Immunofluorescence quality of human brain tissue fixed with solutions used in gross anatomy laboratories.

Suite aux expériences sur la qualité de l'IF effectuées chez la souris, où des résultats positifs avaient été obtenus quant à la qualité dans les trois solutions de fixation, nous avons tenté de reproduire les protocoles sur les blocs de cerveaux humains.

Les mêmes deux anticorps (anti-NeuN et anti-GFAP) ont été testés. Le NeuN a été détecté dans la longueur d'onde 488nm et le GFAP dans la longueur d'onde 555nm avec des anticorps secondaires couplés aux fluorophores correspondants. La détection des antigènes par IF a été évaluée selon une échelle qualitative (comme présentée dans le manuscrit ci-haut) selon la distribution des cellules marquées: Aucune cellule=0, Figure 13A; Cellules isolées=1, Figure 13B; Hétérogène=2, Figure 13C; Homogène=3, Figure 13D. L'AF a été évaluée selon deux critères : 1-L'AF de l'arrière-plan (causée par les bases de Schiff), selon une échelle qualitative d'intensité de gris : Gris pâle=0, Figure 13E; Gris=1, Figure 13F; Gris foncé=2, Figure 13G; Noir=3, Figure 13H; et 2-L'AF des cellules (neurones et gliales, causée par l'accumulation de lipofuscines), selon une échelle qualitative de la quantité de cellules autofluorescentes observées : Cellules et granules=0, Figure 13I; Cellules seulement=1, Figure 13J; Granules seulement=2, Figure 13K; Absence d'AF=3, Figure 13L.

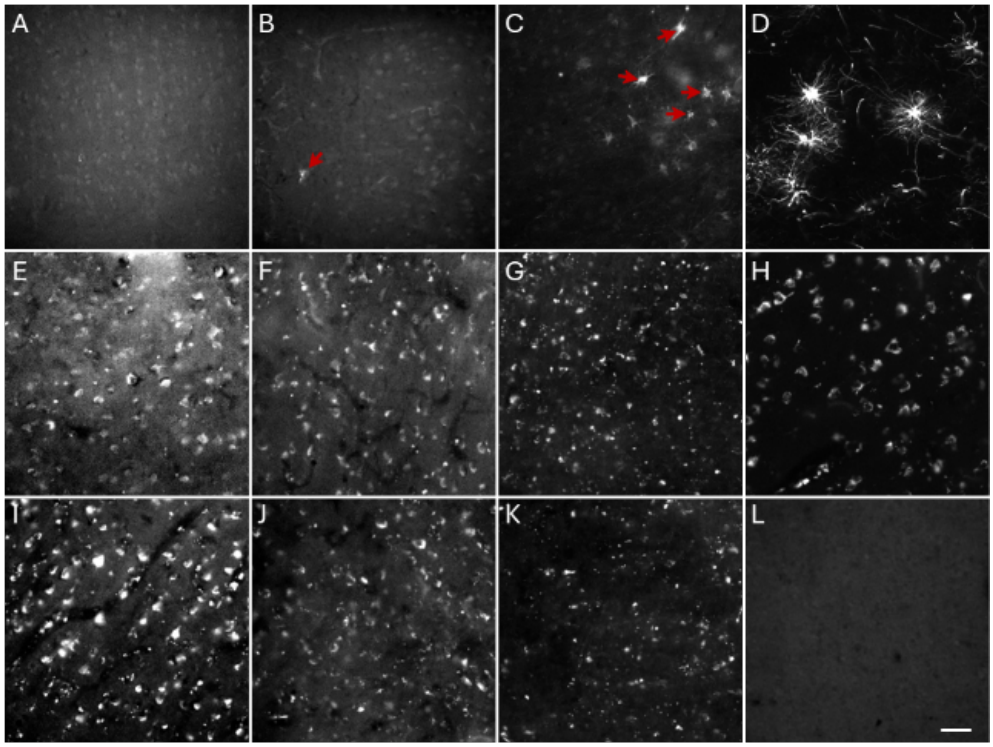


Figure 13. – Photomicrographies (20X) de la qualité de l'IF évaluée par trois variables; le degré de préservation des antigènes (A-D), l'intensité de l'arrière-plan (E-H) et l'intensité de l'AF des cellules (I-L). Préservation des antigènes A) Absente=0; B) Cellules isolées=1; C) Hétérogène (en *patch*)=2, où les flèches rouges indiquent un astrocyte; D) Homogène=3. Intensité de l'arrière-plan E) Gris pâle=0; F) Gris=1; G) Gris foncé=2; H) Noir=3. Intensité de l'AF des cellules I) Cellules et granules présentes=0; J) Cellules présentes=1; K) Granules présentes=2; L) Aucune AF=3. Échelle=50μm.

Après l'application d'un protocole d'HIAR, les GFAP étaient préservés de manière homogène dans tous les spécimens, peu importe la solution de fixation (Figure 14A). Par contre, le marquage des neurones était toujours absent dans les cas fixés avec la SFA. De plus, dans les cerveaux fixés avec la SA, nous avons observé un spécimen avec cellules isolées, et un autre spécimen avec une distribution hétérogène alors qu'un spécimen fixé avec la SSS a montré des cellules isolées (Figure 14B). Les neurones étaient plus susceptibles d'être masqués par de l'AF, ce qui empêchait une bonne analyse de l'IF. En effet, les cas où les cellules n'étaient pas marquées (Score=0) présentaient toujours une AF plus élevée, ce qui masquait la détection de l'antigène.

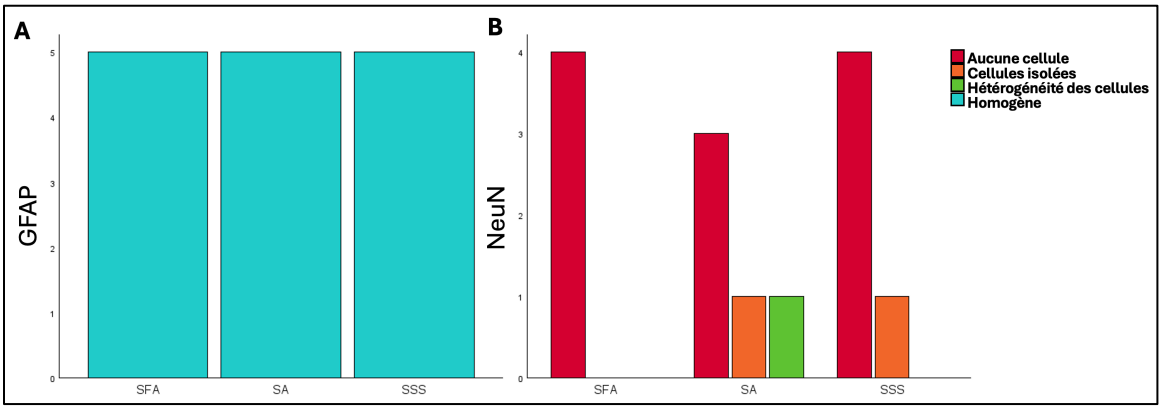


Figure 14. – Distribution des antigènes (NeuN et GFAP) selon les trois solutions de fixation après un protocole d'HIAR.

Puisque l'AF masquait les cellules, l'intensité de l'AF a aussi été évaluée, et ce, selon deux traitements, c.-à-d. le Borohydrure de sodium ($NaBH_4$) et le *Sudan black*, tous deux utilisés dans la littérature pour masquer l'AF. La performance de ces deux traitements a donc été évaluée.

Les coupes traitées avec le *Sudan black* montrent un arrière-plan plus souvent noir que lorsqu'il n'y a pas de traitement ou même avec le traitement au $NaBH_4$ dans la SFA. Les arrière-plans des cas fixés avec la SA et la SSS sont également plus souvent gris ou gris foncés lorsque traités avec le *SB*, démontrant son efficacité. Le *SB* semble également réduire l'AF émise dans la longueur d'onde 488 nm de manière plus efficace, ce qui correspond à la longueur d'onde où les neurones sont détectés. De plus, les coupes traitées au *SB* n'ont jamais un arrière-plan gris pâle et une plus grande fréquence d'arrière-plans noirs est obtenue. La longueur d'onde 555 nm est également positivement affectée par le *SB*, où un arrière-plan gris foncé est le plus souvent observé, et où moins de spécimens avec cellules et granules (Score=0) sont retrouvées. Les traitements n'ont pas d'impact sur l'AF des cellules avec les trois solutions de fixation. Finalement, l'AF des cellules est également masquée par le *SB* de manière plus efficace dans les bandes entre 555 et 647 nm. Les résultats décrits ci-haut sont présentés dans la figure 15 ci-dessous.

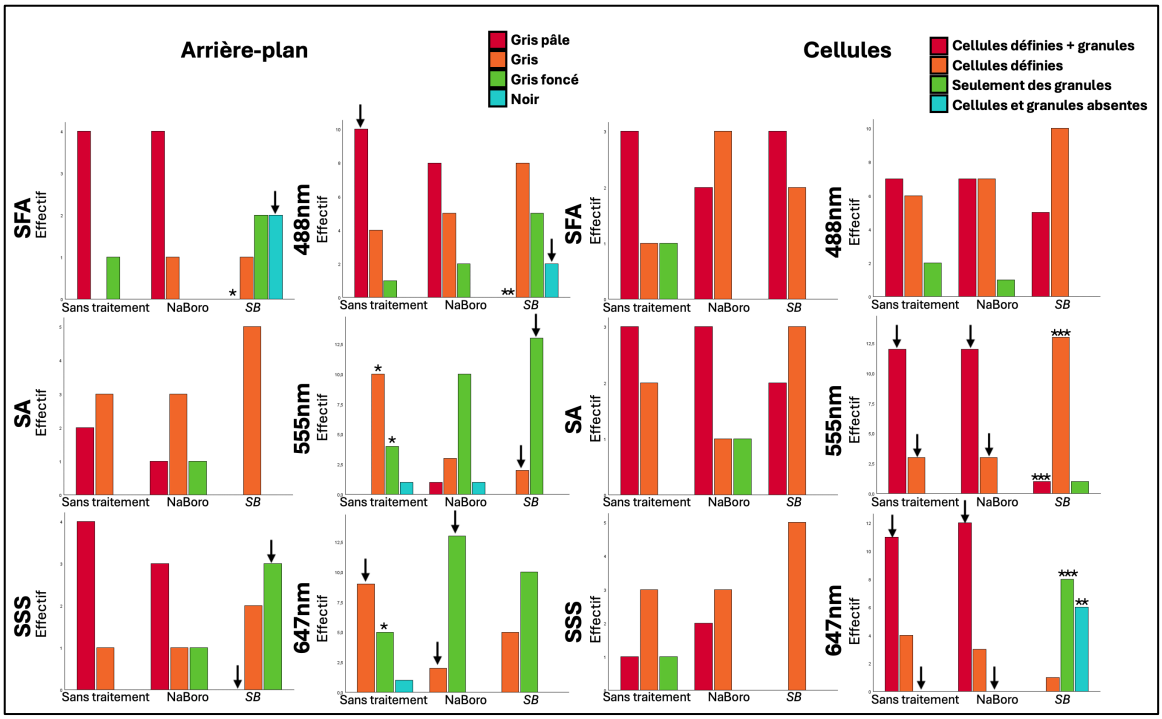


Figure 15. – Degré d'AF de l'arrière-plan (gauche) et des cellules (droite) selon le traitement au $NaBH_4$ ou au *sudan black* appliqué. Les variables ont été comparées par solution de fixation et par longueur d'ondes. ↓ Significatif avant la correction de Bonferroni; * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001 après la correction de Bonferroni. Les neurones sont visibles dans la longueur d'onde 488nm, les astrocytes dans la longueur d'onde 555nm et rien n'est marqué dans la longueur d'onde 647nm (donc techniquement, devrait être exempt de marquage et montrer un arrière-plan complètement noir des coupes).

Ces résultats montrent que les astrocytes sont bien préservés et bien détectés, alors que les neurones ne sont pas toujours marqués, ou ils sont masqués par l'AF intense des cellules dans les cerveaux humains vieillissants. De plus, l'AF est présente dans les coupes de cerveaux fixés avec les trois solutions, et lorsque les coupes sont excitées par une bande passante entre 488nm et 647nm. Finalement, ces résultats suggèrent qu'il est souhaitable d'utiliser un protocole de coloration au *Sudan black* pour des analyses d'IF puisqu'il semble être le traitement contre l'AF le plus efficace.

Chapitre 4 – Article 3 – Histology to MRI registration quality of *ex vivo* human brain blocks fixed with solutions used in anatomy laboratories

4.1 Préface

Ce chapitre inclut le troisième article de cette thèse qui fait l'objet d'un article original publié dans la revue Aperture Neuro. Cette étude avait pour but de comparer la faisabilité et la qualité du recalage entre les images histologiques et les IRM de blocs de cerveaux fixés avec les trois solutions. Cet article a donc déterminé la faisabilité d'établir des corrélations entre les deux modalités, même lorsque les cerveaux sont fixés avec des solutions différentes. De plus, des résultats préliminaires de colocalisation et de corrélations sur un cerveau pathologique sont présentés à la fin de ce chapitre, même si cela ne fait pas partie de l'article originalement publié.

Cet article a été publié comme :

Frigon EM, Gérin-Lajoie A, Fouquet J, Zeighami Y, Boire D, Dadar M, Maranzano J. (2026) Histology to MRI registration quality of *ex vivo* human brain blocks fixed with solutions used in anatomy laboratories. *Aperture Neuro*. 2026;6 doi 10.52294/001c.154293

4.1.1 Contribution des auteurs

Eve-Marie Frigon : Conception et devis de recherche, Collecte de données, protocoles expérimentaux, organisation des données, analyses des données, écriture du manuscrit.

Amy Gérin-Lajoie : Protocoles expérimentaux, révision du manuscrit.

Jérémie Fouquet : Protocoles expérimentaux.

Yashar Zeighami : Protocoles expérimentaux, révision du manuscrit.

Denis Boire : Ressources, révision du manuscrit.

Mahsa Dadar : Conception et devis de recherche, Ressources, analyse des données, révision du manuscrit.

Josefina Maranzano : Conception et devis de recherche, Ressources, analyses des données, écriture du manuscrit.

4.1.2 Contribution scientifique

Cette étude est en révision dans un journal en libre accès où la communauté scientifique pourra utiliser les protocoles histologiques et les protocoles d'IRM *ex vivo* qui ont été développés sur des blocs de cerveaux post-mortem. Cette communication permet de conclure que des analyses par IRM et par histologie, et le recalage des deux modalités, sont envisageables même lorsque les cerveaux sont fixés dans différentes conditions (c.-à-d. avec variables confondantes), et que les cerveaux peuvent être utilisés au meilleur escient malgré les circonstances, parfois sous-optimales, du tissu post-mortem des laboratoires d'anatomie.

4.2 Abstract

Post-mortem brain tissue is obtained from brain banks that provide small samples that are fixed with neutral-buffered formalin (NBF), while gross anatomy laboratories could become a source of complete brains for neuroscientists. These are preserved with solutions developed for dissection, such as a saturated-salt-solution (SSS) or an alcohol-formaldehyde solution (AFS). Histology remains the gold standard in neuroscientific research, while MRI is the most common imaging modality. Thus, MRI-histology registration quality needs to be assessed in human brains fixed with NBF, SSS and AFS. To this end, we used 12 human brain blocks fixed in our anatomy laboratory (SSS=4; AFS=4; NBF=4). The blocks were scanned using a 7T Bruker animal MRI scanner with a T2-TurboRARE sequence and cut into 40µm sections, which were stained with histochemistry and immunohistochemistry. Stained sections were imaged using a slide scanner microscope and segmented with masks using Display, and the sections were manually registered to the T2-TurboRare images using landmarks in Register (MINC ToolKit). Our results showed that more landmarks were needed to achieve proper alignment of the histology to MRI images for the SSS-fixed blocks. These blocks also showed a lower percentage of overlap between the good histology quality masks and the MRI masks. We conclude that our MRI and registration protocols are suitable for brains fixed with SSS. These results are promising for neuroscientists interested

in using full brains from anatomy laboratories, either using MRI, histology or registration of both modalities to study normal aging and neurodegenerative conditions.

Keywords: fixation, human post-mortem brain, registration, histology, MRI

4.3 Introduction

Magnetic resonance imaging (MRI) is the most common neuroimaging modality in neuroscientific research, since it is non-invasive and can provide good contrast between the cortical gray matter (GMc) and white matter (WM), enabling assessment and quantification of different brain structures and pathologies. Different MRI acquisition protocols and technologies have been developed in the last few decades, increasing our ability to estimate whole brain, GMc and WM volumes,[1] volumetric and relaxation changes of specific structures in neurodegenerative diseases (e.g., hippocampal volume changes in dementia),[2,3] and lesion occurrence and their longitudinal evolution (e.g., white matter hyperintensities in cerebrovascular disease).[4] However, to confirm MRI findings, histology remains the gold standard in neuroscientific research since it provides cellular resolution.[5,6] Being able to correlate MRI imaging with cellular histology is of utmost importance to establish a meaningful anatomical and pathophysiological conclusion.

Biopsies from living individuals for histopathological study can only provide very small samples and are rarely performed due to their invasive nature. Therefore, researchers commonly use post-mortem tissue samples that are generally provided by brain banks. However, brain banks can usually provide limited numbers of small tissue samples, one hemisphere being fixed by immersion in Neutral-buffered formalin (NBF), and the other frozen.[7,8] Alternatively, neuroscientists could obtain higher numbers of full brains from gross anatomy laboratories that collaborate with body donation programs. These brains are fixed through whole-body perfusion, using solutions other than NBF typically used in brain banks since the body is used for teaching gross anatomy. Previous work of our team has shown that two solutions used in our human anatomy laboratory, either a saturated-salt solution (SSS) and an alcohol-formaldehyde solution (AFS), preserve antigenicity of the four main cell populations in mice brains[9] and in human brain samples.[10] This work established that histology of human brain tissue fixed with SSS or AFS is of sufficient quality for neuroscientific research, potentially increasing the amount of brain tissue

available to neuroscientists for histological studies. Furthermore, performing MRI scans in these brains is also feasible, enabling correlations with histology findings.[11,12]

Since MRI is the most common neuroimaging modality, and histology remains the gold standard, registration of images obtained with these two modalities is essential to correlate findings.[13-15] Previous work on Alzheimer's disease,[16-21] Parkinson's disease,[22] strokes,[23] cerebrovascular diseases,[24-27] white matter hyperintensities,[28,29] multiple sclerosis,[30-33] etc., have used registration between MRI and histology (of tissue fixed with NBF) to either confirm the clinical diagnosis or to elucidate the cellular changes in tissues and lesions that are characteristic of these pathologies.

While both MRI and histology assessments are feasible in tissues fixed by perfusion using neuroanatomy solutions (i.e., AFS and SSS), previous work has not established whether studies that use registration would be feasible and of sufficient quality in these brains. Hence, the goal of the present study was to describe the protocols that are suitable for manual linear registration of the histology sections to MRI in human brain blocks fixed with three solutions (SSS and AFS used in anatomy laboratories, and NBF used in brain banks), and to compare the robustness of the alignments in different histology stains across the fixatives as well as different staining types.

4.4 Methods

4.4.1 Population

We used a convenience sample of 12 human brain blocks (SSS: N=4, AFS: N=4, and NBF: N=4) from our body donation program (University of Quebec in Trois-Rivieres, UQTR), that were fixed by whole-body perfusion. The bodies are injected with 25 liters of one of the three fixatives through the right common carotid artery using a pump at 30 pounds per square inch. Prior to death, the donors consented to body donation and sharing their medical information for research or teaching purposes. This study was approved by the University's Ethic Subcommittee on Anatomical Teaching and Research (UQTR) and by the Douglas Research Centre Ethic Committee (McGill University, Montreal). The mean age at time of death was 81 years old (SD=9.65; range from 64 to 96). Female to male ratio reached 2:1. The mean post-mortem interval (PMI, i.e., delay between death and injection of the fixative solution) was 18.6 hours (SD=8.6; range from 3 to 36).

The mean processing delay (PD, i.e., delay between injection of the fixative solution and MRI scans followed by histology procedures) was 32.9 months. The donors' demographics are reported in Table 1.

Table 1. Characteristics of the specimens included in this study.

Fixative	Sex	Age	Cause of death	PMI (hours)	PD (months)	Lobe
NBF	M	74	Lung cancer	3	34	Frontal R
		85	Pulmonary oedema	12	82	Parietal R
	F	84	Sepsis	21	32	Temporal L
		89	Pneumonia	23	24	Occipital R
SSS	M	83	Cardiac arrest	20	29	Occipital R
	F	67	COPD	36	41	Parietal L
		75	Pneumonia and MS	27	47	Temporal R
		87	Pneumonia	9.5	18	Frontal L
AFS	M	91	COPD	20	15	Parietal L
	F	64	Pneumonia, dementia	15.5	39	Occipital R
		96	Breast cancer	13.5	17	Temporal L
		80	Cancer	23	17	Frontal L

NBF=Neutral-buffered formalin; SSS=Saturated-salt solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution; F=Female; M=Male; COPD=Chronic obstructive pulmonary disease; MS=Multiple Sclerosis; PMI=post-mortem interval; PD=Processing delay; R=Right; L=Left.

4.4.2 Magnetic resonance imaging protocol

Tissue blocks of approximately 3x3x3 cm^3 were cut from regions that were macroscopically of good quality (i.e., avoid tears that could have happened during brain extraction and during removal of the arachnoid) and to include one block with neocortex and subcortical WM for each lobe (i.e., temporal, frontal, parietal and occipital) for each of the fixative groups. Blocks were packed in small containers filled with a high-density fluoropolymer fluid free of MRI signal

(Christo-Lube, Engineered Custom Lubricants). To avoid air bubbles, the tissue blocks were packed in the container while fully immersed in a bucket filled with the fluoropolymer fluid, closing the lid while the specimen and container were fully immersed. The blocks were packed so that the flat-cut surface of the block was orientated to the top (i.e., in which the high-density fluid pushed the flat surface consistently to the top of the lid), allowing for a consistent orientation of the high-resolution plane of the MRI acquisition (0.13 x 0.13 mm). Blocks were then scanned in a 7 Tesla Bruker Biospec 70/30 animal MRI scanner at the Douglas Cerebral Imaging Centre (CIC) using a Bruker transmit-receive volume coil with an 86-mm inner diameter. Six high-resolution sequences (T1-FLASH, T2-TurboRARE, T1-map, T2-map, T2*map, and MP2RAGE) were acquired overnight using parameters that were described in the Douglas-Bell Canada Brain Bank Post-mortem brain imaging protocol.[34]

4.4.3 Histology procedures

4.4.3.1 Sectioning and mounting

After MRI scans were completed, the tissue blocks were rinsed in 0.1M Phosphate buffer and photographed. The blocks that were too large to fit into the vibratome (Leica VT1000S) were cut and photographed again before cutting into 40 μm sections. The flat surface of the blocks was mounted on the vibratome, allowing for sectioning in the same orientation as the high-resolution plane of the MRI (since the flat surface was lying on top of the lid while scanning, which was used to adjust the field of view for the high-resolution MRI plane, and since we opened the MRI in Display to visually validate the high-resolution plane). Sections of two different levels of the blocks (also photographed), which resulted in parallel levels to the high MRI resolution plane, were selected as followed: five sections per level (ten total) were mounted on 70 x 50 mm slides and processed with five histochemistry (HC) stains. Similarly, two consecutive sections (i.e., from the same level parallel to the high MRI resolution plane) were mounted for immunohistochemistry (IHC) with 4 different antibodies. We selected the level that showed the least amount of deformation and tears to obtain these eight sections. One section per antibody was processed with a heat-induced antigen retrieval (AR) protocol (boiling 20 minutes in 0.01M Citrate Buffer), and the other was processed with IHC directly, to avoid the potential additional tearing and

deformation caused by the heat of the AR procedure. This procedure resulted in 18 mounted sections per block.

4.4.3.2 Immunohistochemistry

IHC was used to label the four main cell populations: neurons, using neuronal nuclei (NeuN) antibodies, astrocytes, using glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody, microglia, using ionized binding adaptor molecule 1 (Iba1) antibody and oligodendrocytic myelin using proteolipid protein (PLP) antibody. Procedures were followed as described in Frigon et al., 2024[10] but sections were processed mounted on the slides rather than free-floating.

4.4.3.3 Histochemistry stains

We used five HC stains to label the main brain cell populations, avoiding antibodies that require antigen configuration specificity. We used Cresyl Violet (Nissl stain, which labels neurons and glial cell bodies), Luxol Fast Blue (myelin), Prussian blue staining (Perl's stain, which labels iron deposits), Bielschowsky's silver staining (which labels axons and neurofibrillary tangles) as previously described in Frigon et al., 2024.[10] We also used Hematoxylin and Eosin (H&E) Staining Kit from Abcam (ab245880) and followed their guidelines.

4.4.3.4 Imaging

Mounted stained sections were scanned at 40X magnification with an Olympus VS120 Slide scanner at the CIC. The images were converted from .vsi format to .nifti format and downsampled by a factor of 20 to reduce file size to facilitate the registration step using an in-house MATLAB script. The resulting images were converted to minc format to allow the use of the Register software from the MINC Tool-Kit (McConnell Brain Imaging Centre) to perform manual registration.

4.4.4 Registration

The T2-TurboRARE images (voxel resolution of 0.13*0.13*0.5 mm) were used for registration with histology since they provide good anatomical contrast that are close to in vivo images, in comparison to post-mortem T1w images in which the gray level contrast is reversed.[34] Registration between histology images and MRIs was performed using a manual linear

registration approach (3 rotations, 3 translations, 1 scale), tagging a minimum of 4 landmarks using Register software (included in the MINC Tool-Kit). More fiducial markers (i.e., tags) were placed if necessary, and the required number was considered as a variable of interest (see next section). Since all the acquired post-mortem sequences are co-registered together, histology images could also be co-registered to the other acquired sequences using the same transformations. The same approach was repeated to register the block photos to the MRIs.

4.4.5 Variables of interest

4.4.5.1 Histology quality | Staining intensity

Histological staining intensity of the sections was qualitatively assessed as it could impact the alignment of the tissue, i.e., if certain parts of the tissue are not sufficiently stained, then those areas could be impossible to align. A darker section reflected the better quality of the histology, since they reflected a better visualization of the anatomical landmarks.

Pale=0 (Figure 1A); Heterogeneous=1 (Figure 1B); Dark=2 (Figure 1C).

4.4.5.2 Histology quality | Gray matter to white matter contrast

The GM-WM contrast was assessed since more contrast on the histology sections allows for better placement of markers on different boundaries of the tissue (i.e., pial surface of the GMc and GMc-to-WM boundary). A sharp GM-WM contrast reflected a better quality of the histology since it reflected a better visualization of the anatomical landmarks.

No contrast=0 (Figure 1D); Blurred contrast=1 (Figure 1E); Sharp contrast=2 (Figure 1F).

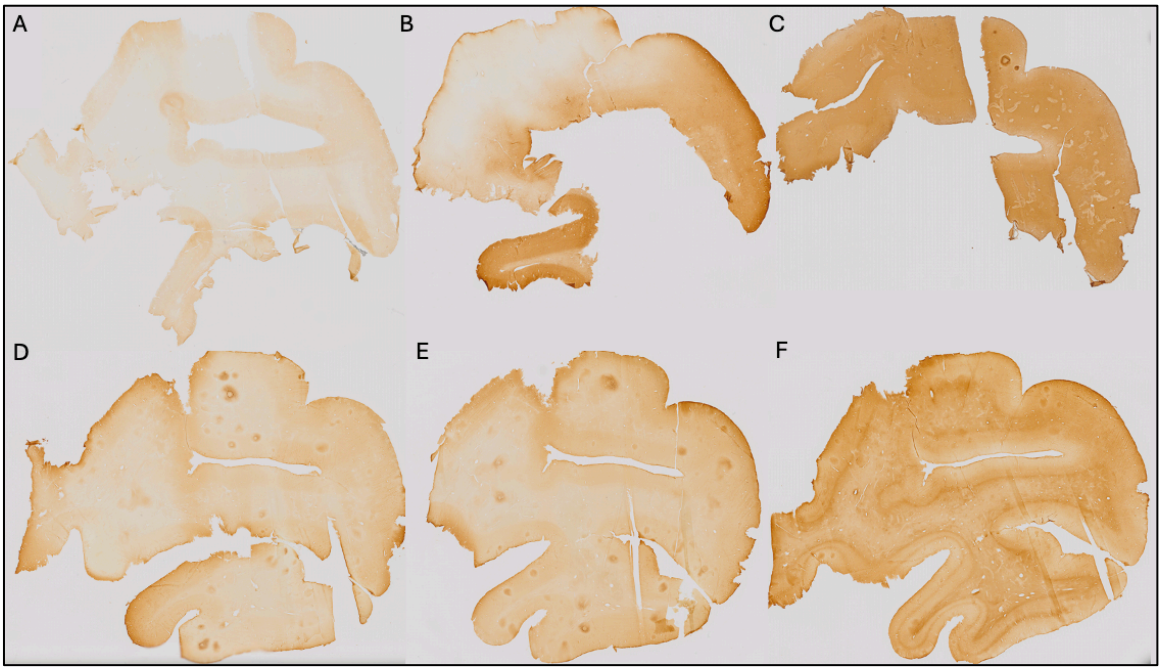


Figure 1. Criteria for assessment of the histology quality variable. Staining intensity showing A) Pale section=0; B) Heterogeneous section=1 and C) Dark section=2. GM-WM contrast showing D) No contrast=0; E) Blurred contrast=1 and F) Sharp contrast=2. These sections come from the right occipital block fixed with SSS.

4.4.5.3 Registration quality | Number of tags

The number of tags that were used for manual registration was considered as a variable that could inform on the ease of registration. If more than 4 tags were needed (minimum to initiate manual alignment), this could reflect that the registration was more complicated. An example of the anatomical landmarks (6 tags) that were used is shown in Figure 2.

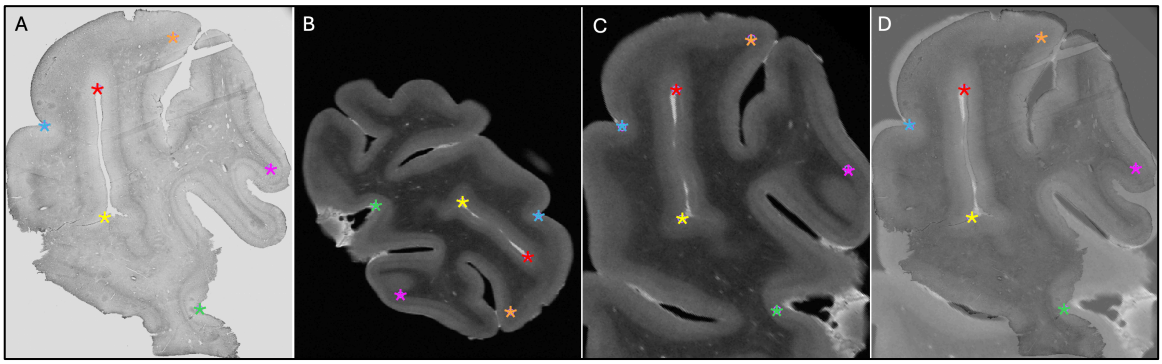


Figure 2. Process of the manual registration using landmarks. A) Histology section. B) Native T2-TurboRARE MRI sequence. C) T2-TurboRARE MRI registered to the histology section. D) Overlap of the histology and registered MRI. Colored stars (6 tags in total: orange, red, blue, pink, yellow and green) show the landmarks that were used to initiate the registration between A and B, which resulted in C, and the overlap of both modalities in D.

4.4.5.4 Registration quality | Tissue block-MRI-histology colocalization

Using Display software from the MINC toolkit, we segmented the surfaces of the same level of the MRI slide (Figure 3A) and the photograph of the tissue block (Figure 3B) registered to the corresponding histology section (Figure 3C). The histology sections were segmented by an expert with more than 8 years of experience (EMF), creating the following masks: Label 1 (Red)=Non-folded/Non-torn tissue (Good quality); Label 2 (Green)=Folded tissue; Label 3 (Blue)=Torn tissue; and Label 4 (Cyan)=Non-folded/Non-torn tissue that was not parallel to the MRI plane (Good quality but off plane) (Figure 3C). The surface of each mask was calculated as number of pixels in the MRI image space by transforming the histology and tissue block images to the MRI image space using the generation transforms. The MRI and photo block masks (Figure 3A-B) were then overlapped (Figure 4A) to assess the amount of tissue that was cut from the scanned block to be able to fit the vibratome. Then, the overlap of the histology mask (Label 1, Non-folded/Non-Teared tissue) and the photo block mask (Figure 3B-C and Figure 4B) was used to assess the percentage of tissue loss in the histology sections. Dice Kappas of the overlapped masks were also calculated to assess the amount of overlap. All measurements were generated automatically using an in-house MATLAB script. The percentage of tissue showing Good quality was then compared according to the fixatives and the staining types. We also assessed the mean percentage of Folded tissue and Torn tissue for each group to assess if the quality of the histology section affected the registration quality.

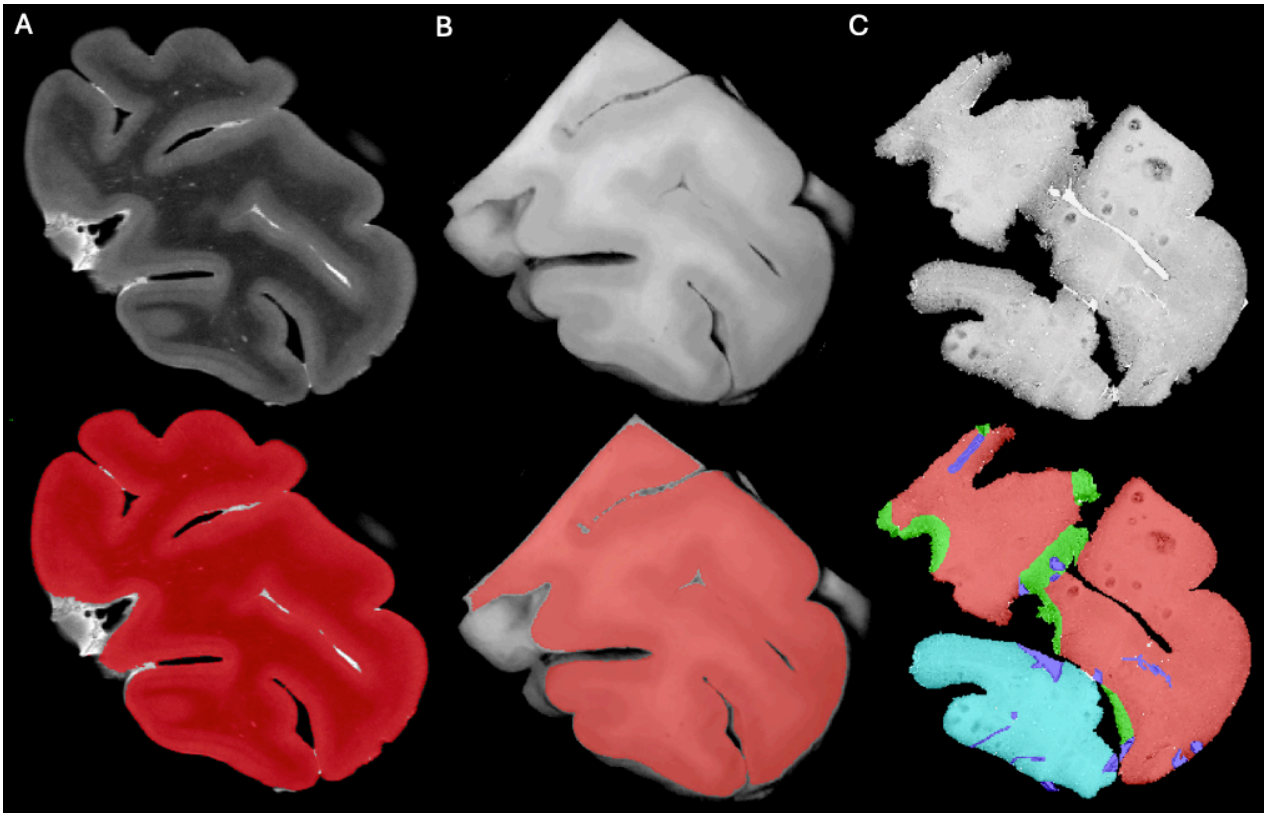


Figure 3. Masks created using Display to assess histology-MRI colocalization. Masks were created for A) MRI slide registered to the histology section; B) Photo of the block cut to fit in the vibratome, registered to the MRI-histology section; C) Histology sections photomicrographs. Red masks=Non-folded/Non-torn tissue (Good quality); Green masks=Folded tissue; Blue masks=Torn tissue; and Cyan blue= Non-folded/Non-torn tissue that was not parallel to the MRI plane (Good quality but off plane).

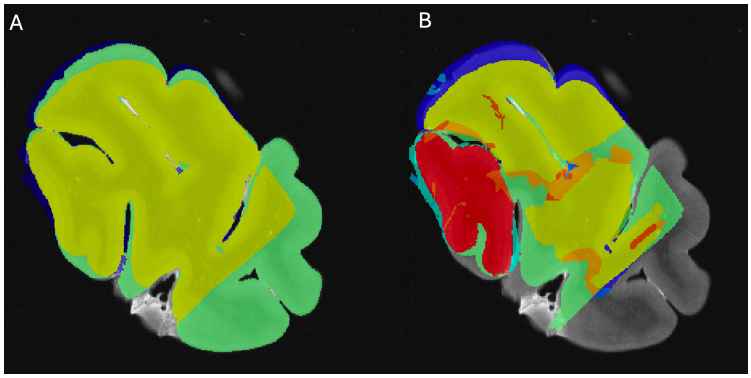


Figure 4. Overlap of the masks segmented to assess the amount of histology tissue colocalizing with MRI scans. A) Overlap of the MRI plane and block photo masks that was considered as the

target for assessment of the histology sections that co-localized. B) Overlap of the histology (with the four labels) to the block photo masks that is overlapped with the MRI picture, which was assessed according to the two groups (fixatives and type of staining).

4.4.6 Statistical analysis

Qualitative variables (section 2.5.1: staining intensity and GM-WM contrast) were assessed using chi-square. Quantitative variables (section 2.5.2: number of tags and tissue block-MRI-histology colocalization) were assessed using Kruskal-Wallis analyses according to their distribution. All the variables were compared between the three experimental groups (NBF, SSS and AFS), as well as between the three different staining types (IHC with AR, IHC without AR and HC). All variables were also assessed individually within the comparison groups so that the variables were evaluated independently. All statistical analyses were conducted using IBM SPSS statistics (version 29.0.2.0) and were adjusted for multiple comparisons following a Bonferroni correction.

4.5 Results

4.5.1 Histology quality

4.5.1.1 Staining intensity

No significant difference was found in the staining intensity of the histology sections across the three fixatives (p=0.696) (Figure 5, top left). However, when considered individually, in IHC sections processed with AR, SSS-fixed brains showed a significantly lower frequency of Dark sections (p=0.0037) and a higher number of Heterogeneous sections (p=0.045), while the later did not retain significance after a Bonferroni correction. The other two staining types (IHC without AR and HC) showed the same pattern as the overall staining intensity according to the fixatives (Figure 5, left column).

According to the impact of the staining types, IHC with AR showed more sections with a heterogeneous staining intensity, but this did not retain significance after a Bonferroni correction (uncorrected p=0.04). IHC without AR showed a significantly higher number of Pale sections than with AR and HC staining (p<0.0001) and significantly fewer Dark sections (p=0.0003). Finally, HC

sections showed significantly fewer Pale sections (p=0.0007) and a significantly higher number of Dark sections (p<0.0001) (Figure 5, top right). When considered individually within the fixative groups, NBF, SSS and AFS brain blocks followed the same pattern of a higher number of Dark sections in HC sections, and a higher number of Pale sections while lower number of Dark sections in IHC without AR (Figure 5, third column).

4.5.1.2 Gray matter to white matter contrast

GM-WM contrast showed significant differences between sections of blocks that were fixed with the three solutions (p=0.03). NBF-fixed blocks showed fewer sections with a Blurred contrast than the other two solutions, but this did not retain significance after a Bonferroni correction (uncorrected p=0.016). SSS-fixed blocks showed a significantly higher number of Blurred contrast (p=0.005) and significantly fewer Sharp contrast (p=0.005) than the sections fixed with the other two solutions (Figure 5, top row, second column). When considered individually, sections processed with IHC without AR showed a significantly higher number of Blurred GM-WM contrast when fixed with SSS (p=0.005), and sections processed with HC also showed more sections with Blurred contrast and fewer with Sharp contrast, but this did not retain significance after Bonferroni correction (p=0.037 and p=0.0069, respectively) (Figure 5, second column).

GM-WM contrast was also significantly affected by the staining type (p=0.001). IHC with AR did not show any statistical difference. However, IHC without AR showed significantly more sections with No contrast (p=0.0003) and fewer sections with a Sharp contrast than HC, but this did not retain significance after a Bonferroni correction (uncorrected p=0.012). Finally, HC staining showed significantly fewer sections with No contrast (p=0.0002) and more sections with Sharp contrast, but this did not retain significance after Bonferroni correction (uncorrected p=0.0069) (Figure 5, bottom right). This pattern was also observed when blocks fixed with the three fixatives were considered individually; NBF-fixed and AFS-fixed blocks processed with IHC without AR showed significantly more sections with No contrast than when processed with the other two staining types (p=0.0027 and p=0.0037, respectively) (Figure 5, fourth column).

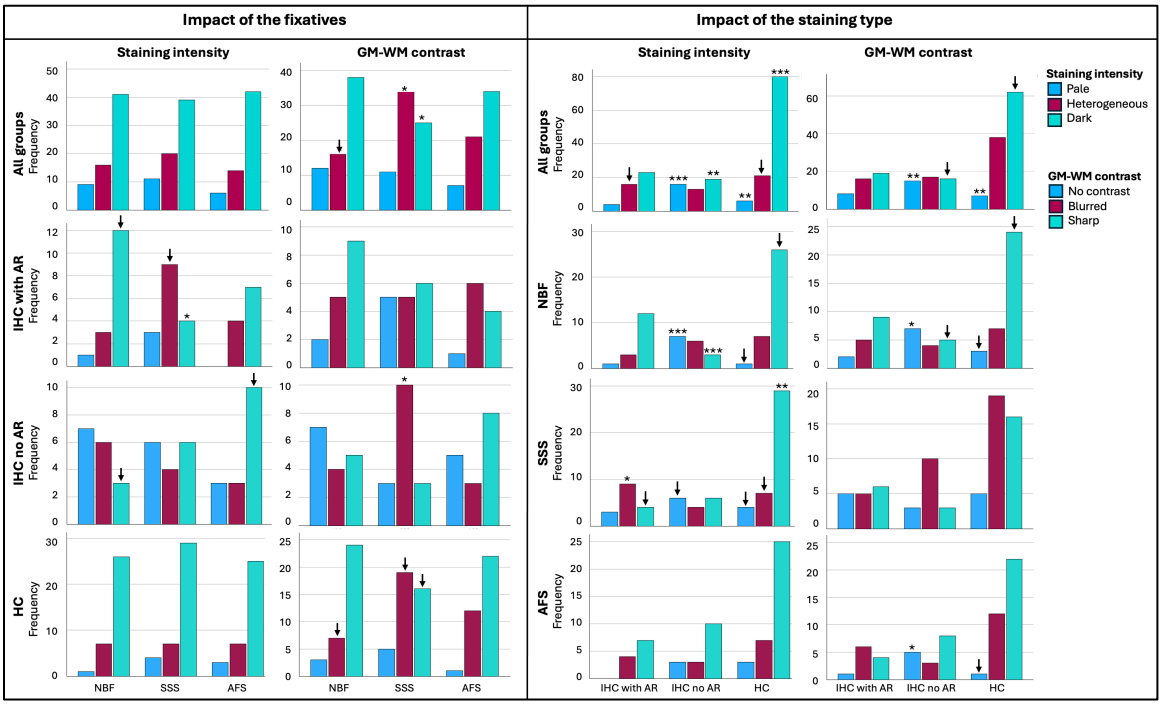


Figure 5. Histology quality of the sections regarding staining intensity and gray to white matter (GM-WM) contrast. Left graphs show the impact of the fixatives (NBF=Neutral-buffered formalin; SSS=Saturated-salt solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution) on the staining intensity (left column) and GM-WM contrast (right column). Right graphs show the impact of the staining type (IHC=Immunohistochemistry; AR=Antigen retrieval; HC= Histochemistry) on the staining intensity (left column) and GM-WM contrast (right column). Top row shows the results of the histology quality when all groups were considered together. Second, third and 4th row show the results of the histology quality when the groups are assessed individually (IHC with AR, IHC without AR and HC, respectively, for the impact of the fixatives, and NBF, SSS and AFS, respectively, for the impact of the staining type). ↓p<0.05 before Bonferroni correction; *p<0.005; **p<0.001; ***p<0.0001.

4.5.2 Registration quality

4.5.2.1 Number of tags

SSS-fixed blocks required significantly more tags to initiate alignment (median=6, range 4-16) than the blocks that were fixed with the other two solutions (NBF; median=5, range 4-25; p=0.002 and AFS, median=4, range 4-10; p<0.001) (Figure 6A). The staining type (IHC with AR, IHC without AR and HC) did not have an impact on the number of tags that were necessary to manually register

the sections, since no significant difference (p=0.55) was found across groups (IHC-AR, median=6, range 4-25; IHC-noAR, median=5, range 4-9; HC, median=5, range 4-16) (Figure 6B).

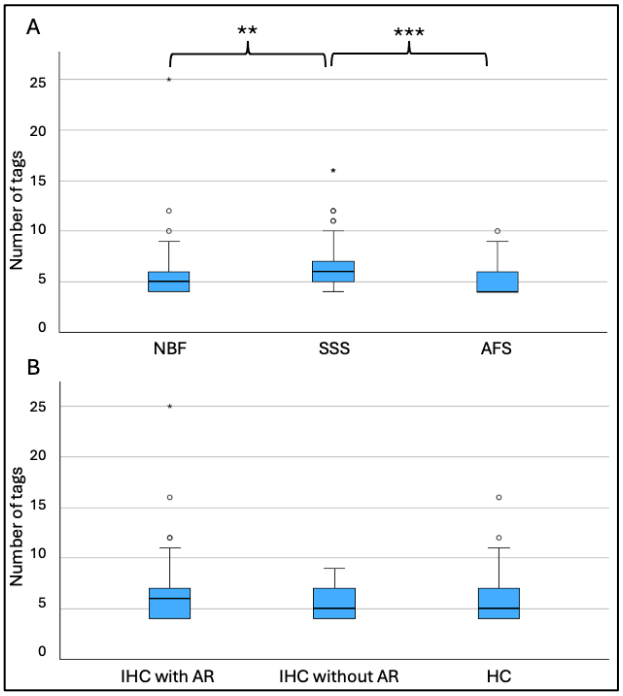


Figure 6. Number of tags necessary to register the sections A) according to the fixative and B) according to the type of staining. NBF=Neutral-buffered formalin SSS=Saturated-salt solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution; IHC=Immunohistochemistry; AR=Antigen retrieval; HC=Histochemistry. **p<0.001; ***p<0.0001.

4.5.2.2 Tissue block-MRI-histology colocalization

We used the overlap of the photo block and MRI (Figure 4A) as the target of the histology masks to assess the percentage of the histology sections of Good quality (label 1=Non-folded/Non-torn tissue) that colocalized with the MRIs. AFS-fixed blocks showed significantly higher overlap (%) between the MRI and Good quality histology mask (median=80.49, range 18-97, median kappa=0.892) than SSS-fixed blocks (median=67.40, range 0-93, median kappa=0.805) (p=0.012) (Figure 7 top left). Percentage of the good quality histology masks overlap with MRI and tissue block overlap were significantly different between the staining types, with a median of IHC with AR, IHC without AR and HC of 50.78 (range 0-96, median kappa=0.674), 76.45 (range 25-97, median kappa=0.841) and 72.46 (range 18-96, median kappa=0.870) respectively (p<0.001). IHC

with AR histology sections showed significantly less overlap than IHC without AR ($p<0.001$) and HC ($p=0.003$) (Figure 7 top right).

We also found that there was a higher percentage of Torn tissue in the brain blocks fixed with SSS, but this did not retain significance after a Bonferroni correction (Figure 7 bottom left). The histology sections processed with IHC without AR (median=3.24, range 0.82-23.60) showed significantly less Folded tissue than sections processed with HC (median=4.13, range 0-25.57, $p=0.027$) and with IHC with AR (median=5.08, range=1.35-71.40, $p=0.004$) (Figure 7 bottom right).

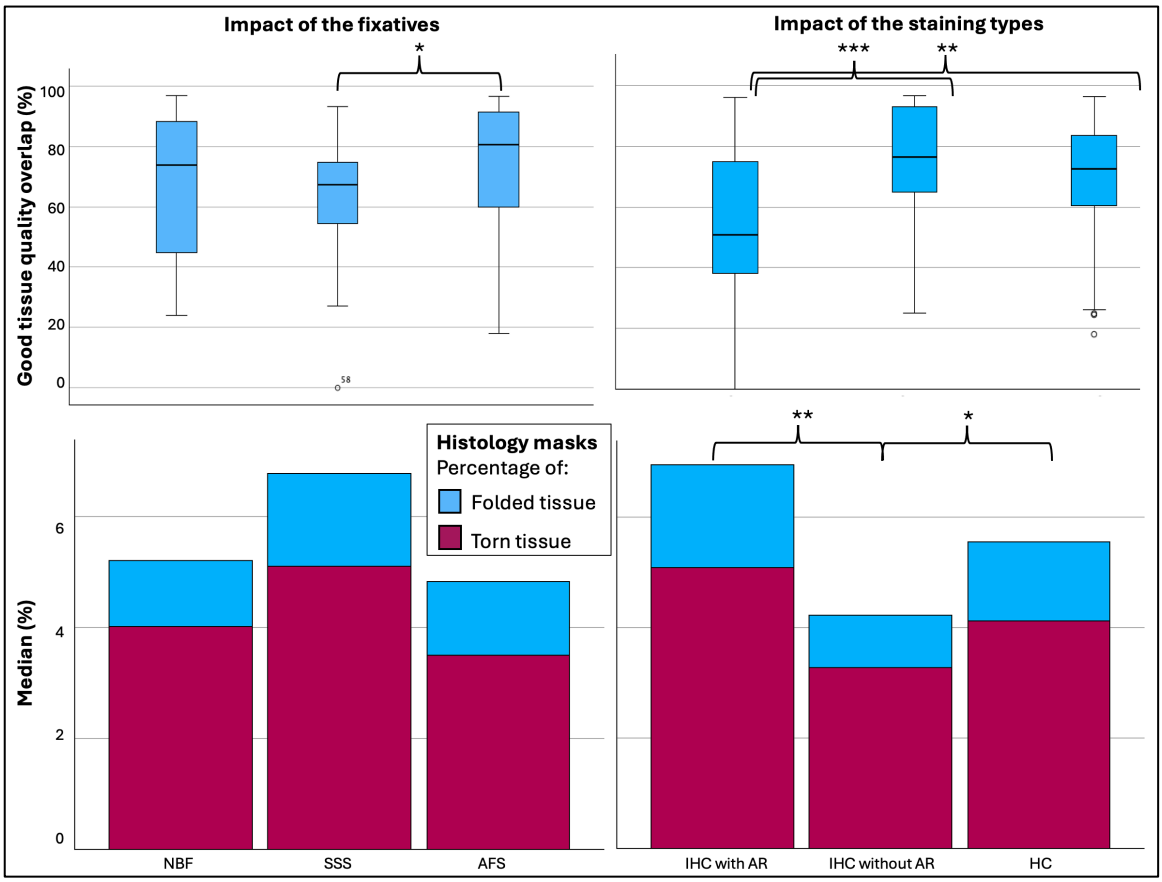


Figure 7. Tissue block-MRI-histology overlap of the masks to assess colocalization. Left graphs show the impact of the fixative (NBF=Neutral-buffered formalin; SSS=Saturated salt solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution) on the percentage of the Good quality tissue overlap (top) and the Median percentage of Folded (blue) and Torn (purple) tissue (bottom). Right graphs show the impact of the staining type (IHC=Immunohistochemistry; AR=Antigen retrieval; HC=

Histochemistry) on the percentage of the Good quality tissue overlap (top) and the median percentage of Folded (blue) and Torn (purple) tissue (bottom). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

4.6 Discussion

This study aimed to describe the quality of linear registration between histology sections and MRI in human brain blocks fixed with three solutions, and in histology sections that were processed with different staining types to provide new insights on registration protocols of brain blocks from gross anatomy laboratories.

4.6.1 Histology quality

4.6.1.1 Staining intensity

Since we had previously found slight differences in the background staining intensity of mice brains fixed with SSS,[9] we assessed intensity of the background staining on a scale of pale to dark. Although we acknowledge that a higher staining intensity doesn't always reflect a good histology quality, we wanted to assess the staining intensity as it could impact the visibility of the landmarks on the histology sections, consequently affecting the registration quality, and not to assess the cell preservation. In microscopic cellular assessment, an increased staining intensity would not be ideal since it hides the contrast between the cells and the background. However, for registration purposes, there is a degree of staining intensity that must be dark enough to allow for landmark visualization to put the tags but also pale enough to still see the contrast with the cells for further biological analysis. Here, we found a higher frequency of Dark sections (which helps the rater placing the tags for the manual linear registration to decide on the landmarks that will be selected) in the blocks fixed with the three solutions, reflecting no impact of the chemical composition of the different solutions on the staining background when considered altogether (Figure 5, top left). However, SSS-fixed brains showed a higher number of Heterogeneous sections and lower Dark sections when processed with IHC with AR, while more Pale sections were also observed when processed with IHC without AR in these cases. Therefore, staining intensity of immunohistochemistry procedures seems to be affected more in SSS samples. This is in

accordance with the fact that SSS-fixed brains showed less homogeneous distribution of the antigens of interest (perhaps less staining intensity) in our previous study.[10]

Furthermore, the staining intensity seems to be affected by the staining type. Indeed, HC showed significantly more Dark sections, which was expected as our previous assessments had also shown strong labeling and no impact of fixative.[10] Furthermore, antigenicity preservation (and therefore staining intensity) was not homogeneous between the antibodies and the fixatives.[10] Our results showed that IHC without AR have significantly more sections with both pale and dark backgrounds, especially when fixed with NBF, while IHC with AR showed more Heterogeneous sections, especially when fixed with SSS. This could be caused by the fact that AR increases antigen staining but also may decrease in some cases non-specific background labeling.[10, 35-37]

4.6.1.2 Gray matter to white matter contrast

Gray to white matter contrast was also assessed since it could have an impact on the chosen landmarks and therefore on the registration quality. We found that SSS-fixed brain blocks showed a higher number of sections with Blurred contrast compared to the other solutions, especially when they were processed with IHC without an antigen retrieval protocol. This was consistent with our previous observations showing a slightly lower contrast of the MRIs in SSS-fixed brains.[12] This is also consistent with previous findings in histochemical sections where SSS-fixed brains showed paler neurons in Cresyl violet stain, heterogeneous fibers in Luxol fast blue, and lower quality in Bielschowsky's staining, as well as lower antigenicity distribution without AR.[10] GM-WM contrast was also affected by the staining type, where IHC without AR showed more sections without contrast. Again, this is because AR increases the labeling of the cells and therefore shows a higher differentiation between gray and white matter layers, otherwise this is lacking when no antigen retrieval is applied to the procedure.

4.6.2 Registration quality

The number of tags that were used to manually register the T2-TurboRARE sequence with histology sections was significantly different in the brains fixed with the three solutions. AFS and NBF-fixed blocks required fewer tags than the SSS-fixed blocks, reflecting a more difficult registration with the latter. This is consistent with our previous findings that SSS-fixed tissue is

more friable and difficult to manipulate than the other fixatives, resulting in more tears and folding of the tissue,[10] and therefore more distortions compared to the MRI sections. This is also supported by our quantitative analysis of the percentage of Good quality tissue masks, where we found that SSS-fixed blocks showed less overlap with the tissue block masks than AFS-fixed sections, and that a higher percentage of Torn tissue was found in the SSS-fixed brains. Although this latter statement did not retain statistical significance, it was again consistent with previous qualitative findings of our team.[10]

Regarding the relation between registration quality and the staining types, we found no difference in the number of tags required to initiate manual alignment between the three solutions. However, we found a higher Good tissue quality overlap and less Folded and Torn tissue in the histology sections that were processed with IHC without an antigen retrieval protocol. Indeed, we expected that it would be more difficult to register the sections when an AR protocol was conducted prior to IHC since it is known to enhance tissue tearing and tissue loss.[10,38] However, AR staining being darker (higher contrast with the cells which resulted in a higher GM-WM contrast), it was unexpectedly easy to put the tags in most cases, since it enhanced the visibility of the landmarks. Therefore, we suggest using an AR protocol in IHC even if this results in a more difficult manipulation of the sections, since it also results in a better staining and therefore, better correlates with MRI findings.

4.6.3 Groups of comparison

4.6.3.1 Fixatives

Immersion of freshly extracted brains in 10% NBF is a ubiquitous fixation protocol in brain banks.[8,34] This is currently coined as the control group since neuroscientific findings have been made with these brains so far. However, NBF solution is not ideal for anatomy dissection and also show inconveniences in histology and MRIs since the surface of the brain shows signs of over-fixation, while the deep white matter and nucleus is more poorly preserved.[39,40] Furthermore, brain banks offer very few and small tissue samples to researchers, so we suggest that brains from anatomy laboratories may be used as an alternative. Moreover, perfusion fixation with NBF is feasible,[41] and can be combined with perfusing the rest of the body with another solution.[42] This

would allow the adequate preparation of cadaveric specimens for gross dissection and surgical training along with optimal brain preservation for histochemical and immunohistochemical processing. However, practices in multiple anatomy laboratories are not yet ideal and use alcohol-formaldehyde solutions and salt-saturated solution as alternatives.

Our results support that the alcohol-formaldehyde solution provides a good alternative for fixation, since it preserves brain MRI contrasts,[11,12] histology quality and manual registration of both modalities in a good manner, as well as for combining gross anatomy dissection and histology assessment of different tissues.[43-50]

Conversely, SSS-fixed brains are of lesser quality, impacting the registration of MRI and histology images, although still feasible and of sufficient quality. These brain blocks require greater care in manipulation and histology protocols to achieve registration results closer to those obtained with the other two solutions. This is probably due to the lower amount of formaldehyde in its formulation,[51] leading to a poorer preservation of the tissue integrity, as explained in our previous findings.[10]

4.6.3.2 Staining type

IHC without AR group included the 4 labeled sections per specimen (NeuN, GFAP, Iba1 and PLP) that did not go through an AR procedure, while IHC with AR did. We decided to separate these two groups since we considered that heat-induced antigen retrieval could impact: 1-GM-WM contrast and staining intensity and 2-tears and folding of the tissue as we observed in a previous study of our group.[10] Furthermore, we chose to include 4 IHC stains (NeuN, GFAP, Iba1, and PLP) to label the main brain cell populations (i.e., neurons, astrocytes, microglia and myelin), which are commonly used in histopathology diagnosis, using protocols already validated for the three solutions in our previous study, which made this new assessment more robust.[10]

The HC protocols included the two levels of sections using five different stains (i.e., ten slices per specimen), to label: 1-the endoplasmic reticulum and cellular nuclei, which stained cell bodies of neurons and glial cells, using a Cresyl Violet and a Neutral red staining[52]; 2-the myelin of oligodendrocytes using Luxol Fast Blue[53], frequently used in multiple sclerosis, Alzheimer's disease or cerebrovascular diseases[17,24,26-28,30-32,54-56]; 3-the ferric iron aggregation in the neuropil

of the brain, using a Prussian blue staining (Perl's stain),[57-59] commonly used in different white matter pathologies detected by MRI, or again, neurodegenerative diseases[28,60-64]; 4-the nerve fibers and neurofibrils using Bielschowsky's silver staining method,[65] used typically to demonstrate axonal tangles and senile plaques,[66-73] and 5-the cell bodies and small capillaries using H&E staining, the most common histopathological stain used in diagnosis of neuropathology.[26,27,29,54,61,72,74-76] HC stains seem generally more robust than IHC, giving the highest staining intensity and sharpest GM-WM contrast. This can be related to the fact that antigens and epitopes recognition, which can be modified by cross-linking of the proteins related to chemical fixation, is not involved in these HC staining protocols.

4.6.4 Limitations

We acknowledge that this study was conducted with a small convenience sample. Therefore, all statistical results should be mostly considered as descriptively informative. Our approach did not cut the full 3 cm thick block, since this would have demanded the analysis of 750 sections per block, which is unfeasible and prohibitively costly, at the moment, for our laboratory. This limited our registration to a 3D-MRI to 2D-histology approach, instead of also allowing a 3D-histology reconstruction to later perform a 3D-to-3D registration. Nonetheless, our 4 blocks per fixative resulted in 9 stains per blocks * 12 = 120 stains and their subsequent registrations. The samples were heterogeneous in terms of the cause of death, the *post-mortem* delay, and the cortical area; however, we always took neocortex and subcortical WM for all the blocks.

We agree that the use of only cGM and scWM in our tissue blocks of interest limits the applicability of the findings, as subcortical regions could potentially be impacted differently by fixation. Future studies focusing on deep structures will assess similar variables as those analysed in this study. We have started testing deep structures in one SSS-fixed specimen, showing the feasibility of registration of MRI and histology of a subcortical block of tissue (including caudate nucleus, periventricular white matter hyperintensities and internal capsule; see Supplemental Figure 1).

The use of this heterogeneous sample may be seen as a disadvantage by most, since the control of as many variables as possible is what is generally desired when designing an experiment.

However, we consider this heterogeneity as an advantage for the general scope of our research, which is the assessment of MRI and histology feasibility in specimens of unpredictable characteristics, since we have no control on the comorbidities, causes of death, etc. of the donors that arrive to anatomy laboratories. So, this study shows that even in different circumstances and with various confounding variables, which could affect the tissue quality, registration between histology and MRI is still feasible. Finally, the small sample size resulted in heterogeneous groups of comparison regarding the staining types. It is not possible to know the impact of each antigen of interest (NeuN, GFAP, Iba1 and PLP) considered individually since they were included in the same staining type. Another limitation of this study is that our blocks were too large to be cut as they were scanned (we had to trim them to fit them in the vibratome). This resulted in an impossible direct comparison on tissue loss and colocalization between the histology and MRIs. However, we tried to overcome this issue by segmenting masks of the photographs of the tissue blocks after being trimmed, of the MRIs, and of the histology to facilitate the comparisons. Finally, we also had to deal with sections that showed Good histology results but that were off plane (Label 4 of the masks), which resulted in poor registration quality (high number of tags) since they were not cut parallel to the MRI scans (i.e., poorer orientation of the flat surface of the block on top of the lid while scanning). However, this is not a problem related to the fixative groups or the staining type, but it could have impacted the overall results. This problem could be resolved in future studies by applying an automatic nonlinear registration to the histology-MRI manual registration (Note: our in-house pipelines for automatic nonlinear registration are still under development).

4.6.5 Conclusion

We conclude that brain blocks fixed with solutions used in gross anatomy laboratories, preferably an AFS, may be used for manual linear registration of histology photomicrographs and high-resolution MRIs of the blocks, allowing to take advantage of the two most common neuroimaging modalities. This is promising for neuroscientists interested in using larger brain samples from anatomy laboratories to correlate histology findings with MRI and possibly increase knowledge on biomarkers of normal aging or neurodegenerative disease in post-mortem diagnosis.

Acknowledgements

We would like to thank the generosity of the body donors and their families for making our projects possible. We also acknowledge funding resources and the anatomy laboratory staff of the UQTR for their support and help at the lab. We would also like to thank the Cerebral Imaging Center staff (at the microscopy platform and Roqaie Moqadam) who helped in tissue management.

Data and code availability statement

We have used the MINC ToolKit developed by the Brain Imaging Center of the Montreal Neurological Institute (McGill University) which is publicly available at: https://bic-mni.github.io.

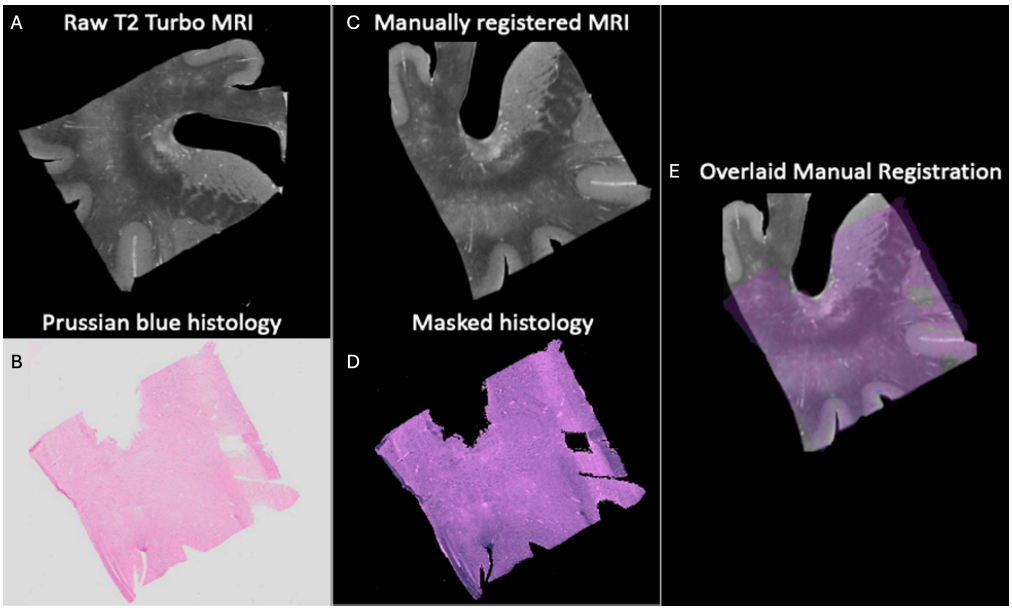
Funding sources statement

All authors are funded by the Government of Canada | Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Conflict of interest statement

The authors report no competing interests.

4.7 Supplementary material



Supplemental Figure 1. Histology-MRI registration of a brain block fixed with SSS including periventricular white matter hyperintensities, internal capsule, cortex, subcortical white

matter and head of the caudate nucleus. A) Raw T2-TurboRARE MRI sequence of the block; B) Prussian blue staining of the histologically processed block; C) T2-TurboRARE MRI manually co-registered to histology image; D) Extracted mask of the histology section; E) Co-localisation of histology and MRI modalities, showing the feasibility of registration of the two modalities in subcortical brain regions.

4.8 References

1. Feczko E, Augustinack JC, Fischl B, Dickerson BC. An MRI-based method for measuring volume, thickness and surface area of entorhinal, perirhinal, and posterior parahippocampal cortex. Neurobiol Aging. Mar 2009;30(3):420-31. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.023

2. Apostolova LG, Zarow C, Biado K, et al. Relationship between hippocampal atrophy and neuropathology markers: a 7T MRI validation study of the EADC-ADNI Harmonized Hippocampal Segmentation Protocol. Alzheimers Dement. Feb 2015;11(2):139-50. doi:10.1016/j.jalz.2015.01.001

3. Meyer CR, Moffat BA, Kuszpit KK, et al. A methodology for registration of a histological slide and in vivo MRI volume based on optimizing mutual information. Mol Imaging. Jan-Mar 2006;5(1):16-23.

4. Dadar M, Mahmoud S, Zhernovaia M, Camicioli R, Maranzano J, Duchesne S. White matter hyperintensity distribution differences in aging and neurodegenerative disease cohorts. Neuroimage Clin. 2022;36:103204. doi:10.1016/j.nicl.2022.103204

5. Cardoso JR, Pereira LM, Iversen MD, Ramos AL. What is gold standard and what is ground truth? Dental Press J Orthod. Sep-Oct 2014;19(5):27-30. doi:10.1590/2176-9451.19.5.027-030.ebo

6. Hoffmann A, Bredno J, Wendland MF, et al. Validation of in vivo magnetic resonance imaging blood-brain barrier permeability measurements by comparison with gold standard histology. Stroke. Jul 2011;42(7):2054-60. doi:10.1161/strokeaha.110.597997

7. Carlos AF, Poloni TE, Medici V, Chikhladze M, Guaita A, Ceroni M. From brain collections to modern brain banks: A historical perspective. Alzheimers Dement (N Y). 2019;5:52-60. doi:10.1016/j.trci.2018.12.002

8. Vonsattel JP, Amaya Mdel P, Cortes EP, Mancevska K, Keller CE. Twenty-first century brain banking: practical prerequisites and lessons from the past: the experience of New York Brain Bank, Taub Institute, Columbia University. Cell Tissue Bank. Sep 2008;9(3):247-58. doi:10.1007/s10561-008-9079-y

9. Frigon E-M, Dadar M, Boire D, Maranzano J. Antigenicity is preserved with fixative solutions used in human gross anatomy: A mice brain immunohistochemistry study. Original Research. Front Neuroanat. 2022-October-12 2022;16doi:10.3389/fnana.2022.957358

10. Frigon EM, Gérin-Lajoie A, Dadar M, Boire D, Maranzano J. Comparison of histological procedures and antigenicity of human post-mortem brains fixed with solutions used in gross anatomy laboratories. Front Neuroanat. 2024;18:1372953. doi:10.3389/fnana.2024.1372953

11. Frigon EM, Pharand P, Gérin-Lajoie A, et al. T1- and T2-weighted MRI signal and histology findings in suboptimally fixed human brains. J Neurosci Methods. Dec 2024;412:110301. doi:10.1016/j.jneumeth.2024.110301

12. Maranzano J, Dadar M, Bertrand-Grenier A, et al. A novel ex vivo, in situ method to study the human brain through MRI and histology. J Neurosci Methods. Nov 1 2020;345:108903. doi:10.1016/j.jneumeth.2020.108903

13. Choe AS, Gao Y, Li X, Compton KB, Stepniewska I, Anderson AW. Accuracy of image registration between MRI and light microscopy in the ex vivo brain. Magnetic Resonance Imaging. 2011/06/01/ 2011;29(5):683-692. doi:https://doi.org/10.1016/j.mri.2011.02.022

14. Goubran M, de Ribaupierre S, Hammond RR, et al. Registration of in-vivo to ex-vivo MRI of surgically resected specimens: a pipeline for histology to in-vivo registration. J Neurosci Methods. Feb 15 2015;241:53-65. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.12.005

15. Singh M, Rajagopalan A, Kim TS, et al. Co-registration of In-Vivo Human MRI Brain Images to Postmortem Histological Microscopic Images. Int J Imaging Syst Technol. 2008;18(5-6):325-335. doi:10.1002/ima.v18:5/6

16. Bobinski M, de Leon MJ, Wegiel J, et al. The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. Neuroscience. 2000;95(3):721-5. doi:10.1016/s0306-4522(99)00476-5

17. Bronge L, Bogdanovic N, Wahlund LO. Postmortem MRI and histopathology of white matter changes in Alzheimer brains. A quantitative, comparative study. Dement Geriatr Cogn Disord. 2002;13(4):205-12. doi:10.1159/000057698

18. Frigerio I, Boon BDC, Lin CP, et al. Amyloid-β, p-tau and reactive microglia are pathological correlates of MRI cortical atrophy in Alzheimer's disease. Brain Commun. 2021;3(4):fcab281. doi:10.1093/braincomms/fcab281

19. Goubran M, Crukley C, de Ribaupierre S, Peters TM, Khan AR. Image registration of ex-vivo MRI to sparsely sectioned histology of hippocampal and neocortical temporal lobe specimens. Neuroimage. Dec 2013;83:770-81. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.07.053

20. Mega MS, Chen SS, Thompson PM, et al. Mapping histology to metabolism: coregistration of stained whole-brain sections to premortem PET in Alzheimer's disease. Neuroimage. Feb 1997;5(2):147-53. doi:10.1006/nimg.1996.0255

21. Scheltens P, Barkhof F, Leys D, Wolters EC, Ravid R, Kamphorst W. Histopathologic correlates of white matter changes on MRI in Alzheimer's disease and normal aging. Neurology. May 1995;45(5):883-8. doi:10.1212/wnl.45.5.883

22. Pozorski V, Oh JM, Adluru N, et al. Longitudinal white matter microstructural change in Parkinson's disease. Hum Brain Mapp. Oct 2018;39(10):4150-4161. doi:10.1002/hbm.24239

23. Stille M, Smith EJ, Crum WR, Modo M. 3D reconstruction of 2D fluorescence histology images and registration with in vivo MR images: application in a rodent stroke model. J Neurosci Methods. Sep 30 2013;219(1):27-40. doi:10.1016/j.jneumeth.2013.06.003

24. Gouw AA, Seewann A, van der Flier WM, et al. Heterogeneity of small vessel disease: a systematic review of MRI and histopathology correlations. J Neurol Neurosurg Psychiatry. Feb 2011;82(2):126-35. doi:10.1136/jnnp.2009.204685

25. Grinberg LT, Amaro Junior E, da Silva AV, et al. Improved detection of incipient vascular changes by a biotechnological platform combining post mortem MRI in situ with neuropathology. J Neurol Sci. Aug 15 2009;283(1-2):2-8. doi:10.1016/j.jns.2009.02.327

26. Humphreys CA, Jansen MA, Muñoz Maniega S, et al. A protocol for precise comparisons of small vessel disease lesions between ex vivo magnetic resonance imaging and histopathology. Int J Stroke. Apr 2019;14(3):310-320. doi:10.1177/1747493018799962

27. Lahna D, Roese N, Woltjer R, et al. Postmortem 7T MRI for guided histopathology and evaluation of cerebrovascular disease. J Neuropathol Exp Neurol. Dec 19 2022;82(1):57-70. doi:10.1093/jnen/nlac103

28. Roseborough AD, Langdon KD, Hammond R, et al. Post-mortem 7 Tesla MRI detection of white matter hyperintensities: A multidisciplinary voxel-wise comparison of imaging and histological correlates. NeuroImage: Clinical. 2020/01/01/ 2020;27:102340. doi:https://doi.org/10.1016/j.nicl.2020.102340

29. Solé-Guardia G, Custers E, de Lange A, et al. Association between hypertension and neurovascular inflammation in both normal-appearing white matter and white matter hyperintensities. Acta Neuropathol Commun. Jan 4 2023;11(1):2. doi:10.1186/s40478-022-01497-3

30. Filippi M, Brück W, Chard D, et al. Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. Lancet Neurol. Feb 2019;18(2):198-210. doi:10.1016/s1474-4422(18)30451-4

31. Laule C, Kozlowski P, Leung E, Li DK, Mackay AL, Moore GR. Myelin water imaging of multiple sclerosis at 7 T: correlations with histopathology. Neuroimage. May 1 2008;40(4):1575-80. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.12.008

32. Laule C, Moore GRW. Myelin water imaging to detect demyelination and remyelination and its validation in pathology. Brain Pathol. Sep 2018;28(5):750-764. doi:10.1111/bpa.12645

33. Moll NM, Rietsch AM, Thomas S, et al. Multiple sclerosis normal-appearing white matter: pathology-imaging correlations. Ann Neurol. Nov 2011;70(5):764-73. doi:10.1002/ana.22521

34. Dadar M, Sanches LG, Fouquet J, et al. The Douglas-Bell Canada Brain Bank Post-mortem Brain Imaging Protocol. Apuerture Neuro. 2024;4doi:https://doi.org/10.52294/001c.123347

35. Krenacs L, Krenacs T, Stelkovics E, Raffeld M. Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. Methods Mol Biol. 2010;588:103-19. doi:10.1007/978-1-59745-324-0_14

36. Shi SR, Liu C, Pootrakul L, et al. Evaluation of the value of frozen tissue section used as "gold standard" for immunohistochemistry. Am J Clin Pathol. Mar 2008;129(3):358-66. doi:10.1309/7cxuyxt23e5al8kq

37. Shi SR, Shi Y, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. J Histochem Cytochem. Jan 2011;59(1):13-32. doi:10.1369/jhc.2010.957191

38. Evers P, Uylings HB, Suurmeijer AJ. Antigen retrieval in formaldehyde-fixed human brain tissue. Methods. Jun 1998;15(2):133-40. doi:10.1006/meth.1998.0616

39. Garman RH. Artifacts in routinely immersion fixed nervous tissue. Toxicol Pathol. 1990;18(1 Pt 2):149-53. doi:10.1177/019262339001800120

40. Beach TG, Tago H, Nagai T, Kimura H, McGeer PL, McGeer EG. Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation. J Neurosci Methods. Mar 1987;19(3):183-92. doi:10.1016/s0165-0270(87)80001-8

41. McFadden WC, Walsh H, Richter F, et al. Perfusion fixation in brain banking: a systematic review. Acta Neuropathol Commun. Sep 5 2019;7(1):146. doi:10.1186/s40478-019-0799-y

42. Insausti R, Insausti AM, Muñoz López M, et al. Ex vivo, in situ perfusion protocol for human brain fixation compatible with microscopy, MRI techniques, and anatomical studies. Methods. Front Neuroanat. 2023-March-23 2023;17doi:10.3389/fnana.2023.1149674

43. Venne G, Zec ML, Welte L, Noel G. Qualitative and quantitative comparison of Thiel and phenol-based soft-embalmed cadavers for surgery training. Anat Histol Embryol. May 2020;49(3):372-381. doi:10.1111/ahe.12539

44. Tomalty D, Pang SC, Ellis RE. Preservation of neural tissue with a formaldehyde-free phenol-based embalming protocol. Clin Anat. Mar 2019;32(2):224-230. doi:10.1002/ca.23290

45. Rahman SMN, Alam T, Alam NN. Preservation of Histology by Phenol-Based Fixative: Mini Review of Recent Findings %J International Journal of Morphology. 2021;39:50-56.

46. O'Sullivan E, Mitchell BS. An improved composition for embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching in the United Kingdom. J Anat. Apr 1993;182 (Pt 2)(Pt 2):295-7.

47. Martins-Costa C, Nunes TC, Anjos-Ramos LD. Anatomo-comparative study of formaldehyde, alcohol, and saturated salt solution as fixatives in Wistar rat brains. Anat Histol Embryol. Nov 2022;51(6):740-745. doi:10.1111/ahe.12852

48. Hopwood D, Slidders W, Yeaman GR. Tissue fixation with phenol-formaldehyde for routine histopathology. Histochem J. Apr 1989;21(4):228-34. doi:10.1007/bf01747525

49. Benet A, Rincon-Torroella J, Lawton MT, González Sánchez JJ. Novel embalming solution for neurosurgical simulation in cadavers. J Neurosurg. May 2014;120(5):1229-37. doi:10.3171/2014.1.Jns131857

50. Barton DP, Davies DC, Mahadevan V, et al. Dissection of soft-preserved cadavers in the training of gynaecological oncologists: report of the first UK workshop. Gynecol Oncol. Jun 2009;113(3):352-6. doi:10.1016/j.ygyno.2009.02.012

51. Coleman R, Kogan I. An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. J Anat. Apr 1998;192 (Pt 3)(Pt 3):443-6. doi:10.1046/j.1469-7580.1998.19230443.x

52. Eilam-Altstädter R, Las L, Witter MP, Ulanovsky N. Methods. In: Eilam-Altstädter R, Las L, Witter MP, Ulanovsky N, eds. Stereotaxic Brain Atlas of the Egyptian Fruit Bat. Academic Press; 2021:1-9.

53. Lindberg MR, Lamps LW. Central Nervous System. In: Lindberg MR, Lamps LW, eds. Diagnostic Pathology: Normal Histology (Second Edition). Elsevier; 2018:108-111.

54. Li K, Rashid T, Li J, et al. Postmortem Brain Imaging in Alzheimer's Disease and Related Dementias: The South Texas Alzheimer's Disease Research Center Repository. J Alzheimers Dis. 2023;96(3):1267-1283. doi:10.3233/jad-230389

55. Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Brück W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. Acta Neuropathol. Jan 2017;133(1):13-24. doi:10.1007/s00401-016-1653-y

56. Ouellette R, Mangeat G, Polyak I, et al. Validation of Rapid Magnetic Resonance Myelin Imaging in Multiple Sclerosis. Ann Neurol. May 2020;87(5):710-724. doi:10.1002/ana.25705

57. Churukian CJ. 14 - Pigments and Minerals. In: Bancroft JD, Gamble M, eds. Theory and Practice of Histological Techniques (Sixth Edition). Churchill Livingstone; 2008:233-259.

58. Guindi M. 11 - Liver Disease in Iron Overload. In: Saxena R, ed. Practical Hepatic Pathology: a Diagnostic Approach (Second Edition). Elsevier; 2018:151-165.

59. Xiao G, Li H, Zhao M, Zhou B. Chapter Eight - Assessing metal ion transporting activity of ZIPs: Intracellular zinc and iron detection. In: Hu J, ed. Methods in Enzymology. Academic Press; 2023:157-184.

60. Connor JR, Benkovic SA. Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical, and molecular considerations. Ann Neurol. 1992;32 Suppl:S51-61. doi:10.1002/ana.410320710

61. Kruer MC. The neuropathology of neurodegeneration with brain iron accumulation. Int Rev Neurobiol. 2013;110:165-94. doi:10.1016/b978-0-12-410502-7.00009-0

62. Dusek P, Hofer T, Alexander J, Roos PM, Aaseth JO. Cerebral Iron Deposition in Neurodegeneration. Biomolecules. May 17 2022;12(5)doi:10.3390/biom12050714

63. Stüber C, Morawski M, Schäfer A, et al. Myelin and iron concentration in the human brain: a quantitative study of MRI contrast. Neuroimage. Jun 2014;93 Pt 1:95-106. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.02.026

64. van Duijn S, Nabuurs RJ, van Duinen SG, Natté R. Comparison of histological techniques to visualize iron in paraffin-embedded brain tissue of patients with Alzheimer's disease. J Histochem Cytochem. Nov 2013;61(11):785-92. doi:10.1369/0022155413501325

65. Ogawa Y. Silver Impregnation Method for Neurons Using Synthetic Surfactants: A Contribution to Golgi Method. In: Conn PM, ed. Quantitative and Qualitative Microscopy. Methods in Neurosciences; 1990:chap STAINING TECHNOLOGY.

66. Stahnisch FW. Max Bielschowsky (1869-1940). J Neurol. Mar 2015;262(3):792-4. doi:10.1007/s00415-014-7544-z

67. Wisniewski HM, Wen GY, Kim KS. Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques. Acta Neuropathol. 1989;78(1):22-7. doi:10.1007/bf00687398

68. Love S, Nicoll JA. Comparison of modified Bielschowsky silver impregnation and anti-ubiquitin immunostaining of cortical and nigral Lewy bodies. Neuropathol Appl Neurobiol. Dec 1992;18(6):585-92. doi:10.1111/j.1365-2990.1992.tb00830.x

69. Allsop D. Introduction to Alzheimer's disease. Methods Mol Med. 2000;32:1-21. doi:10.1385/1-59259-195-7:1

70. Switzer RC, 3rd. Application of silver degeneration stains for neurotoxicity testing. Toxicol Pathol. Jan-Feb 2000;28(1):70-83. doi:10.1177/019262330002800109

71. Uchihara T. Silver diagnosis in neuropathology: principles, practice and revised interpretation. Acta Neuropathol. May 2007;113(5):483-99. doi:10.1007/s00401-007-0200-2

72. Kovacs GG, Budka H. Current concepts of neuropathological diagnostics in practice: neurodegenerative diseases. Clin Neuropathol. Sep-Oct 2010;29(5):271-88. doi:10.5414/npp29271

73. Elobeid A, Rantakömi S, Soininen H, Alafuzoff I. Alzheimer's disease-related plaques in nondemented subjects. Alzheimers Dement. Sep 2014;10(5):522-9. doi:10.1016/j.jalz.2012.12.009

74. Vakrakou AG, Brinia ME, Svolaki I, Argyrakos T, Stefanis L, Kilidireas C. Immunopathology of Tumefactive Demyelinating Lesions-From Idiopathic to Drug-Related Cases. Front Neurol. 2022;13:868525. doi:10.3389/fneur.2022.868525

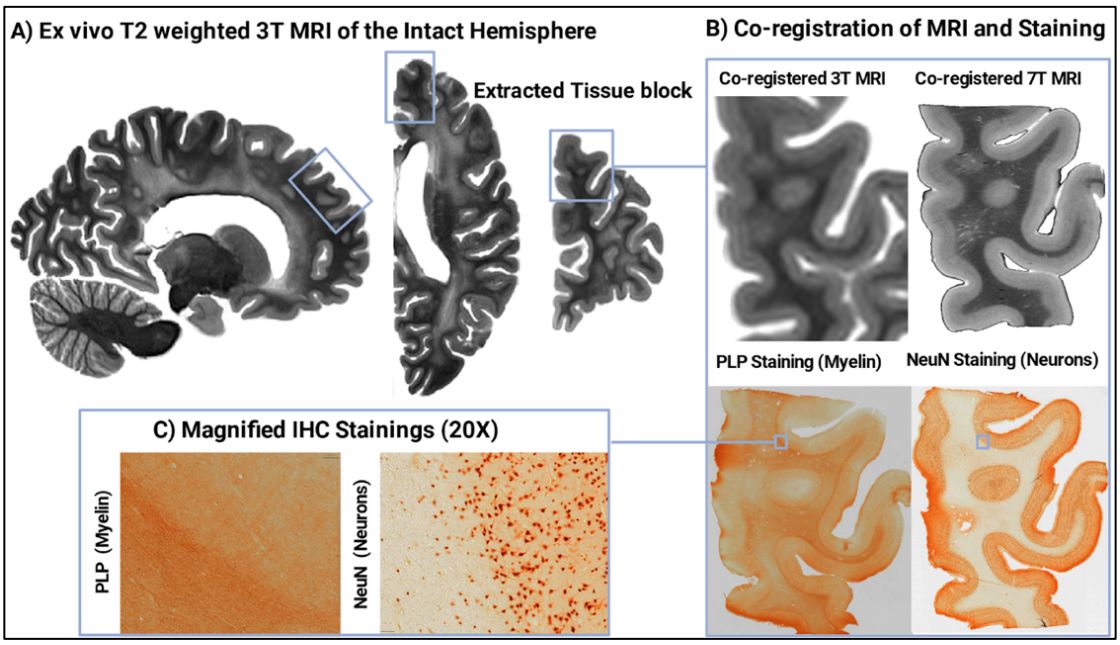
75. Beach TG, Sue LI, Scott S, et al. Cerebral white matter rarefaction has both neurodegenerative and vascular causes and may primarily be a distal axonopathy. J Neuropathol Exp Neurol. May 25 2023;82(6):457-466. doi:10.1093/jnen/nlad026

76. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. CSH Protoc. May 1 2008;2008:pdb.prot4986. doi:10.1101/pdb.prot4986

4.9 Résultats préliminaires supplémentaires

En complément à l'article présenté dans ce chapitre 4, ces résultats préliminaires montrent le recalage entre l'histologie et l'IRM de certains cas neuropathologiques obtenus de la DBCBB et de l'UQTR. Ces résultats ont été présentés au congrès de la *Organization for Human Brain Mapping 2023* et au *Quantitative MRI conference (McGill University) – Validation of quantitative MRI techniques in neurodegeneration in November 2023*[21].

Le recalage de l'histologie vers l'IRM 3T *ex vivo ex situ* a été réalisé sur un cerveau atteint de sclérose latérale amyotrophique fixé avec la SFA (Figure 16) et sur un cerveau vieillissant normal fixé avec la SSS (Figure 17). Le protocole de recalage entre l'histologie et l'IRM 3T requiert l'étape intermédiaire de recalage entre l'histologie et l'IRM 7T du bloc. Cependant, le but ultime est de pouvoir recaler l'histologie à des scans de cerveaux *ex situ*, et ensuite *in situ*, pour se rapprocher le plus possible d'un potentiel outil diagnostic de validation de scans d'IRM *in vivo* avec l'histologie. Les figures suivantes montrent la faisabilité et le processus du recalage entre l'histologie, l'IRM du bloc 7T et l'IRM 3T de l'hémisphère complet, ainsi que des résultats préliminaires de colocalisation entre l'histologie et l'IRM sur des cerveaux pathologiques.



[21] https://www.youtube.com/watch?v=15uHPP638Vc

Figure 16. – Processus de recalage entre l'IRM et l'histologie. A) Séquence T2-pondérée d'un hémisphère scanné *ex situ* avec un scanneur 3T. B) Recalage de l'IRM du bloc 7T vers l'IRM 3T, et de l'histologie à l'IRM 7T. C) Colocalisation des cellules de la myéline (PLP) et des corps cellulaires neuronaux (NeuN). Figure tirée de la demande de bourse post-doctorale #361834 au FRQS octroyée avec un DOI https://doi.org/10.69777/361834.

Dans un cerveau fixé avec la SSS, la séquence T2 structurelle a montré des HMB (Figure 17A). Celles-ci sont visibles en majorité autour des ventricules, et sont des lésions associées à une diminution de la densité de myéline, présentes dans différents types de démence, dans des cerveaux atteints de maladies cérébrovasculaires, mais aussi dans des cerveaux vieillissants normaux (Dadar et al., 2017; Debette & Markus, 2010; Lee et al., 2016; Roseborough et al., 2020; Solé-Guardia et al., 2023; T. Wang et al., 2021; Wardlaw et al., 2015).

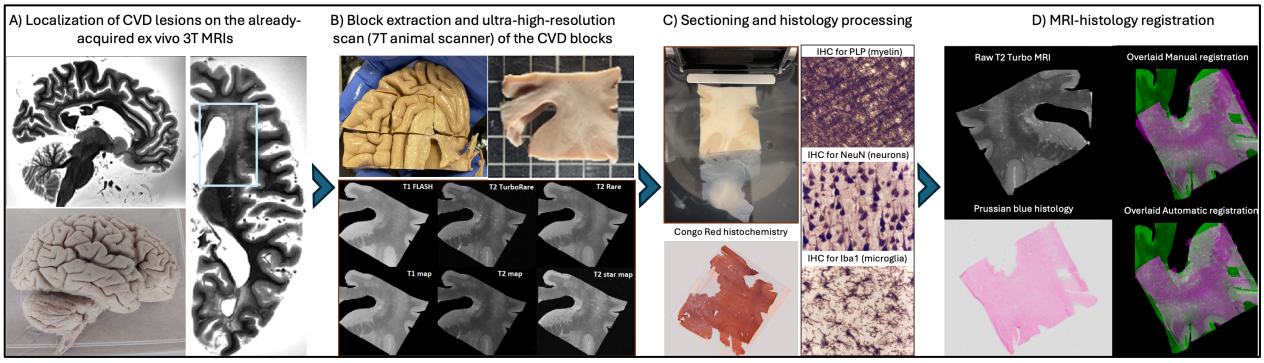


Figure 17. – Processus de recalage entre l'histologie et l'IRM. A) Lésions de HMB visibles sur la séquence T2-pondérée d'un scan d'un hémisphère cérébral droit. B) Coupe du bloc de tissu périventriculaire de la corne frontale du ventricule latéral et acquisition de l'IRM 7T à ultra-haute résolution. C) Coupe de bloc au vibratome et colorations histologiques afin de marquer les différentes cellules d'intérêt. D) Recalage entre l'IRM et l'histologie. Figure tirée de la demande de bourse post-doctorale #361834 au FRQS octroyée avec un DOI https://doi.org/10.69777/361834.

Lors de l'analyse microscopique des coupes colorées, les régions d'accumulation de fer sous forme d'hémosidérine (points bleus visibles dans la coloration de PB) (Figure 18B) ont été co-localisés avec des petites régions ponctiformes hypointenses, dans un fond de HMB, visibles sur la séquence T2* (Figure 18A) (séquence susceptible au fer (De Barros et al., 2019). Le recalage de

l'histologie et de l'IRM de ce bloc démontre que les lésions observées au préalable sur l'IRM 3T de l'hémisphère *ex situ* sont liés à une accumulation de fer (Figure 18C), un indicateur pathologique de maladie de petits vaisseaux (Dusek et al., 2022; Kruer, 2013).

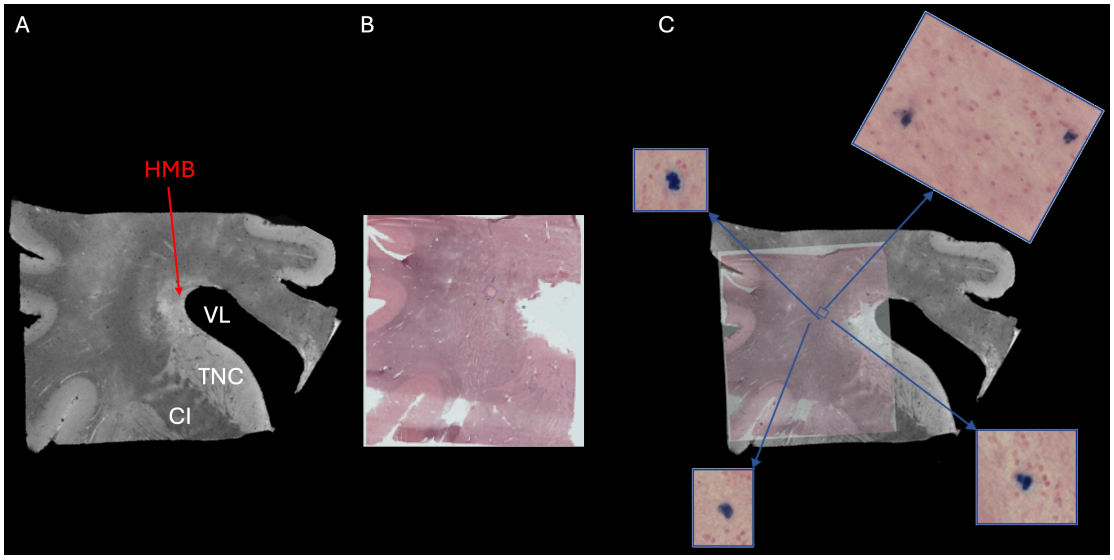


Figure 18. – Colocalisation entre l'hyperintensité de la matière blanche et des régions ponctiformes hypointenses qui représentent l'accumulation d'hémosidérine observée par histologie. A) HMB observées sur une séquence T2*.VL=Ventricule latéral; TNC=Tête du noyau caudé; CI=Capsule interne. B) Image de coloration de PB recalée à l'IRM, qui marque les noyaux cellulaires en rose et le l'hémosidérine du fer en bleu. C) Superposition des deux modalités et colocalisation des amas de fer.

Chapitre 5 – Article 4 – Comparison of T1- and T2-weighted MRI contrasts of *ex vivo ex situ* brains fixed with solutions used in gross anatomy laboratories

5.1 Préface

Ce chapitre inclut le quatrième article de cette thèse qui fait l'objet d'un article original qui a été soumis le 13 octobre 2025 dans la revue Magnetic Resonance in Medicine pour révision par les pairs. Après un premier tour de commentaires émis par un comité composé de trois réviseurs, nous avons soumis une version révisée du manuscrit dans le journal Aperture Neuro le 10 janvier 2026. Le but de ce projet était d'évaluer la qualité du signal d'IRM de séquences structurelles pondérées en T1 et en T2 dans des hémisphères fixés avec des solutions utilisées dans les laboratoires d'anatomie humaine, basé sur des protocoles d'IRM développés à partir d'hémisphères de la banque de cerveaux Douglas fixés au formaldéhyde.

Cet article a été soumis pour publication comme :

Frigon EM, Perreault V, Gérin-Lajoie A, Guerra Sanches L, Moqadam R, Zeighami Y, Boire D, Dadar M, Maranzano J. Comparison of T1- and T2-weighted MRI contrasts of *ex vivo ex situ* brains fixed with solutions used in gross anatomy laboratories. *Aperture Neuro*.

Aussi disponible dans BioRxiv comme :

Frigon EM, Perreault V, Gérin-Lajoie A, Guerra Sanches L, Moqadam R, Zeighami Y, Boire D, Dadar M, Maranzano J. (2025) Comparison of T1- and T2-weighted MRI contrasts of *ex vivo ex situ* brains fixed with solutions used in gross anatomy laboratories. *BioRxiv.* DOI :10.1101/2025.10.13.682071.

5.1.1 Contribution des auteurs

Eve-Marie Frigon : Conception et devis de recherche, collecte de données, protocoles expérimentaux, organisation des données, analyses des données, écriture du manuscrit.

Victoria Perreault : Protocoles expérimentaux, révision du manuscrit.

Amy Gérin-Lajoie : Aide technique, révision du manuscrit.

Liana Guerra Sanches : Mise au point des protocoles expérimentaux, révision du manuscrit.

Roqaie Moqadam : Aide technique, révision du manuscrit.

Yashar Zeighami : Ressource, révision du manuscrit.

Denis Boire : Ressources, révision du manuscrit.

Mahsa Dadar : Conception et devis de recherche, ressources, analyse des données, révision du manuscrit.

Josefina Maranzano : Conception et devis de recherche, ressources, analyses des données, écriture du manuscrit.

5.1.2 Contribution scientifique

Cette étude a été soumise pour publication en libre accès dans un journal où la communauté scientifique pourra utiliser les protocoles d'IRM *ex vivo ex situ* d'hémisphères cérébraux qui ont été développés sur des cerveaux post-mortem. Cette communication permet de conclure que des analyses par IRM sont envisageables même lorsque les cerveaux sont fixés avec d'autres solutions, malgré que les contrastes de gris entre la matière blanche, la matière grise et les noyaux gris centraux soient différents.

5.2 Abstract

Post-mortem magnetic resonance imaging (MRI) offers high resolution and histological correlation, so protocols have been developed by brain banks using hemispheres fixed by immersion in Neutral-buffered formalin (NBF), but they provide limited tissue samples. Conversely, anatomy laboratories could supply complete brains perfused either with a salt-saturated (SSS) or an alcohol-formaldehyde (AFS) solution. These fixation methods alter the brain's molecular properties, potentially affecting MRI quality and structural characteristics. T1- and T2-weighted (T1w, T2w) contrasts change with NBF fixation, but the effects of SSS or AFS remain unknown. We compared T1w and T2w intensities of different regions of interest, including subcortical white matter (WM), cortical and deep gray matter (GM), in brains fixed with NBF, SSS

and AFS. We scanned 20 ex situ hemispheres (NBF-immersed=7; SSS-perfused=7; AFS-perfused=6) in a 3T MRI scanner using T1w (0.7mm3) and T2w (0.64mm3) sequences. Mean intensities of 29 regions in T1w and T2w MRIs and GM-WM ratios were calculated and compared in brains fixed with the three solutions. We found that T1w images were more affected by the fixation process, inverting the contrast of in vivo T1w and reducing the GM-WM contrast in AFS-fixed brains. T2w images resembled in vivo scans and maintained a sharp contrast in brains fixed with the three solutions, although the GM-WM intensity ratios were lowered in SSS-fixed brains. Therefore, brains fixed with SSS and AFS from anatomy laboratories could be used for MRI studies, especially with the T2w sequence that seems more appropriate for structural analyses in different ROIs.

Keywords: magnetic resonance imaging, T1-weighted, T2-weighted, contrast, intensity, fixation, human brain, gray matter, white matter

5.3 Introduction

Magnetic resonance imaging (MRI) techniques are widely used *in vivo* to assess the main tissue types of the brain, namely gray matter (GM) (either cortical GM [cGM] or deep GM [dGM]) and white matter (WM) [1]. MRI reveals intensity changes in different GM and WM structures during normal or pathological aging [2-4]. MRI of post-mortem brains offers advantages over *in vivo* analyses, notably its direct association with histology that remains the Gold Standard method for validation of MRI findings [5, 6]. Indeed, histology shows the cellular and molecular composition of the corresponding MRI signal in normal GM and WM regions as well as in lesions observed in neuropathology [7-9]. Furthermore, without time constraints or artifacts associated with patient movement, it is possible to obtain higher resolution and quality of the images [10-14].

For *ex vivo* studies, brain tissue is generally provided by brain banks, which separate the two hemispheres sagittally, one of which is frozen and the other immersed in neutral-buffered formalin (NBF). Brain banks usually provide researchers with few and small tissue samples from the chemically fixed hemisphere, limiting MRI studies that require full brains. As such, anatomy laboratories could become a potential source of full brains for neuroscientists, but these are fixed by whole-body perfusion with solutions commonly used for gross-anatomy labs, such as a salt-

saturated solution (SSS) or an alcohol-formaldehyde solution (AFS). In perfusion fixation, the fixative diffuses from the vessels, which are distributed throughout the brain parenchyma, resulting in distinct patterns of fixation, while in immersion, the fixative diffuses only from the surface to the center of the brain [15]. This may produce a poorer fixation of deep cerebral structures, such as dGM nuclei, and over-fixation of superficial regions such as cGM and subcortical WM (scWM) [15, 16]. In addition, even if SSS and AFS affect the cellular and molecular properties of brain tissue, our previous work has shown that these brains may still be used for neuroscientific research that uses histology procedures [17, 18] and MRI [30, 34].

Prior work, including ours, has made significant progress in developing MRI protocols for scanning *ex vivo ex situ* cerebral hemispheres fixed with NBF [10, 12, 14, 19], showing an impact of NBF fixation on T1- and T2-weighted (T1w, T2w) tissue contrasts. NBF changes the molecular properties of post-mortem tissue and consequently MRI intensities and relaxation times longitudinally as the fixative diffuses into the brain [20-24]. Furthermore, changes in voxel intensities (because of chemical fixation) may affect, for example, the volumetric estimation of structures measured by intensity-based segmentation protocols [27, 28]. Specifically, post-mortem NBF-fixed brains show an inverted T1w cGM-WM contrast, while T2w contrasts are not significantly affected and resemble *in vivo* scans [10, 29, 30]. Consequently, it is to be expected that brains fixed with anatomy laboratory solutions (i.e., SSS and AFS) would show similar changes of GM and WM contrasts on MRI. To the best of our knowledge, there are no studies on the impact of different fixative solutions on MRI T1w or T2w intensities and their suitability for *ex vivo ex situ* MRI studies. In this study, we examine whether brains fixed in anatomy laboratories with two different chemical solutions (i.e, SSS, or AFS) show voxel intensities comparable to those of brains fixed by immersion in NBF across multiple regions of interest (ROIs).

5.4 Methods

5.4.1 Population

We used a convenience sample of 13 *ex situ* human brain hemispheres from the body donation program of the Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR) (SSS: N=7; AFS: N=6) that were fixed

in situ by whole-body perfusion. We also obtained 7 specimens from the Douglas-Bell Canada Brain Bank (DBCBB), fixed *ex situ* by immersion in NBF, and matched, as closely as possible, for age, PMI, and FL. Prior to their death, donors consented to the donation of their body for teaching and research purposes, and to the sharing of their medical information. This study was approved by UQTR's Ethic Subcommittee on Anatomical Teaching and Research and by the Douglas Research Centre Ethic Committee (McGill University, Montreal). The donor's characteristics and mean per group are reported in Table 1.

Table 1 – Demographic variables of the processed hemispheres

ID	Fixative	PMI (hours)	FL (years)	Age (years)	Sex	Hemisphere
BB1	**NBF** (immersed)	16	7	66	M	R
BB2		24	4	69	M	R
BB3		12	2.5	68	M	L
BB4		35	2.5	84	F	R
BB5		12	2.5	72	M	R
BB6		24	0.8	56	M	R
BB7		29	0.1	69	M	L
Mean		21.7±8.8	2.77±2.3	69.1±8.3	6M - 1F	5R - 2L
1	**SSS** (perfused)	24	4.5	59	M	L
2		36	4	67	F	R
3		20	2.5	83	M	R
4		26	1	81	M	L
5		10	1	87	F	R
6		39	0.6	78	M	R
7		19	0.4	78	F	L
Mean		24.9±10.0	2.00±1.68	76.1±9.8	4M - 3F	4R - 3L
8	**AFS** (perfused)	12	3	88	M	L
9		16	3	64	F	L
10		13	1	96	F	L
11		20	1	91	M	L
12		48	1.5	76	F	R
13		30	1.3	80	M	L
Mean		23.2±13.8	1.80±0.95	82.5±11.6	3M – 3F	1R - 5L

ID=Identification; BB=Brain Bank specimens; NBF=Neutral-buffered formalin; SSS=Saturated-salt solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution; PMI=Post-mortem interval; FL=Fixation length M=male; F=female.

5.4.2 Imaging protocol

The brain hemispheres were scanned using a 3T Siemens Prisma Fit human MRI scanner at the Douglas Cerebral Imaging Centre (CIC), using T1w and T2w sequences based on protocols developed at the CIC [10]. The sequences were as followed: 3D T1w MPRAGE (TR=2400ms; TE=2.41ms; FA=8deg; Resolution=0.7x0.7x0.7mm; Bandwidth=210Hz/Px; Acquisition

time=7:40minutes) and 3D T2-SPACE (TR=2500ms; TE=198ms; FA=120; Resolution=0.64x0.64x0.64mm; Bandwidth=625Hz/Px; Acquisition time=7:38minutes).

5.4.3 Image processing

All images were then pre-processed using the following steps: image denoising [31], intensity inhomogeneity correction [32], and image intensity normalization into range (0-100). The T1w and T2w images were co-registered and then linearly registered to the MNI-ICBM152-2009c average template [33].

5.4.4 Variables of interest

T1w and T2w images were qualitatively assessed using two categorical variables: 1) Inverted cGM-WM contrast, since it was shown that post-mortem T1w images have an inverted contrast [10, 29] that may affect the accuracy of cGM and WM segmentation (Figure 1A,B) and 2) GM-WM contrast sharpness, because the degree of sharpness is also related to the accuracy of the segmentation of these tissue types (Figure 1C,D,E). These two variables were assessed in the cGM and scWM in the six different lobes (i.e., frontal, parietal, temporal, occipital, insular, cingulum) and between dGM structures (i.e., putamen, external and internal globus pallidus, claustrum, thalamus, caudate, hippocampus, amygdala) and the surrounding deep WM (dWM) (corpus callosum, fornix, internal capsule).

Variable 1: Inverted cGM-WM contrast

0=yes (Figure 1A)

1=no (Figure 1B)

Variable 2: GM-WM (cGM-WM and dGM-WM) contrast sharpness

0=no contrast (Figure 1C)

1=low contrast (Figure 1D)

2=sharp contrast (Figure 1E)

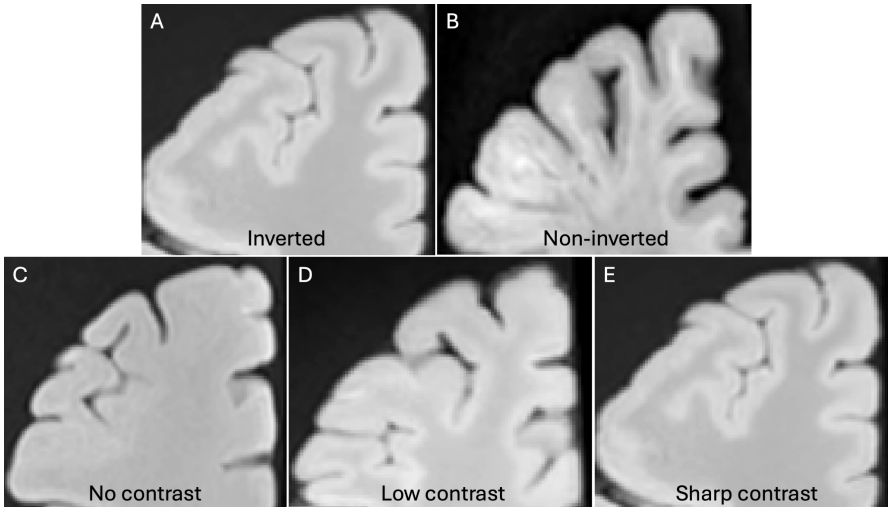


Figure 1. Visual assessment of the qualitative variables of interest. Variable 1 represents the Inverted cGM-WM contrast (A) or Non-inverted contrast (B). Variable 2 represents the cGM-WM contrast sharpness, where we could find no contrast (C), a low contrast (D) or a sharp contrast (E).

We also assessed the voxels' intensities quantitatively by creating masks of ROIs in 29 different neuroanatomical structures, selected by a neuroanatomist with over 7 years of expertise in MRI segmentation. The ROIs were created using Display software (MINC Toolkit), by marking 500 voxels per structure to allow for accurate estimation of regional intensities. Structures selected were grouped into 1-cGM per lobe; 2-NAWM per lobe (we excluded regions that were detected as white matter hyperintensities, which are frequent in aging populations such as ours) [28]; 3-dGM; and 4-dWM. Specific regions per groups and number of voxels per masks are presented in Table 2. The voxel intensities and the mean ROI intensity values were extracted automatically from the T1w and the T2w images using MATLAB (see Supplementary Tables 1-2 for the mean intensity values). To assess the contrast quantitatively in both sequences, we calculated the GM-WM ratios as follows: 1-cGM/scNAWM per lobe; 2-thalamus/posterior limb of the internal capsule; 3-Head of the caudate nucleus, putamen, globus pallidus (external and internal)/anterior limb of the internal capsule; 4-claustrum/WM of the insula; 5-amygdala, three regions of the hippocampus/WM of the temporal lobe; 6-three regions of the corpus callosum, two regions of the fornix/head of the caudate nucleus.

Table 2 – Regions of interest for quantitative analysis

ROI	Group	# voxels
GM of the Frontal lobe	cGM	500
WM of the Frontal lobe	NAWM	500
GM of the Temporal lobe	cGM	500
WM of the Temporal lobe	NAWM	500
GM of the Parietal lobe	cGM	500
WM of the Parietal lobe	NAWM	500
GM of the Occipital lobe	cGM	500
WM of the Occipital lobe	NAWM	500
GM of the Insula	cGM	500
WM of the Insula	NAWM	500
GM of the Cingulum	cGM	500
WM of the Cingulum	NAWM	500
Thalamus	dGM	500
Head of the Caudate nucleus		500
Putamen		500
External Globus Pallidus		500
Internal Globus Pallidus		500
Claustrum		350
Head of the Hippocampus		500
Body of the Hippocampus		500
Tail of the Hippocampus		500
Amygdala		500
Trunk of the Corpus Callosum	dWM	500
Rostrum of the Corpus Callosum		500
Splenium of the Corpus Callosum		500
Anterior columns of the Fornix		150
Crux of the Fornix		150
Anterior limb of the Internal Capsule		500
Posterior limb of the Internal Capsule		500

ROI=Regions of interest; GM=Gray matter; WM=White matter; cGM=Cortical GM; NAWM=Normal-appearing white matter; dGM=Deep GM; dWM=Deep WM.

5.4.5 Statistical analysis

Qualitative (i.e., categorical) variables were compared across the three fixative groups using Chi-square. Qualitative variables were also compared across the different FL, since T1 and T2 contrast is known to change longitudinally through fixation [20, 21] Quantitative variables were compared across the three fixatives using ANOVA or Kruskal-Wallis according to their distribution. All statistical tests were conducted using IBM SPSS statistics (version 29.0.2.0).

5.5 Results

5.5.1 Qualitative assessment

The inverted cGM-WM contrast was significantly different on T1w images across the different solutions ($p<0.001$). In AFS-fixed brains, all hemispheres showed non-inverted cGM-WM contrasts in most of the ROIs, while the other two solutions always showed inverted cGM-WM contrast in all of the ROIs assessed ($p<0.001$, Figure 2A). We found no significant difference in the frequency of inverted cGM-WM contrast in relation to the FL (Figure 2B). Out of the 6 AFS-fixed brains, all frontal, all cingulum, 4 insula, 3 parietal, 2 occipital and 3 temporal lobes showed non-inverted cGM-WM contrast, while 3 dGM-dWM showed non-inverted contrast, but this was not statistically significant (Figure 2C).

When assessing this variable on T2w images, the contrast was never inverted, so there was no significant difference across the different solutions, nor across different FL.

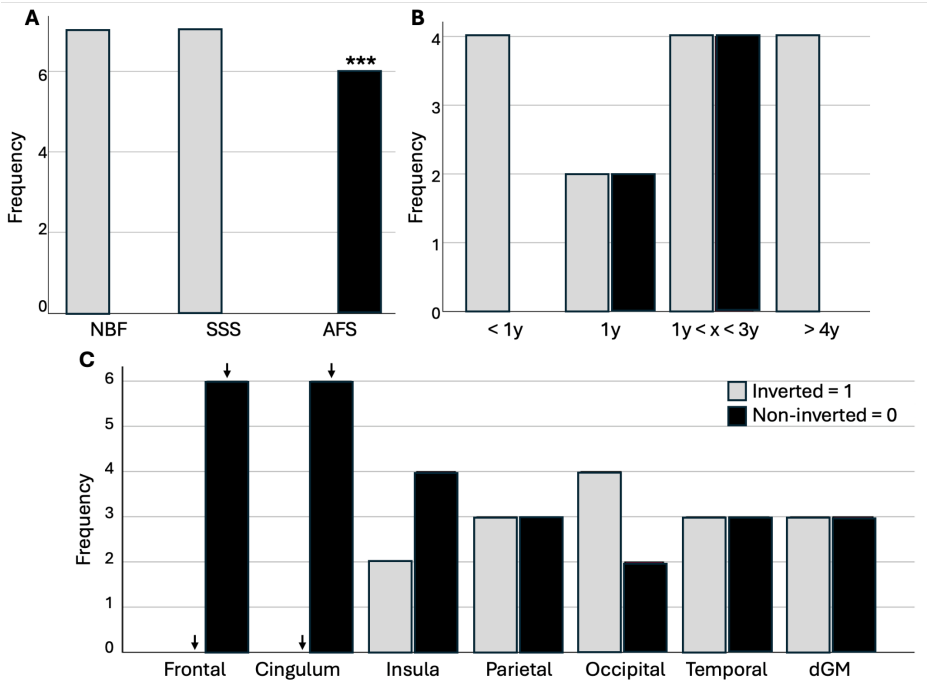


Figure 2. Qualitative assessment of the inverted contrast on T1w images. A) According to the fixative. B) According to the fixation length. C) In the different lobes and dGM of the AFS-fixed brains. NBF=Neutral=buffered formalin; SSS=Salt-saturated solution; AFS=Alcohol-formaldehyde

solution; y=years. ↓ (before Bonferroni) 0.0055 < p < 0.05 ; *** p value < 0.001 after applying a Bonferroni correction.

As for the cGM-WM contrast sharpness on T1-weighted images, we found that the NBF-fixed brains showed a higher number of specimens with a sharp cGM-WM contrast (67.3% of all cases, p<0.0001), and fewer hemispheres with Low contrast (24.5% of all cases, p=0.01) or No contrast (8.2% of all cases, p<0.01) when compared with the other two solutions (Figure 3A). Furthermore, we found fewer cases with a sharp cGM-WM contrast in brains fixed with AFS (16.7% of all cases, p<0.001) (Figure 3A). We also found a significantly lower number of specimens with a sharp contrast in SSS-fixed brains (22.4% of all cases, p=0.01), and a significantly higher number of cases with No contrast in AFS specimens (35.7% of all cases, p<0.05), but these findings did not retain significance after a Bonferroni correction (Figure 3A).

The cGM-WM contrast sharpness was also assessed in different regions of interest (i.e., parietal, frontal, temporal, occipital, insular lobes, cingulum, and dGM nuclei). We found no significant differences in the temporal, frontal, and insular lobes. We found more hemispheres with No contrast in AFS-fixed brains in the parietal lobe, but this did not retain significance after a Bonferroni correction (p<0.05) (Figure 3B). In the occipital lobe, we found more cases with a sharp contrast in hemispheres fixed with NBF (p<0.05) and fewer in brains fixed with AFS (p<0.05), while more showed No contrast (p<0.05), but none of this retained significance after a Bonferroni correction (Figure 3D). In the cingulate gyrus, SSS-fixed hemispheres never showed sharp contrast (p<0.05), while most of the hemispheres fixed with NBF showed a sharp contrast (p=0.01), but this did not retain significance after a Bonferroni correction (Figure 3G). In the dGM, we found a significantly higher frequency of sharp contrast in the brains fixed with NBF (p<0.0001), while none was observed in SSS (p<0.05) nor AFS-fixed specimens (Figure 3H).

Finally, we found no significant differences of cGM-WM contrast sharpness on the T2w images. The cGM-WM contrast is mostly sharp in all the regions, while no cases of No contrast in any of the regions were observed (Figure 3I-P).

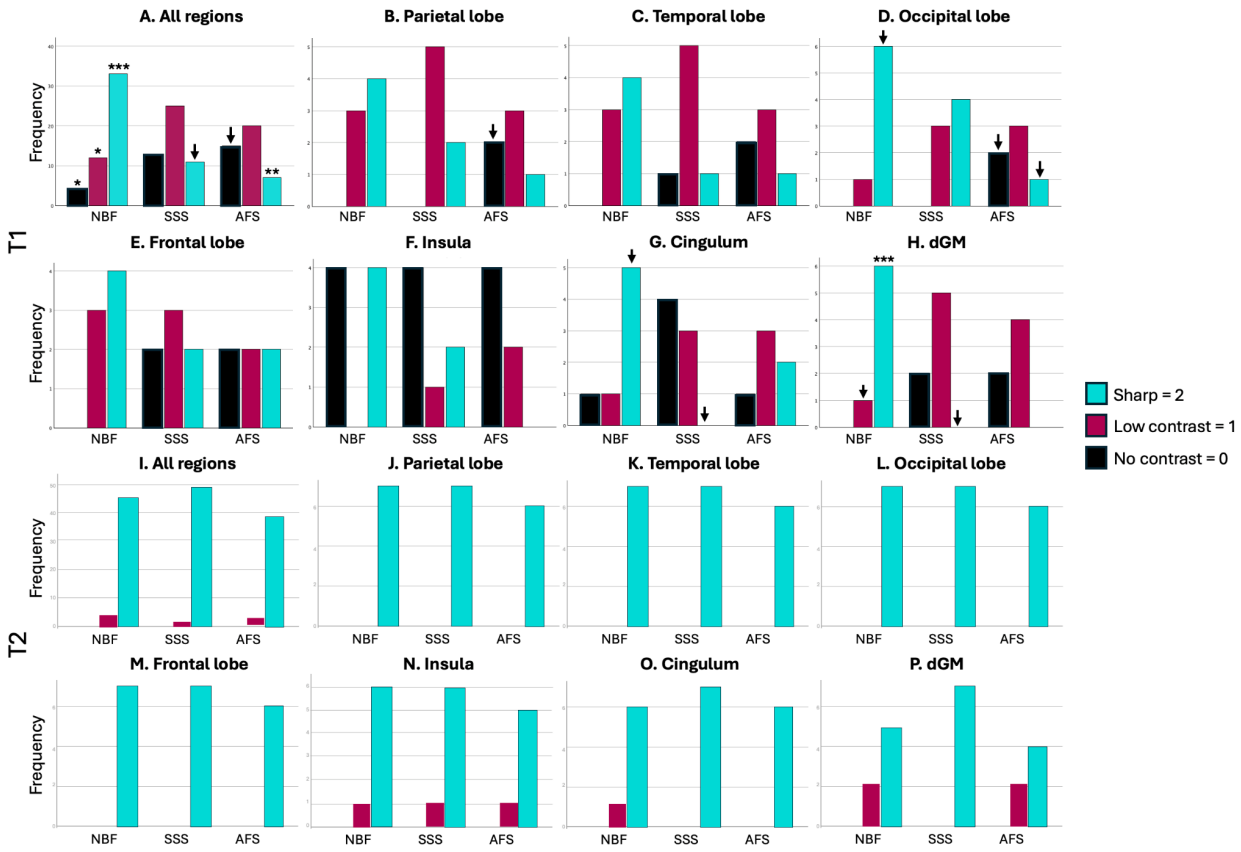


Figure 3. Qualitative assessment of the cGM-WM contrast sharpness in relation to the fixative solution. Top two rows show the cGM-WM contrast on T1w images, while bottom two rows represent the qualitative assessment on T2w images. dGM=Deep gray matter; NBF=Neutral-buffered formalin; SSS=Salt-saturated solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution. ↓ (before Bonferroni) $0.0055 < p < 0.05$; * $0.001 < p < 0.0055$; ** $0.0001 < p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

When we assessed the cGM-WM contrast sharpness in relation to the FL, we found overall no significant differences on T1w and T2w images. However, before a Bonferroni correction, there were differences in the insula (Figure 4F), cingulum (Figure 4G) and dGM nuclei (Figure4H) on T1w, as well as in all regions in the >4 years group (Figure 4I) and the cingulum in the >4 years group (Figure 4O) on T2w images. T1w and T2w images of the different specimens are shown in Figure 5.

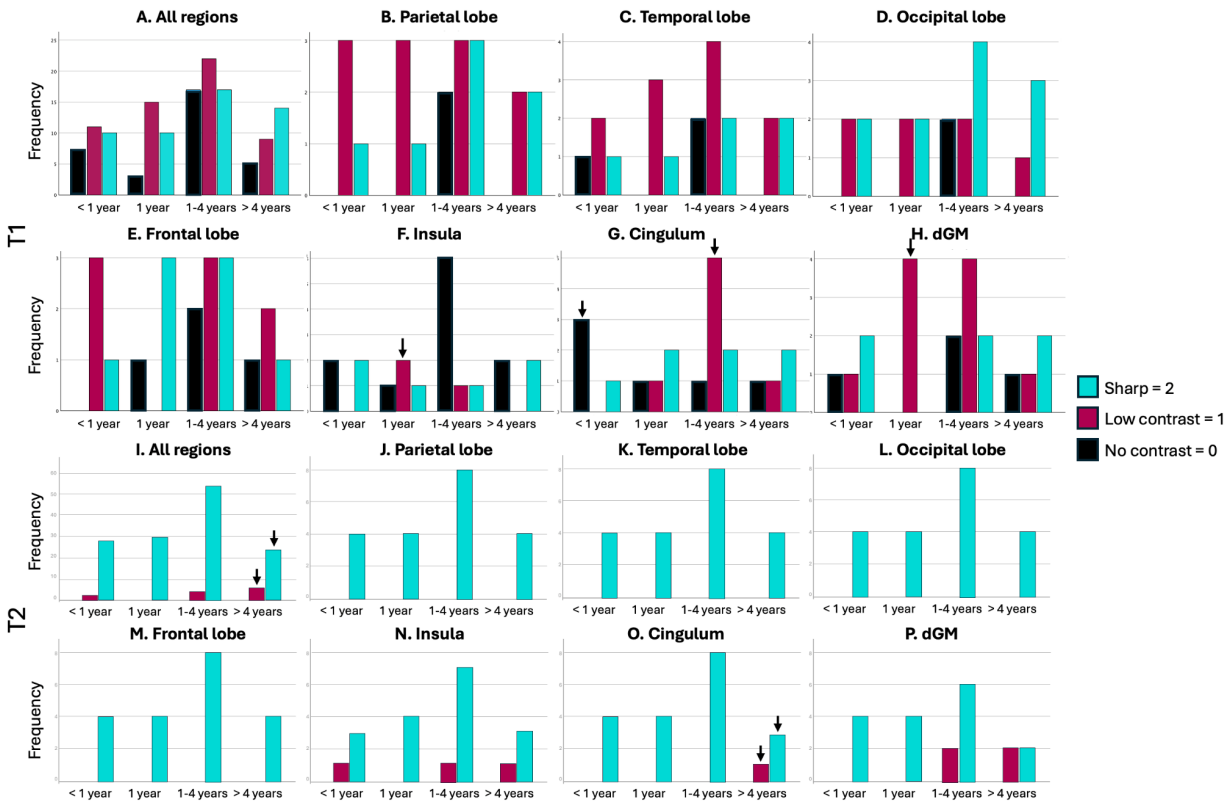


Figure 4. Qualitative assessment of the gray matter to white matter contrast sharpness in relation to the fixation delay. Top two rows show the GM-WM contrast in the T1-weighted sequence, while bottom two rows represent the qualitative assessment in T2-weighted images. dGM=Deep gray matter.↓ (before Bonferroni) $0.0055 < p < 0.05$.

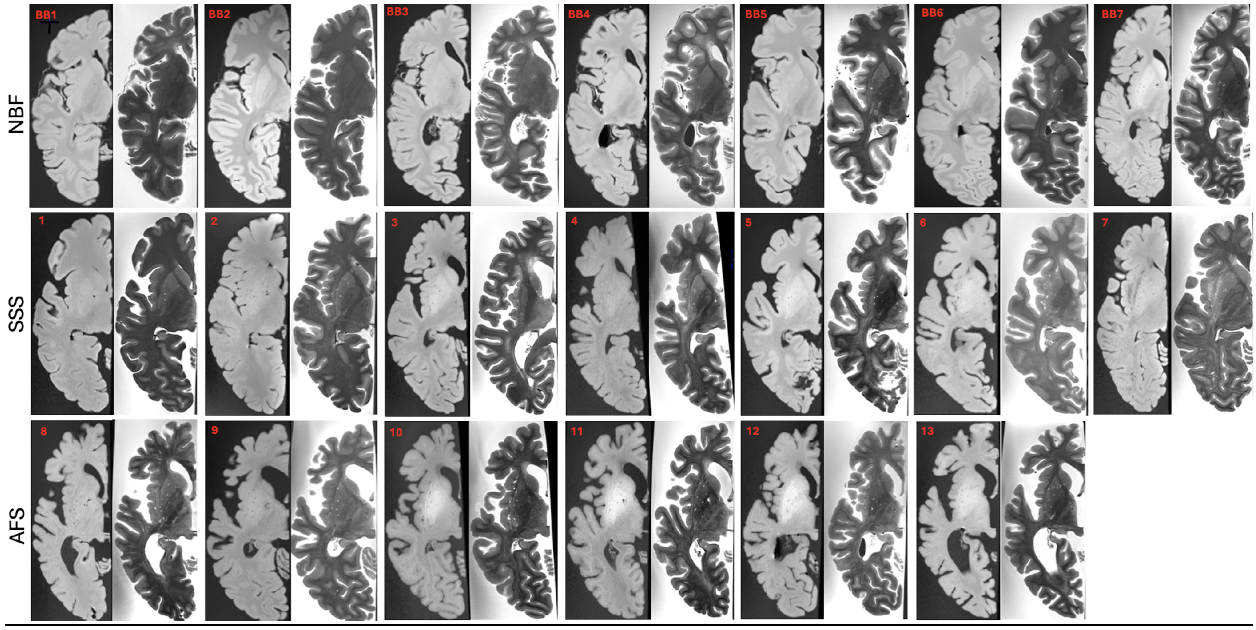


Figure 5. Qualitative assessment of the gray matter to white matter contrast in co-registered T1w and T2w images of all specimens. Top row shows the 7 NBF-fixed specimens, middle row shows the 7 SSS-fixed specimens and bottom row shows the 6 AFS-fixed brains. IDs are indicated in red.

5.5.2 Quantitative assessment

Regarding the intensity ratios on T1w, we found that the AFS-fixed brains led to significantly lower ratios of GM-WM than those found in NBF-fixed brains in the frontal, temporal, parietal, occipital, insular and cingulate lobes. GM-WM ratios were also significantly lower in AFS-fixed brains than in SSS-fixed brains in the temporal, parietal, occipital, insular and cingulate lobes (Figure 6, top row, Table 3). Table 3 only shows the GM-WM intensity ratios that were found statistically significant, as shown in Figure 6. Also, Figure 1 of the Supplemental material shows per group mean intensities (cGM, NAWM, dGM, dWM) across the three fixatives.

In dGM regions, we found that the T1w intensity ratios of the thalamus of AFS-fixed brains was significantly lower than in NBF-fixed. Ratios of the SSS-fixed brains were also significantly lower than in NBF-fixed brains. We also found that the intensity ratios of the head of the caudate nucleus of AFS-fixed brains were significantly lower than in NBF-fixed brains and SSS-fixed brains. SSS-fixed brains also showed significantly lower caudate intensity ratios than NBF-fixed brains. Finally, we found no significant difference in the intensity ratios of the putamen, globus pallidus nor the claustrum in brains fixed with the three fixatives (Figure 6, second row).

We also found that the intensity ratios of the amygdala were significantly lower in brains fixed with AFS and SSS than in brains fixed with NBF. The intensity ratios of the three regions of the hippocampus were significantly lower in brains fixed with AFS and SSS than in brains fixed with NBF, and lower in AFS-fixed brains than in SSS (Figure 6, third row).

Finally, the intensity ratios of the trunk of the corpus callosum were significantly higher in brains fixed with AFS and SSS than in brains fixed with NBF. No significant difference was found for the rostrum of the corpus callosum, but we found similar differences of the intensity ratios of the splenium of the corpus callosum, where intensity ratios of AFS-fixed brains and SSS-fixed brains were significantly higher than in NBF-fixed brains (Figure 6, bottom row).

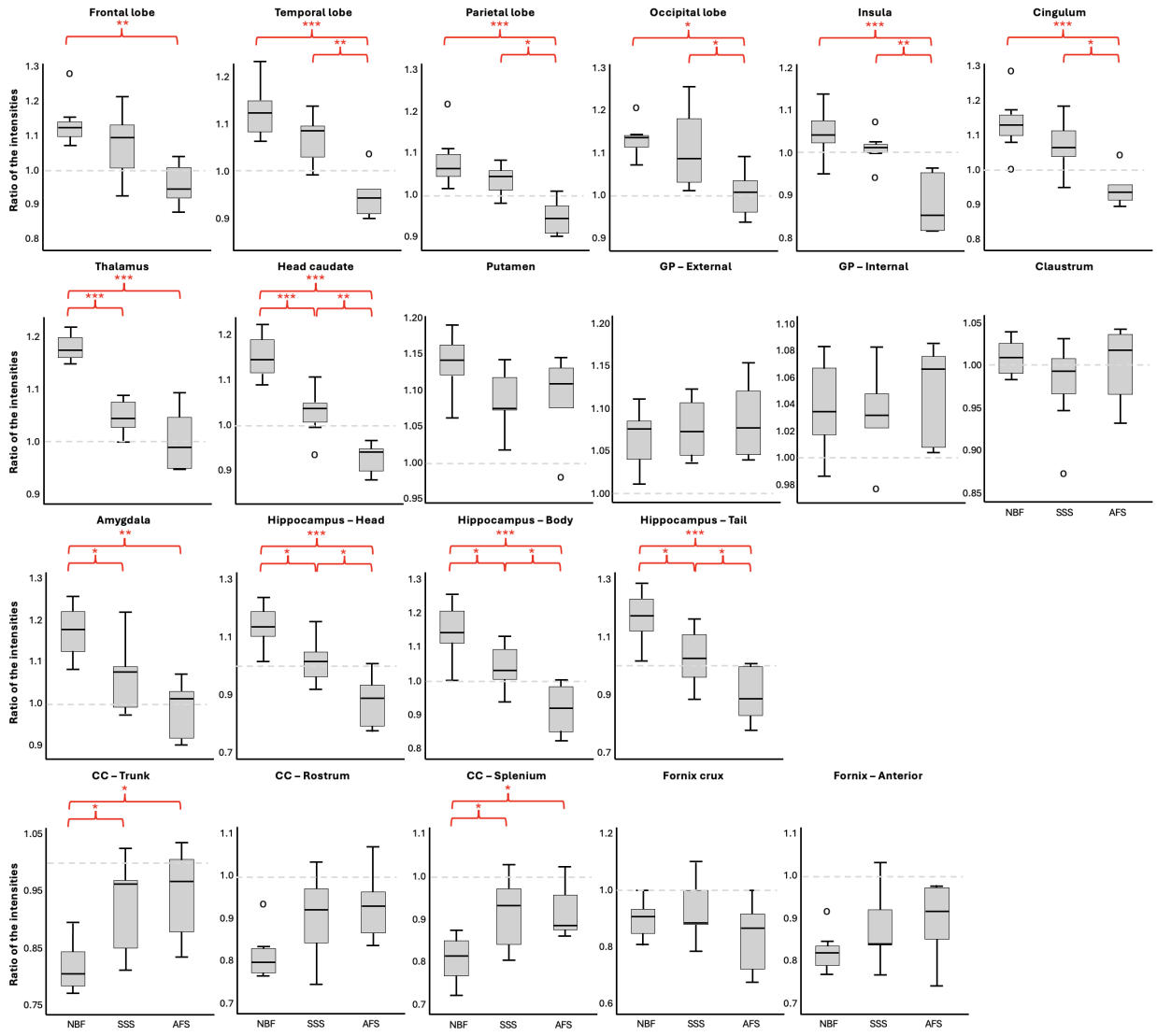


Figure 6. GM and WM T1w intensity ratios for each region of interest. The top line shows the ratios between GM and WM for each lobe. Second line shows the GM to WM ratio of the dGM nuclei (posterior limb of the internal capsule for thalamus, anterior limb of the internal capsule for head of the caudate, putamen and both globus pallidus, and white matter of the insula for claustrum). The third line shows the GM to WM ratios of the amygdala and hippocampus with the temporal WM (all four were considered dGM as well). Finally, the last line shows the WM to GM ratios of the dWM structures with the head of the caudate. GP=Globus pallidus; CC=Corpus callosum; NBF=Neutral-buffered formalin; SSS=Salt-saturated solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution. *0.01 < p < 0.05 ; **0.001 < p < 0.01; ***p < 0.001 after a Bonferroni correction.

Regarding the T2w mean intensity ratios, we found that cGM-WM ratios of all lobes were significantly lower in brains fixed with SSS than in brains fixed with NBF. Furthermore, in the occipital lobe, SSS-fixed brains also showed significantly lower cGM-WM ratio than in brains fixed with AFS (Figure 7, top row).

The T2w dGM-WM mean intensity ratios (i.e., ratios of thalamus, head of the caudate nucleus, putamen, globus pallidus and claustrum) were not significantly different across the three solutions (Figure 7, second row). However, we found that the T2w mean intensity ratios of the amygdala and the three regions of the hippocampus were significantly lower in brains fixed with SSS than in brains fixed with NBF (Figure 7, third row).

Finally, as for the dWM ratios, we found no significant difference in the trunk and the rostrum of the corpus callosum, nor in the anterior column of the fornix. However, we found that the ratios of the splenium of the corpus callosum of the SSS-fixed brains were significantly higher than in NBF-fixed brains. Furthermore, we found that the ratios of the crux of the fornix were significantly lower in brains fixed SSS than with NBF.

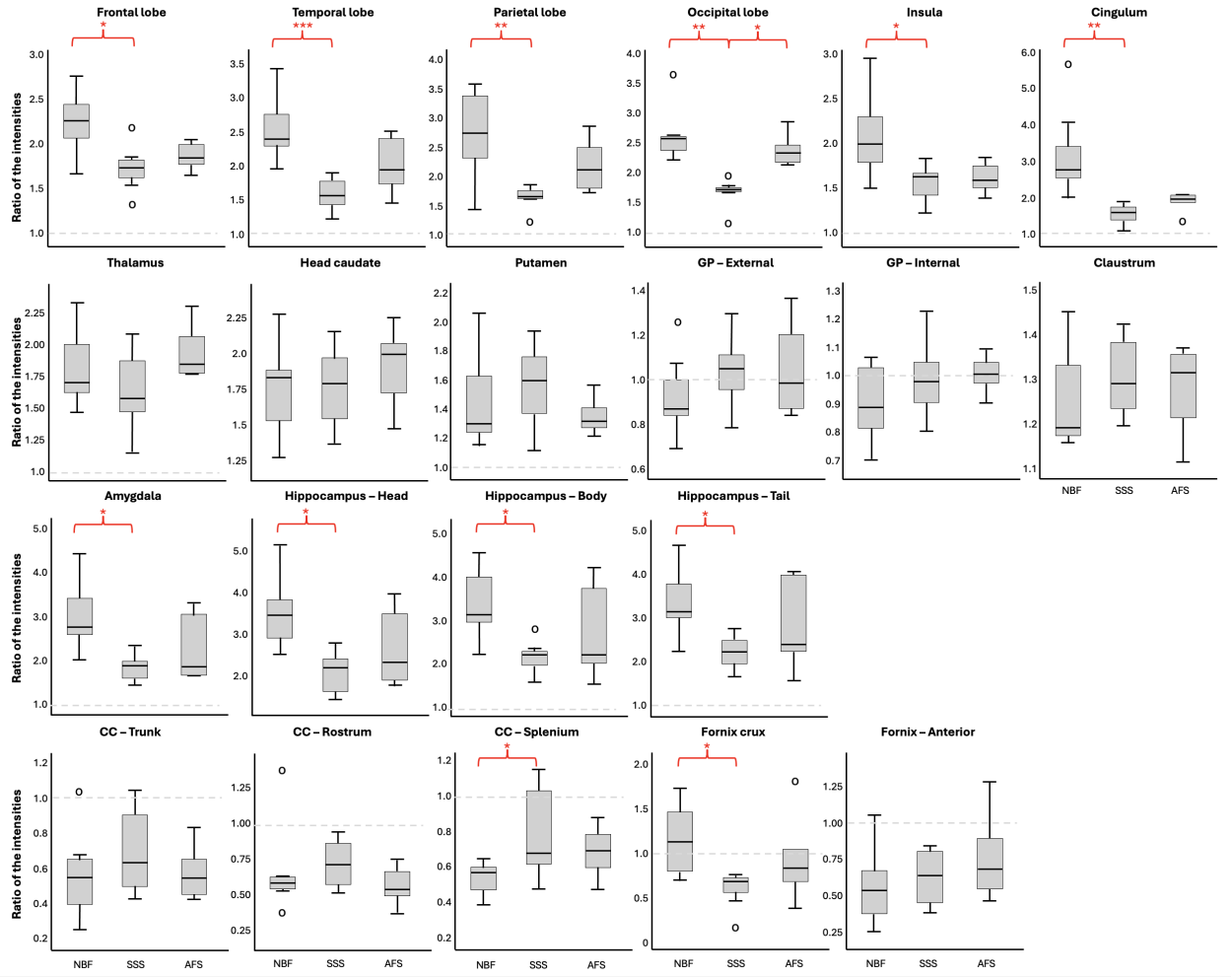


Figure 7. GM and WM T2w intensity ratios for each region of interest. Top line shows the ratios between GM and WM for each lobe. Second line shows the GM to WM ratio of the dGM nuclei (posterior limb of the internal capsule for thalamus, anterior limb of the internal capsule for head of the caudate, putamen and both globus pallidus, and white matter of the insula for claustrum). Third line shows the GM to WM ratios of the amygdala and hippocampus with the temporal WM (all four were considered dGM as well). Finally, last line shows the WM to GM ratios of the dWM structures with head of the caudate. GP=Globus pallidus; CC=Corpus callosum; NBF=Neutral-buffered formalin; SSS=Salt-saturated solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution. *0.01 < p < 0.05 ; **0.001 < p < 0.01, ***p < 0.001 after a Bonferroni correction.

Table 3. GM-WM mean intensity ratios of each region in T1w and T2w images.

T1w GM-WM Intensity ratios	NBF	SSS	AFS	Significance
Frontal	1.132±0.066		0.956±0.058	p<0.01
Temporal	1.126±0.059*	1.064±0.054 $^{\Delta}$	0.945±0.050* $^{\Delta}$	p<0.001*; p<0.01 $^{\Delta}$
Parietal	1.086±0.065*	1.043±0.037 $^{\Delta}$	0.956±0.041* $^{\Delta}$	p<0.001*; p<0.05 $^{\Delta}$
Occipital	1.134±0.039*	1.113±0.093 $^{\Delta}$	1.012±0.053* $^{\Delta}$	p=0.01*; p<0.05 $^{\Delta}$
Insular	1.050±0.058*	1.012±0.038 $^{\Delta}$	0.882±0.065* $^{\Delta}$	p<0.001*; p=0.001$^{\Delta}$
Cingulum	1.132±0.086*	1.073±0.074 $^{\Delta}$	0.948±0.051* $^{\Delta}$	p<0.001*; p<0.05 $^{\Delta}$
Thalamus	1.178±0.027*$^{\Delta}$	1.046±0.032*	1.000±0.057 $^{\Delta}$	p<0.001*; p<0.001$^{\Delta}$
Caudate	1.151±0.051*$^{\Delta}$	1.026±0.056*^{O}	0.928±0.032$^{\Delta O}$	p<0.001*; p<0.001$^{\Delta}$; p<0.01^{O}
Amygdala	1.173±0.068*$^{\Delta}$	1.061±0.086*	0.990±0.066 $^{\Delta}$	p<0.05*; p=0.001 $^{\Delta}$
Head hippocampus	1.137±0.078*$^{\Delta}$	1.012±0.079*^{O}	0.877±0.089 $^{\Delta O}$	p<0.05*; p<0.001 $^{\Delta}$; p<0.05 ^{O}
Body hippocampus	1.147±0.083*$^{\Delta}$	1.044±0.067*^{O}	0.918±0.076 $^{\Delta O}$	p<0.05*; p<0.001 $^{\Delta}$; p<0.05 ^{O}
Tail hippocampus	1.162±0.090*$^{\Delta}$	1.023±0.999*^{O}	0.894±0.092 $^{\Delta O}$	p<0.05*; p<0.001 $^{\Delta}$; p<0.05 ^{O}
Trunk corpus callosum	0.817±0.046*$^{\Delta}$	0.920±0.083*	0.948±0.076 $^{\Delta}$	p<0.05*; p=0.01 $^{\Delta}$
Splenium corpus callosum	0.807±0.056*$^{\Delta}$	0.911±0.084*	0.913±0.061 $^{\Delta}$	p<0.05*; p<0.05 $^{\Delta}$
T2w GM-WM Intensity ratios	**NBF**	**SSS**	**AFS**	**Significance**
Frontal	2.257±0.360	1.754±0.262		p=0.01
Temporal	2.555±0.469	1.610±0.242		p<0.001
Parietal	2.747±0.773	1.651±0.199		p<0.01
Occipital	2.655±0.476*	1.689±0.246*$^{\Delta}$	2.406±0.265 $^{\Delta}$	p=0.001* ; p<0.05 $^{\Delta}$
Insular	2.083±0.497	1.548±0.198		p<0.05
Cingulum	3.212±1.215	1.666±0.262		p=0.001
Amygdala	3.025±0.818	1.814±0.319		p<0.05
Head hippocampus	3.465±0.861	2.100±0.422		p=0.01
Body hippocampus	3.375±0.815	2.125±0.384		p<0.05
Tail hippocampus	3.389±0.789	2.239±0.395		p<0.05
Splenium corpus callosum	0.541±0.096	0.801±0.260		p<0.05
Crux of the fornix	1.155±0.440	0.594±0.221		p<0.05

5.6 Discussion

In this study, we systematically assessed the impact that fixation by three different fixative solutions exerts on T1w and T2w MRI tissue contrasts in different structures of the human brain. First, we examined whether GM-WM contrast was inverted in T1w images, leading to the GM appearing as hyperintense in relation to the WM (i.e. as opposed to the contrast profiles of *in vivo* T1w images showing hypointense GM in relation to WM). Previous studies suggest that post-mortem brains fixed with NBF show different T1w contrasts because of fixative distribution into the tissue [10, 29]. Additionally, T1w GM-WM contrast and T1 relaxation times were measured in five formalin-fixed human brains as a function of time [23]. They showed that a reversal of the contrast was observed around the 4th day of immersion, which was in relation to a greater decrease of the GM relaxation times than in WM. Based on this work, our initial hypothesis was

that the T1w images of our anatomy laboratory hemispheres might not always show an inverted GM-WM contrast, since both anatomic solutions have a much lower proportion of formaldehyde (0.8% in the SSS and 1.4% in the AFS compared to 4% in NBF). We also considered that the FL could impact the reversal of the signal, and that this would be more evident in specimens with a longer FL.

In T1w images, only AFS-fixed brains showed non-inverted contrast in some lobes (all cases). All SSS and NBF brains showed an inverted contrast, comparable to what other studies have shown in NBF cases [10, 29]. We suspect that this lack of inversion in some regions of our AFS specimens may be related to two phenomena: 1-changes in AFS may be slower than changes produced by SSS or NBF, and/or 2-distribution and diffusion of the fixative might not have been sufficiently homogeneous in the AFS-fixed specimens of our sample. Regarding the first consideration, based on our prior examinations, AFS-fixed bodies require between 8 months to 1 year to be deemed macroscopically well fixed for dissection and teaching purposes (according to the texture, color, and humidity of the body). In contrast, SSS-fixed bodies only take 6 to 8 weeks to be usable in dissections, while NBF brains are immersed for only 3 weeks prior to use [10]. Consequently, we examined the inversion of the contrast in relation to the FL, but did not find statistically significant associations. However, only 2 AFS-fixed specimens had a FL of 3 years, and those showed more areas with inverted contrast (cases 8 and 9 in Figure 5 and Table 1). It is therefore possible that a larger sample of specimens with longer FLs would show a relationship between FL and inversion of the GM-WM contrast in the AFS-fixed specimens. Regarding inhomogeneity in distribution of the fixative, our previous study on T1w and T2w contrasts of suboptimally fixed *in situ* human brains [34] found a non-inverted contrast on T1w images. When extracting the brains and sectioning the hemispheres, we found remaining blood in the leptomeninges, the cortex, and the deeper WM, where the non-inverted contrasts on the T1w images were observed. In some cases, these areas corresponded to the vascular territories of arteries that were visibly obstructed by clots, so it is conceivable that the fixative could not be fully and homogeneously distributed in all the tissue [34]. In the present sample of AFS-fixed brains, we have not observed any macroscopical accumulation of blood affecting the cortex or dWM, so we did not systematically inspect the vessels of these specimens. Still, it is always possible that smaller vessels are affected

by obstructions (i.e. small vessels disease, especially in our older population) and this could be related to inhomogeneous fixation and reversal of the signal only in some lobes.

Regarding the anatomical location of non-inverted contrast in the AFS-fixed brains, we found that all frontal and cingulum lobes were non-inverted, while 4 insula, 3 parietal, 3 temporal, and only 2 occipital lobes out of 6 specimens showed a non-inverted contrast. We hypothesize that the difference in the inversion of the contrast across the ROIs could be related to vascular and myelin anterior-to-posterior differences in the brains. First, the brains are perfused through whole body perfusion by the injection of the fixative into the common carotid artery (at its proximal part into the neck). The vertebral system, responsible for the fixation of the occipital lobe and posterior regions of the brain through the posterior cerebral arteries, is less affected by clots than the carotid system, responsible for the perfusion of the rest of the brain through the middle and anterior cerebral arteries [35, 36]. Because the injection of the fixative solution, using a pump, comes from the carotid artery and has a pressure of 310 mmHg, this could push the clots towards the distal branches of the carotid system instead of the vertebral system, potentially determining a more heterogeneous distribution of the fixative in the anterior compared to the posterior territories of the brain. Second, there is a fronto-occipital (antero-posterior) gradient of myelination in the development of the brain [37], leading to fundamental differences in the myelin composition in the different ROIs of the hemispheres, especially in the frontal lobe that loses myelin with aging [37]. Indeed, a previous study hypothesized that the myelin phospholipid structure was decomposed by formalin fixation, which somewhat counteracts the general reductive effect of the fixation procedure on relaxation times [23]. Another study suggested that myelin is lost in the frontal lobe and superior regions of the brains with aging [37]. Therefore, our results are in line with the fact that the inversion of the T1w contrast could be related to differential anterior-to-posterior changes in the myelin. Finally, in a previous report of our team that scanned one NBF-fixed *in situ* brain once a month (starting two months after the injection of the fixative [38], also see Figure 3 in the Supplemental materials), we found that the inversion of the cGM-WM contrast started in the occipital lobes (starting from the second visit (3 months) after injection of the fixative), followed by the parietal lobe (starting from the third visit (4 months)) and finally by the frontal lobe (from the 5th visit) (i.e., from posterior to anterior),

reflecting the same differences in the inversion of the GM-WM contrast as we see in the AFS-fixed specimens of this study.

In T2w images, we found that the contrast was never inverted in the brains fixed with the three fixatives, reflecting that T2w characteristics are not affected by the chemical fixation as it is the case on T1w images. Therefore, post-mortem T2w images resemble those *in vivo* [10, 30], translating the suitability of brains fixed in anatomy laboratories for using T2w MRI sequences.

We assessed this variable because differences in the sharpness of the GM-WM contrast could influence studies that use segmentation of different anatomical structures. Indeed, manual segmentation by experts or automatic segmentation by softwares are highly dependent on the intensity of voxels at the boundary between two different tissue types and the partial volume of each tissue in boundaries' voxels [39-41]. This is important for example in MRI studies interested in the volume of different regions and nuclei, where differences in the fixative used could impact the extracted volumes for the same structures [39, 40]. This is also important since automated segmentation methods are inevitably impacted by tissue contrast and would have been biased if we hadn't used manual segmentation. Therefore, we have used neuroanatomy expertise to accurately segment small regions (at comparable levels in each scan) to show how their respective intensities were impacted by the fixation process and the different fixatives.

In T1w images, out of 7 ROIs per specimen (frontal, temporal, parietal, occipital, cingulum, insular lobes and dGM), we found that NBF-fixed brains had the lowest proportion of ROIs without contrast: only 8.2% compared to 26.5% in SSS- and 35.7% in AFS-fixed brains. Also, SSS- and AFS-fixed specimens showed the highest proportion of ROIs with a Low contrast: 51% and 47.6%, as opposed to 24.5% of the NBF-fixed brains' ROIs. Finally, NBF-fixed cases also showed the highest proportion of sharp contrast: 67.3%, while only 22.4% of SSS- and 16.7% of AFS-fixed brains' regions showed Sharp contrast. This reflects the lowest GM-WM contrast in AFS-fixed brains, followed by SSS-fixed specimens and that the highest quality in terms of sharp boundaries is provided by NBF-fixed brains.

The occipital lobe and dGM were the ROIs that showed the highest differences in the proportion of cases with sharp boundaries across the three solutions. Occipital lobes showed sharper

contrasts in NBF-fixed brains, which might be related to the occipital cortex being more compact and with less gyrification [42-44]. In fact, a faster fixation by immersion in the cortical surface by NBF may be responsible for a sharper contrast. Plus, even in the AFS specimens, we found that the occipital lobes were the least affected ROI by the non-inverted contrast, which points to the intrinsic characteristics of the area of the brain to explain a faster, more homogeneous fixation regardless of the solution employed. Interestingly, in the dGM, we never found sharp contrast (which happened to be highly significant), except in NBF fixed brains, even though the fixative had to diffuse from the surface, as opposed to the specimens fixed with SSS and AFS, where the fixative gets to the tissue through the vessels. We think that this may be related to the anatomical solutions having a much lower concentration of formaldehyde (0.8% for SSS and 1.4% for AFS) than the NBF solution (4% formaldehyde).

In T2w images we found no difference in the sharpness of the GM-WM borders between the three fixatives, where almost all ROIs in all specimens showed a sharp contrast. This is in accordance with previous studies that showed that *ex vivo* T2w quality looked similar than *in vivo* T2w images, highlighting this sequence suitability for *ex vivo* research using MRI [10, 22, 30, 34].

Finally, we also considered the possibility that a lower contrast sharpness could reflect an incomplete fixation process that could eventually be completed with a longer exposure to the fixative. Therefore, we assessed the GM-WM contrast sharpness in relation to the FL, but we found no significant difference in any of the ROIs, neither in T1w or T2w images. However, since our sample size is small and we have no AFS-fixed brains with a FL longer than 3 years, we cannot unequivocally conclude on the effect of FL on the AFS-fixed brains T1w contrast, which seems to be the most heterogeneous or incomplete of the three solutions.

5.6.1 Voxel-wise intensity ratios

It has been shown that MRI properties change after fixation in NBF [10-12, 20-24, 26, 29, 45-47], so we wanted to assess if the intensity of the voxels fixed with the other two solutions would also be affected. Furthermore, we wanted to corroborate what was observed in our qualitative assessment, so we extracted intensities in 29 ROIs of cGM, scNAWM, dGM and dWM to calculate ratios that would reflect the GM-WM contrast. Indeed, a ratio closer to 1 reflects a lower contrast

(i.e., since it shows that GM and WM intensity values are similar) while a ratio further from 1 reflects a better GM-WM contrast. Additionally, a ratio lower than 1 would reflect a non-inverted contrast (i.e., WM hyperintense with a higher numeric value in the denominator than GM in the numerator).

In T1w images, we found that AFS-fixed brains had lower ratios than NBF- and SSS-fixed brains in all the lobes. They also had lower ratios in the thalamus, caudate, amygdala and hippocampus. Also, the ratios of the trunk and the splenium of the corpus callosum were higher in AFS- and SSS-fixed brains than in NBF-fixed brains. These differences in the ratios of AFS-fixed brains are related to a higher intensity of WM (either NAWM or dWM) (Supplemental Table 1 and Figure 1), which is related to the lack of inversion of the contrast. Indeed, in all the lobes and dGM, the mean ratios of AFS-fixed brains are lower than 1, and when calculating the difference between the GM-WM ratios and 1 (1 representing no-contrast), we observed negative values, translating that the contrast was not completely reversed. We also obtained values closest to 0, translating the lowest contrast (Ratios of 1 minus 1) of the three solutions (Supplemental Figure 2). A potential explanation for these findings in AFS-fixed brains is that the multiple chemicals included in the AFS (i.e., high concentrations of ethanol, glycerol and phenol, as well as Dettol, a detergent used as a degreaser) have a distinct effect on the WM. We hypothesize that the AFS solution affects the myelin of the WM in its own idiosyncratic way determining a more heterogeneous contrast on MRI compared to the NBF and SSS solutions. Indeed, our hypothesis is supported by the fact that AFS-fixed brains have lower quality of Luxol fast blue and Bielschowsky stains (i.e., techniques that stain myelin and axons) [18], that myelin water fraction and relaxation times are generally modified with fixation [48], and that phospholipids of the myelin sheet may be degraded by the fixation process, but could be modified in delipidization processes [49].

In T2w images, we found that SSS-fixed brains showed lower GM-WM intensity ratios in all the lobes, in the amygdala and in the hippocampus. Again, Supplemental Table 2 and Figure 1 show that the WM intensities change more than GM regions. However, in SSS-fixed brains, GM regions were also higher, leading into overall intensity ratios that were lower. As observed in the qualitative assessment, this did not affect the sharpness of the GM-WM contrast, so we suggest that this is probably due to the overall higher intensities in these brains, since sodium (i.e., present

in high concentration in the SSS-fixed brains) is known to produce hyperintense signal on MRI [50]. In Supplemental Figure 2, we show that the difference between the mean ratios of SSS-fixed brains and the value 1 are higher than 0, reflecting a sharp GM-WM contrast, as also observed in the qualitative assessment.

5.6.2 Limitations

We acknowledge that our study isn't without limitations. We used a convenience sample of specimens that we tried to match in relation to confounding variables (i.e., age at the time of death), but we still found ourselves with older specimens in the groups fixed in the anatomy laboratory (i.e., SSS- and AFS-fixed brains). This is a consequence of the overall older ages of the donors of our anatomy laboratory, which is beyond our control. We were also unable to include AFS-fixed brains fixed for more than 4 years, but we are working on building a larger sample with longer FL for future studies. Our small sample size also limits the statistical analysis approaches that we could use, which is why we qualitatively assessed the structural MRIs and avoided attempting regressions with multiple covariables that demand much larger samples. Finally, while MRI parameters may be optimized per fixative to get a higher contrast, this approach would preclude the cross fixative comparability, which was our main goal. Therefore, future studies could tailor MRI acquisition protocols to generate comparable contrasts in each fixative group.

5.6.3 Conclusion

We conclude that T1w images are more affected by the fixation process, inverting the contrast of *in vivo* T1w and reducing the GM-WM contrast in general, while T2w images remain similar to *in vivo* scans and maintain a sharp contrast. AFS-fixed brains seem to be more affected by longitudinal relaxation (T1), while SSS-fixed brains seem more affected by the transversal relaxation (T2). Furthermore, the differences in the intensity ratios across fixatives seem to be related to more marked changes in the WM intensity values across fixatives, not GM values, reflecting the importance of the changes of the myelin during the fixation process. Overall, brains fixed in anatomy laboratories could be used for MRI studies and the T2w sequence seems to be the most adequate for structural analyses in different brain regions.

5.6.4 Acknowledgements

We would like to thank the generosity of the body donors and their families for making our projects possible. We also acknowledge funding resources and the anatomy laboratory staff of the Université du Québec à Trois-Rivières for their support and help in the lab. We would also like to thank the Cerebral Imaging Center staff for their help in managing the scanning schedule. All the authors are funded by the Government of Canada | Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. MRI data collection was also funded by Dr. Dadar's grant from the Canadian Institutes of Health Research.

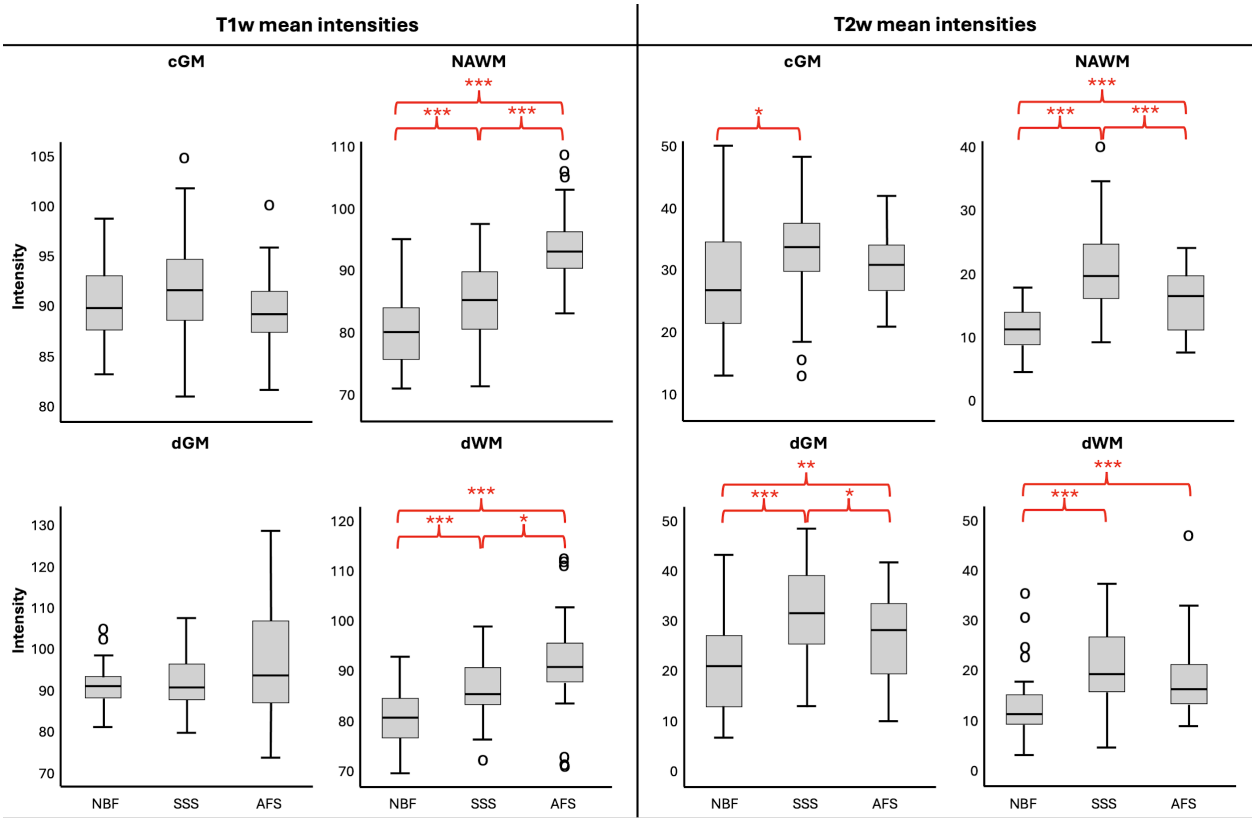
5.7 Supplementary material

Supplemental Table 1. Mean intensities of each of the ROIs of T1w images.

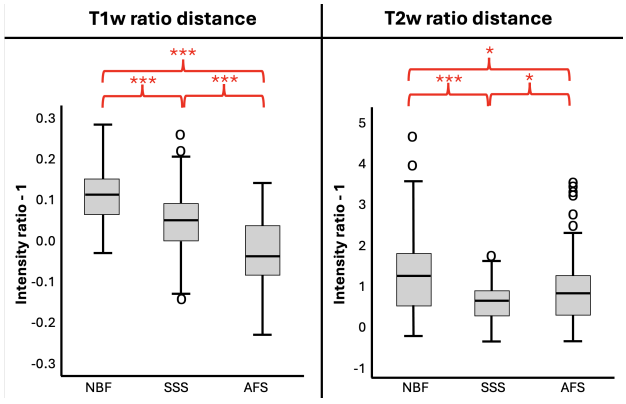
ROI	ROI group	Mean intensity NBF	Mean intensity SSS	Mean intensity AFS	Significance
1	cGM	90.238	90.176	90.538	p>0.05
2	NAWM	79.851*	84.551	94.903*	p=0.001*
3	cGM	87.524	90.257	87.960	p>0.05
4	NAWM	77.856*$^{\Delta}$	84.952*^{O}	93.310$^{\Delta O}$	p=0.024* ; p<0.001$^{\Delta}$; p=0.01^{O}
5	cGM	87.651	87.955	88.200	p>0.05
6	NAWM	80.868*	84.420$^{\Delta}$	92.423*$^{\Delta}$	p<0.001* ; p=0.008$^{\Delta}$
7	cGM	89.628	92.839	92.358	p>0.05
8	NAWM	79.107*	83.894	91.447*	p=0.004*
9	cGM	94.383	95.814	90.306	p>0.05
10	NAWM	90.029*	94.748$^{\Delta}$	102.719*$^{\Delta}$	p<0.001* ; p=0.008$^{\Delta}$
11	cGM	93.330	93.814	88.762	p>0.05
12	NAWM	82.684*	87.500	93.614*	p=0.002*
13	dGM	91.063	88.980	94.632	p>0.05
14	dGM	95.933	93.613	96.396	p>0.05
15	dGM	94.820	99.189	114.024	p>0.05
16	dGM	88.635*	98.031$^{\Delta}$	113.167*$^{\Delta}$	p<0.001* ; p=0.018$^{\Delta}$
17	dGM	86.594*	94.235$^{\Delta}$	109.555*$^{\Delta}$	p<0.001* ; p=0.013$^{\Delta}$
18	dWM	78.258*$^{\Delta}$	85.599*^{O}	90.990$^{\Delta O}$	p=0.001* ; p<0.001$^{\Delta}$; p=0.022^{O}
19	dWM	78.241*	83.991	89.410*	p<0.001*
20	dWM	77.239*$^{\Delta}$	84.736*	87.744$^{\Delta}$	p=0.002* ; p<0.001$^{\Delta}$
21	dWM	77.350*$^{\Delta}$	85.213*^{O}	94.707$^{\Delta O}$	p=0.028* ; p<0.001$^{\Delta}$; p=0.01^{O}
22	dWM	83.406*	91.306$^{\Delta}$	104.085*$^{\Delta}$	p<0.001* ; p=0.01$^{\Delta}$
23	dGM	91.125	89.811	92.204	p>0.05
24	dWM	87.491*	91.252	95.594*	p=0.006*
25	dWM	86.067	87.094	80.846	p>0.05
26	dGM	88.304*	85.734	81.501*	p=0.026*
27	dGM	89.100	88.453	85.422	p>0.05
28	dGM	90.305	86.738	83.141	p>0.05
29	dGM	91.011*	92.863$^{\Delta}$	103.327*$^{\Delta}$	p=0.013* ; p=0.038$^{\Delta}$

Supplemental Table 2. Mean intensities of each of the ROIs of T2w images.

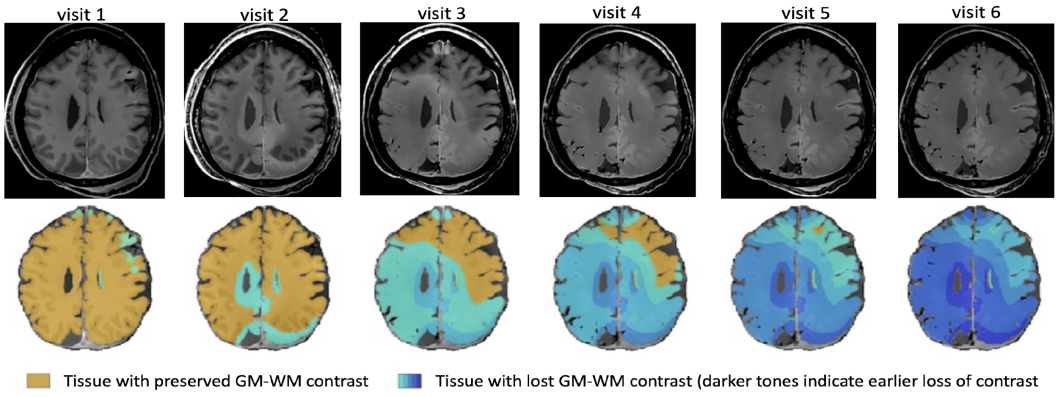
ROI	ROI group	Mean intensity NBF	Mean intensity SSS	Mean intensity AFS	Significance
1	cGM	28.692	34.679	33.390	p>0.05
2	NAWM	12.764*	20.394*	17.894	p=0.005*
3	cGM	24.411	29.693	27.750	p>0.05
4	NAWM	9.732*	18.642*	14.418	p=0.002*
5	cGM	29.151	33.492	28.034	p>0.05
6	NAWM	11.114*	20.725*$^{\Delta}$	13.257$^{\Delta}$	p<0.001* ; p=0.01$^{\Delta}$
7	cGM	23.207	26.322	24.286	p>0.05
8	NAWM	8.948*	15.515*$^{\Delta}$	10.237$^{\Delta}$	p=0.003* ; p=0.021$^{\Delta}$
9	cGM	31.019	38.113	33.314	p>0.05
10	NAWM	14.703*$^{\Delta}$	25.233*	20.908$^{\Delta}$	p<0.001* ; p=0.046$^{\Delta}$
11	cGM	36.639	39.165	37.316	p>0.05
12	NAWM	12.033*	24.463*	19.257	p<0.001*
13	dGM	17.711*$^{\Delta}$	27.673*	25.537$^{\Delta}$	p=0.009* ; p=0.027$^{\Delta}$
14	dGM	20.113*$^{\Delta}$	32.912*	28.780$^{\Delta}$	p=0.002* ; p=0.046$^{\Delta}$
15	dGM	16.968*	28.284*$^{\Delta}$	20.542$^{\Delta}$	p=0.002* ; p=0.026$^{\Delta}$
16	dGM	10.655*	19.571*	15.718	p=0.005*
17	dGM	10.220	18.595	15.267	p>0.05
18	dWM	10.852*	22.459*	16.581	p=0.002*
19	dWM	12.656*	23.465*$^{\Delta}$	16.223$^{\Delta}$	p<0.001* ; p=0.028$^{\Delta}$
20	dWM	10.797*$^{\Delta}$	25.383*	19.537$^{\Delta}$	p<0.001* ; p=0.01$^{\Delta}$
21	dWM	10.002*	17.275*	13.229	p=0.002*
22	dWM	11.587*	19.183*	15.457	p=0.021*
23	dGM	28.391	32.728	30.048	p>0.05
24	dWM	10.950	20.359	21.670	p>0.05
25	dWM	22.590	19.289	25.963	p>0.05
26	dGM	32.197	37.644	35.221	p>0.05
27	dGM	31.737	38.093	34.308	p>0.05
28	dGM	32.104	40.326	36.972	p>0.05
29	dGM	18.561*	33.002*	26.729	p<0.001*



Supplemental figure 1. Quantitative assessment of the mean intensity in each ROI group in relation to the fixative. Left four graphs show the intensities in the T1-weighted sequence, while the four right graphs represent the assessment in T2-weighted images. cGM=Cortical gray matter; NAWM=Normal-appearing white matter; dGM=Deep gray matter; dWM=Deep white matter; NBF=Neutral-buffered formalin; SSS=Salt-saturated solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution.*0.01 < p < 0.05 ; **0.001 < p < 0.01; ***p < 0.001 after a Bonferroni correction.



Supplemental figure 2. Quantitative assessment of the difference of the ratios with 1 (i.e., GM-WM ratio value minus 1) to reflect the GM-WM contrast. A value of 0 reflects no contrast; the higher the value, the higher the contrast. A negative value reflects a non-inverted contrast. In T1w, we found that the values are closer to 0 than in T2w images, reflecting less contrast. In T1w, AFS-fixed brains show the lowest and non-reversed contrast, with negative values and closest to 0. In T2w images, SSS-fixed brains showed closest values to 0, reflecting less contrast than in the brains fixed with the other two solutions, but still further from 1 than in T1w, translating the overall higher contrast of T2w images. NBF=Neutral-buffered formalin; SSS=Salt-saturated solution; AFS=Alcohol-formaldehyde solution.*0.01 < p < 0.05 ; ***p < 0.001 after a Bonferroni correction.



Supplemental figure 3. Longitudinal assessment of the GM-WM contrast of an *in situ* brain fixed by perfusion with NBF. This figure was presented at the annual conference of the Society for Neuroscience in 2021 as a virtual poster presentation. First scan (visit 1) was done 2 months after the injection of NBF, which showed no inversion of the contrast (most of the tissue showed preserved GM-WM contrast, reflecting no inversion of the GM-WM). At visit 2, occipital lobes and periventricular spaces showed loss of GM-WM contrast, indicating the beginning of the inversion of the contrast. Inversion of the contrast was completed at visit 6 (8 months after the injection of NBF). (Frigon et al., 2021, Society for Neuroscience).

5.8 References

1. Lerch, J.P., et al., Studying neuroanatomy using MRI. Nat Neurosci, 2017. 20(3): p. 314-326.

2. Dadar, M., et al., Diffusely abnormal white matter converts to T2 lesion volume in the absence of MRI-detectable acute inflammation. Brain, 2022. 145(6): p. 2008-2017.

3. Dadar, M., et al., White matter hyperintensity distribution differences in aging and neurodegenerative disease cohorts. Neuroimage Clin, 2022. 36: p. 103204.

4. Maranzano, J., et al., Automated separation of diffusely abnormal white matter from focal white matter lesions on MRI in multiple sclerosis. Neuroimage, 2020. 213: p. 116690.

5. Hoffmann, A., et al., Validation of in vivo magnetic resonance imaging blood-brain barrier permeability measurements by comparison with gold standard histology. Stroke, 2011. 42(7): p. 2054-60.

6. Post, M.J., A new era in neuroradiology: ex vivo validation of in vivo imaging research. AJNR Am J Neuroradiol, 2008. 29(2): p. 212-3.

7. Bouman, P.M., et al., Histopathology-validated recommendations for cortical lesion imaging in multiple sclerosis. Brain, 2020. 143(10): p. 2988-2997.

8. Bobinski, M., et al., The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. Neuroscience, 2000. 95(3): p. 721-5.

9. Laule, C. and G.R.W. Moore, Myelin water imaging to detect demyelination and remyelination and its validation in pathology. Brain Pathol, 2018. 28(5): p. 750-764.

10. Dadar, M., et al., The Douglas-Bell Canada Brain Bank Post-mortem Brain Imaging Protocol. Aperture Neuro, 2024. 4.

11. Miller, K.L., et al., Diffusion imaging of whole, post-mortem human brains on a clinical MRI scanner. Neuroimage, 2011. 57(1): p. 167-181.

12. Pfefferbaum, A., et al., Postmortem MR imaging of formalin-fixed human brain. NeuroImage, 2004. 21(4): p. 1585-1595.

13. Schumann, C.M., M.H. Buonocore, and D.G. Amaral, Magnetic Resonance Imaging of the Post-Mortem Autistic Brain. Journal of Autism and Developmental Disorders, 2001. 31(6): p. 561-568.

14. Tendler, B.C., et al., The Digital Brain Bank, an open access platform for post-mortem imaging datasets. eLife, 2022. 11: p. e73153.

15. McFadden, W.C., et al., Perfusion fixation in brain banking: a systematic review. Acta Neuropathol Commun, 2019. 7(1): p. 146.

16. Insausti, R., et al., Ex vivo, in situ perfusion protocol for human brain fixation compatible with microscopy, MRI techniques, and anatomical studies. Frontiers in Neuroanatomy, 2023. 17.

17. Frigon, E.-M., et al., Antigenicity is preserved with fixative solutions used in human gross anatomy: A mice brain immunohistochemistry study. Frontiers in Neuroanatomy, 2022. 16.

18. Frigon, E.M., et al., Comparison of histological procedures and antigenicity of human post-mortem brains fixed with solutions used in gross anatomy laboratories. Front Neuroanat, 2024. 18: p. 1372953.

19. Shatil, A.S., K.M. Matsuda, and C.R. Figley, A Method for Whole Brain Ex Vivo Magnetic Resonance Imaging with Minimal Susceptibility Artifacts. Frontiers in neurology, 2016. 7: p. 208-208.

20. Raman, M.R., et al., Regional T(1) relaxation time constants in Ex vivo human brain: Longitudinal effects of formalin exposure. Magn Reson Med, 2017. 77(2): p. 774-778.

21. Shatil, A.S., et al., 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 (Lausanne), 2018. 5: p. 31.

22. Dawe, R.J., et al., Postmortem MRI of human brain hemispheres: T2 relaxation times during formaldehyde fixation. Magn Reson Med, 2009. 61(4): p. 810-8.

23. Tovi, M. and A. Ericsson, Measurements of T1 and T2 over time in formalin-fixed human whole-brain specimens. Acta Radiol, 1992. 33(5): p. 400-4.

24. Birkl, C., et al., Effects of formalin fixation and temperature on MR relaxation times in the human brain. NMR Biomed, 2016. 29(4): p. 458-65.

25. Del Signore, F., et al., Volumetric assessment and longitudinal changes of subcortical structures in formalinized Beagle brains. PLoS One, 2022. 17(10): p. e0261484.

26. Kotrotsou, A., et al., Ex vivo MR volumetry of human brain hemispheres. Magn Reson Med, 2014. 71(1): p. 364-74.

27. Anbeek, P., et al., Probabilistic segmentation of brain tissue in MR imaging. Neuroimage, 2005. 27(4): p. 795-804.

28. Dadar, M., et al., Performance comparison of 10 different classification techniques in segmenting white matter hyperintensities in aging. Neuroimage, 2017. 157: p. 233-249.

29. Kojima, M., et al., Gray–white matter contrast reversal on T1-weighted spin-echo in postmortem brain. Forensic Science International, 2024. 360: p. 112031.

30. Maranzano, J., et al., A novel ex vivo, in situ method to study the human brain through MRI and histology. J Neurosci Methods, 2020. 345: p. 108903.

31. Coupe, P., et al., An optimized blockwise nonlocal means denoising filter for 3-D magnetic resonance images. IEEE Trans Med Imaging, 2008. 27(4): p. 425-41.

32. Sled, J.G., A.P. Zijdenbos, and A.C. Evans, A nonparametric method for automatic correction of intensity nonuniformity in MRI data. IEEE Trans Med Imaging, 1998. 17(1): p. 87-97.

33. Dadar, M., V.S. Fonov, and D.L. Collins, A comparison of publicly available linear MRI stereotaxic registration techniques. Neuroimage, 2018. 174: p. 191-200.

34. Frigon, E.M., et al., T1- and T2-weighted MRI signal and histology findings in suboptimally fixed human brains. J Neurosci Methods, 2024. 412: p. 110301.

35. Kim, J.S., D.W. Kang, and S.U. Kwon, Intracranial atherosclerosis: incidence, diagnosis and treatment. J Clin Neurol, 2005. 1(1): p. 1-7.

36. Sacco, R.L., et al., Race-Ethnicity and Determinants of Intracranial Atherosclerotic Cerebral Infarction. Stroke, 1995. 26(1): p. 14-20.

37. Boban, J., et al., Gradient Patterns of Age-Related Diffusivity Changes in Cerebral White Matter. Front Neurol, 2022. 13: p. 870909.

38. Frigon, E.M., et al., Longitudinal changes in gray to white matter T1-weighted contrat and T2* relaxation times in an ex vivo-in situ human brain fixed by perfusion, in Society for Neuroscience. 2021: Virtual.

39. Xue, H., et al., Automatic segmentation and reconstruction of the cortex from neonatal MRI. NeuroImage, 2007. 38(3): p. 461-477.

40. Despotović, I., B. Goossens, and W. Philips, MRI segmentation of the human brain: challenges, methods, and applications. Comput Math Methods Med, 2015. 2015: p. 450341.

41. Khaled, A., J.-J. Han, and T.A. Ghaleb, Learning to detect boundary information for brain image segmentation. BMC Bioinformatics, 2022. 23(1): p. 332.

42. Zilles, K., N. Palomero-Gallagher, and K. Amunts, Development of cortical folding during evolution and ontogeny. Trends Neurosci, 2013. 36(5): p. 275-84.

43. Zilles, K., et al., Gyrification in the Cerebral Cortex of Primates. Brain Behavior and Evolution, 2008. 34(3): p. 143-150.

44. Gebhard, R., K. Zilles, and E. Armstrong, Gross Anatomy and Gyrification of the Occipital Cortex in Human and Non-Human Primate, in Functional Organisation of the Human Visual Cortex, B. Gulyas, D. Ottoson, and P.E. Roland, Editors. 1993, Pergamon. p. 101-109.

45. Schmierer, K., et al., Quantitative magnetic resonance of postmortem multiple sclerosis brain before and after fixation. Magn Reson Med, 2008. 59(2): p. 268-77.

46. Schmierer, K., et al., Effects of formalin fixation on magnetic resonance indices in multiple sclerosis cortical gray matter. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2010. 32(5): p. 1054-1060.

47. Birkl, C., et al., Effects of concentration and vendor specific composition of formalin on postmortem MRI of the human brain. Magn Reson Med, 2018. 79(2): p. 1111-1115.

48. Karolis, V.R., et al., Spatial gradients of healthy aging: a study of myelin-sensitive maps. Neurobiol Aging, 2019. 79: p. 83-92.

49. Koji, T., Reflections on the Principles of Fixation in Histochemistry and Cytochemistry: With a Special Focus on Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. Acta Histochem Cytochem, 2025. 58(2): p. 31-43.

50. Hagiwara, A., et al., Sodium MR Neuroimaging. AJNR Am J Neuroradiol, 2021. 42(11): p. 1920-1926.

Chapitre 6 – Article 5 – Courte communication – T1- and T2-weighted MRI signal and histology findings in suboptimally fixed human brains

6.1 Préface

Ce chapitre inclut le dernier article présenté de cette thèse qui fait l'objet d'une courte communication qui a été publiée en octobre 2024 dans la revue Journal of Neuroscience Methods. Cette courte communication a été publiée à la suite du développement des protocoles d'IRM sur les cerveaux *ex vivo in situ*, mais où le contraste des images en séquence T1-pondérée était hétérogène. Nous avons donc extrait les cerveaux, qui semblaient mal fixés (sang restant visible macroscopiquement), mais dont l'histologie était tout de même de bonne qualité. De ce fait, nous avons recueillis 5 spécimens où ce contraste était visible, pour rapporter les observations dans un rapport de cas.

Cet article a été publié comme :

Frigon EM, Pharand P, Gérin-Lajoie A, Sanches LG, Boire D, Dadar M, Maranzano J. (2024) T1- and T2-weighted MRI signal and histology findings in suboptimally fixed human brains. J Neurosci Methods. 2024 Oct 16;412:110301. doi: 10.1016/j.jneumeth.2024.110301.

6.1.1 Contribution des auteurs

Eve-Marie Frigon : Collecte de données, protocoles expérimentaux, organisation des données, analyses des données, écriture du manuscrit.

Philippe Pharand : Protocoles expérimentaux, écriture du manuscrit.

Amy Gérin-Lajoie : Protocoles expérimentaux, révision du manuscrit.

Liana Guerra Sanche : Ressources, protocoles expérimentaux

Denis Boire : Révision du manuscrit.

Mahsa Dadar : Ressources, Révision du manuscrit.

Josefina Maranzano : Ressources, écriture du manuscrit.

6.1.2 Contribution scientifique

Cette étude a été publiée en libre accès dans un journal où la communauté scientifique pourra utiliser les protocoles histologiques et les protocoles d'IRM *ex vivo* qui ont été développés sur des cerveaux post-mortem. Cette communication permet de conclure que des analyses par IRM et par histologie sont réalisables même lorsque les cerveaux ne sont pas fixés de manière optimale.

6.2 Abstract

Neuroscientific research that requires brain tissue depends on brain banks that provide very small tissue samples fixed by immersion in neutral-buffered formalin (NBF), while anatomy laboratories could provide full brain specimens. However, these brains are generally fixed by perfusion of the full body with solutions other than NBF generally used by brain banks, such as an alcohol-formaldehyde solution (AFS) that is typically used for dissection and teaching. Therefore, fixation quality of these brains needs to be assessed to determine their usefulness in post-mortem investigations through magnetic resonance imaging (MRI) and histology, two common

neuroimaging modalities. Here, we report the characteristics of five brains fixed by full body perfusion of an AFS from our Anatomy Laboratory suspected of being poorly fixed, given the altered signal seen on T1w MRI scans *in situ*. We describe 1- the characteristics of the donors; 2- the fixation procedures applied for each case; 3- the tissue contrast characteristics of the T1w and T2w images; 4- the macroscopic tissue quality after extraction of the brains; 5- the macroscopic arterial characteristics and presence or absence of blood clots; and 6- four histological stains of the areas that we suspected were poorly fixed. We conclude that multiple factors can affect the fixation quality of the brain. Nevertheless, cases in which brain fixation is suboptimal, consequently altering the T1w signal, still have T2w of adequate gray-matter to white-matter contrast and may also be used for histology stains with sufficient quality.

6.3 Introduction

Brain banks typically provide small tissue samples for research that are fixed by immersion in neutral-buffered formalin (NBF), while anatomy laboratories could provide full brain specimens. However, these are generally fixed by perfusion of the full body with different solutions than those used by brain banks, such as an alcohol- formaldehyde solution (AFS) typically used for dissection and teaching. Therefore, the fixation quality of these brains needs to be assessed to determine their utility in post-mortem investigations through magnetic resonance imaging (MRI) and histology, two common neuroimaging modalities. Our previous work has shown the preservation of antigenicity and histology quality in brains fixed with AFS (Frigon et al., 2022, 2024), while other studies have also demonstrated good macroscopic (Hammer et al., 2012, Benet et al., 2014), and microscopic quality (Tomalty et al., 2019, Rahman et al., 2021, Nicholson et al., 2005) of specimens fixed with alcohol solutions. These promising results could lead to a new source of cerebral tissue for neuroscientists, but further investigation on MRI quality of *ex vivo* brains fixed with AFS is necessary.

Perfusion fixation used by anatomy laboratories consists of injecting a chemical solution through the main arteries of the body (carotid arteries or femoral arteries) using a pump, which leads to circulation of the fixative through the entire cardiovascular system, including brain vessels (Balta et al., 2015, Insausti et al., 2023). Therefore, this fixation technique may be influenced by various

factors, such as 1- the extent of pre-mortem blood coagulation (related to shear stress, pH changes, etc.) (Klaubert et al., 1988); 2- the post-mortem interval (PMI) until the fixative is perfused, with shorter intervals leading to better results (Insausti et al., 2023), but these decline as the PMI lengthens, during which the rigor mortis (i.e., muscle contraction and vascular rigidity in the first few minutes after death) (Hyodoh et al., 2012) and lividity come about (i.e., the blood is dependent of gravity, and therefore stalls within the first hours after death), resulting in increased generation of post-mortem blood clots (Shiotani et al., 2002, Jackowski et al., 2006); 3- the perfusion method (i.e., the direction of the injection from the carotid artery that may impact the movement of the clots); and 4- the volume of fixative injected, determined by the resistance of the vascular network preventing further injection of more solution (i.e., liquid backflows in reverse, limiting the volume injected), and 5- the number and type of comorbidities that affect the vessel walls (e.g., atherosclerosis). Regardless of the cause, these factors lead to suboptimal fixation of the brain, potentially limiting its use in research that requires imaging techniques such as MRI and histology.

Thus, we report here the characteristics of two basic MRI modalities and four histology stains frequently used in neuroscientific research, applied to five brains from the University of Quebec in Trois-Rivieres' Anatomy Laboratory that had areas suspected of being poorly fixed after perfusion of the full body with an AFS. We also report a sixth case which was optimally fixed with AFS as a control for qualitative comparison. These cases were obtained following the ethical guidelines of the University's Ethic Subcommitee on Anatomical Teaching and Research.

We describe 1- the characteristics of the donors; 2- the fixation procedures applied; 3- the T1w images (*in-situ* brain MRIs whose signal raised the suspicion of poor fixation) and the T2w images; 4- the macroscopic tissue quality after extraction of the brains (Maranzano et al., 2020); 5- the macroscopic arterial characteristics and presence or absence of blood clots post-extraction (Note: this assessment does not allow us to determine whether the clots were formed pre- or post-mortem); and 6- four histological stains of the areas that we suspected poorly fixed. We chose two histochemical stains, such as Hematoxylin & Eosin (H&E) and Luxol Fast Blue (LFB), and immunohistochemistry (IHC) of Neuronal Nuclei (NeuN) and Myelin Proteolipid Protein (PLP) antigens, because of their ubiquity in neuro- scientific research.

6.4 Case description

Demographic and fixation procedures are shown in Table 1. The signal from the T1w MRI scans showed loss of gray matter (GM) to white matter (WM) contrast for specific regions and evidence of air inside the ventricles (Table 2, Fig. 1). The loss of GM-WM contrast was seen in areas of macroscopic suboptimal fixation, which was corroborated by visual inspection after extraction, while the presence of air was coincident with damage to the meninges during the head preparation (Maranzano et al., 2020). Case 6 T1w and T2w images, as well as all five T2w images did not show any GM-WM contrast anomaly (Fig. 1).

Table 1 – Demographic and fixation procedures

Cases	Age at death	Sex	Cause of death	PMI (hours)	Liters of AFS perfused	Scan delay (days)
1	94	F	Dysphagia, stroke	21	14	10
2	105	F	Anorexia	40	20	10
3	74	M	Parkinson	20	24	8
4	71	M	Cardiac arrest	35	20	7
5	63	M	Hip fracture	19	18	4
6	80	F	Cancer	23	24	0

F=female; M=male; PMI=Post-mortem interval; AFS=Alcohol-formaldehyde solution

Table 2 – Affected regions on MRI according to the blood clots in major brain vessels.

Cases	Affected T1w signal	Anterior cerebral artery	Middle cerebral artery	Posterior cerebral artery
1	All fronto-parietal	Both: absence of BC	Both: absence of BC	Both: absence of BC
2	All parietal, part of the occipital	Right: totally obstructed Left: partially obstructed	Right: partially obstructed Left: totally obstructed	Both: absence of BC

3	All fronto-parietal, part of the occipital	Right: totally obstructed Left: absence of BC	Both: totally obstructed	Both: totally obstructed
4	Parietal left, laterally	Right: partially obstructed Left: absence of BC	Right: partially obstructed Left: absence of BC	Both: absence of BC
5	Parietal left, laterally	Both: absence of BC	Both: partially obstructed	Both: absence of BC

BC=Blood clots; Both=left and right hemisphere

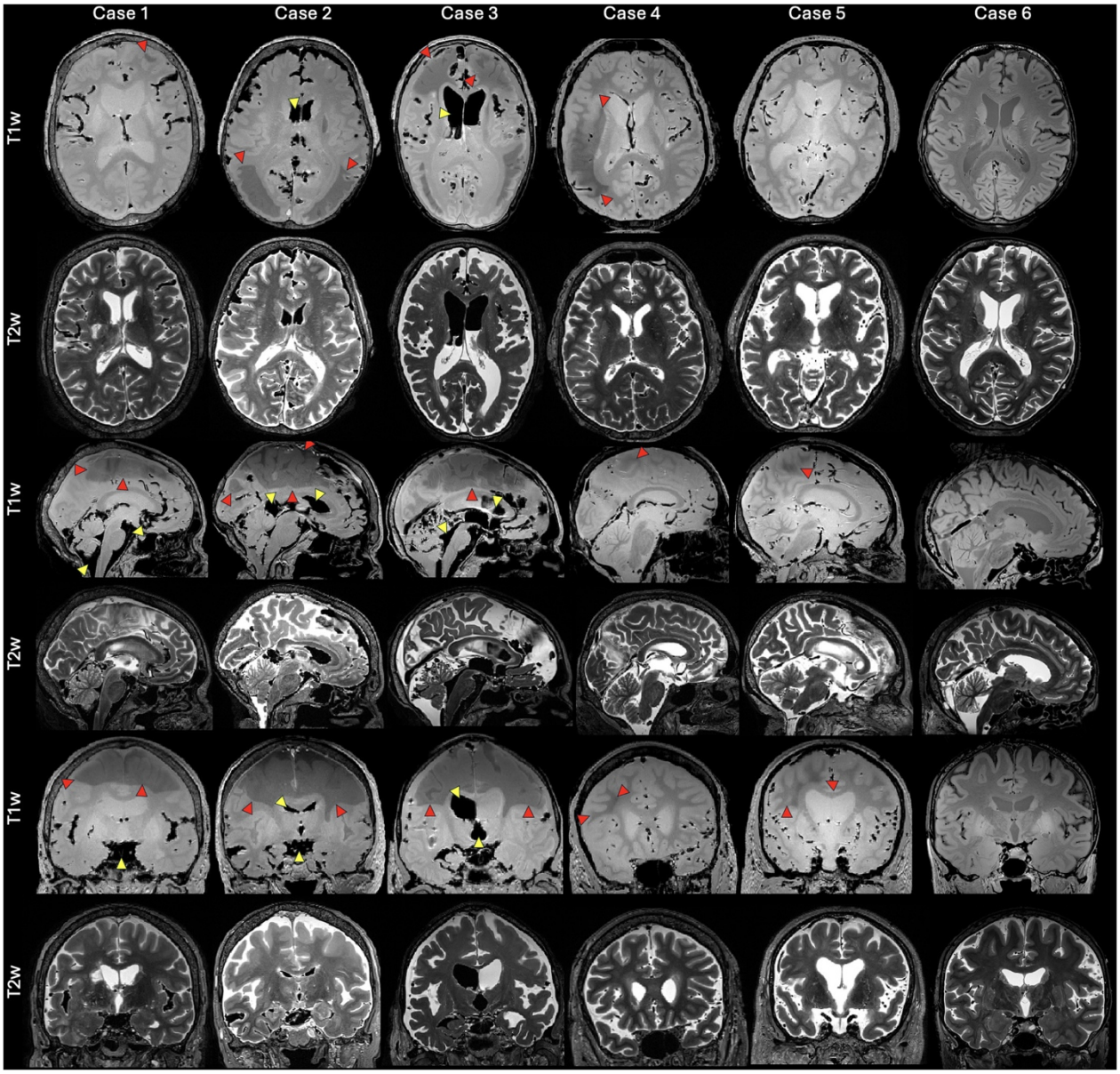


Fig. 1. MRI contrast when the fixation is suboptimal (Cases 1–5) compared to a well AFS-fixed brain (Case 6). In T1-weighted images, red arrows show borders of a darker contrast showing a sub-fixation of the tissue, reflected by the loss of GM-WM contrast. Yellow arrows show the absence of signal in the ventricles, reflected by accumulation of air and loss of cerebrospinal fluid. T2-weighted images show the same level as the T1w without the loss of GM-WM contrast. Note: heads specimens are severed at the cervical column level and the meninges are tied around the spinal cord to prevent the loss of CSF, but the friability of the meningeal tissue predisposes tears that allow the CSF to escape and air to enter the subarachnoid ventricular spaces [13].

Upon brain extractions, we observed that the dura-mater was soft and friable, and residual blood remained under the arachnoid layers (Fig. 2A), that we speculate is related to suboptimal perfusion. Following removal of the meninges (in specimens for which it was feasible ac- cording to the texture, or after a post-fixation procedure, see details below), the brain tissue was partially torn and/or lost due to friability, resembling the texture of fresh specimens (Fig. 2B). Also, the visual inspection of the main brain arteries (Willis's circle) revealed the presence of blood clots (Fig. 2C, Table 2). Finally, brains were cut into approximately 1 cm-thick coronal slices and even after 5 days of post- fixation in NBF, pink areas remained visible, reflecting the presence of residual blood and suboptimal fixation (Fig. 2D). These areas coincided with lower GM-WM contrast on T1w images (Fig. 2E). After 11 days of post-fixation, the pink coloration disappeared, but the tissue was still soft and fragile (Fig. 2F).

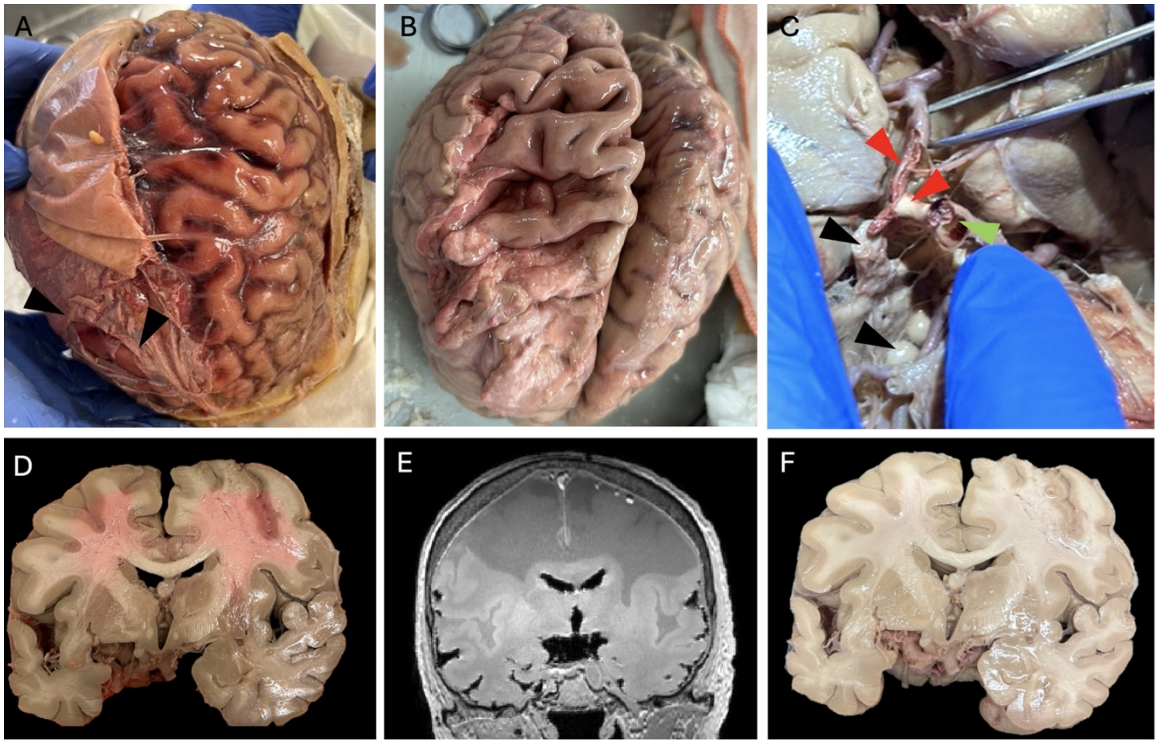


Fig. 2. Macroscopic visual inspection of the Case 2. A) Photo of the brain after removal of the calvaria and the dura. Blood is visible under the arachnoid layer of the meninges. Black arrowhead shows the poor quality of the dura. B) Loss of tissue after trying to remove the arachnoid layer. Tissue is very friable, fragile, soft and mushy. C) Presence of a fibrin blood clot in the left medial cerebral artery (Red arrowheads). Green arrowhead shows the left internal carotid artery, also

filled with blood clots. Black arrowheads show the optical nerve and mamillar bodies, as a reference. D) Coronal section showing pink areas (remaining blood) that correspond to poorly fixed area as per the signal of the MRI showed on panel E (coronal level of the MRI image close to panel D). F) Same coronal section as panel D after a post- fixation of 10 days in formaldehyde.

In cases 4 and 5, 1 cm^3 blocks of the pink regions were sampled to assess histology quality using H&E and LFB, and antigenicity preservation of NeuN and PLP using IHC (for details on the protocols, see Frigon et al., 2024). This processing was subsequently applied to another 1 cm^3 block (removed from a region contiguous to the previous block) after 8 days of post-fixation. H&E labeled neurons and glial cells before and after post-fixation, in an equivalent manner. No difference in the cell morphology was observed before and after post-fixation. NeuN labeling was present before post-fixation, but the contrast between cells and background increased following post-fixation, and the borders of the cell bodies were sharper (better definition of the cells, reflecting a better stain). PLP labeling was present and of good quality before and after post-fixation. Finally, LFB showed more conspicuous labeled fibers after post-fixation. These observations were also compared with previously processed sections of an optimally AFS-fixed brain (Case 6), showing that overall, the five suboptimally fixed specimens exhibited histology quality comparable to that of an optimally fixed specimen (Fig. 3).

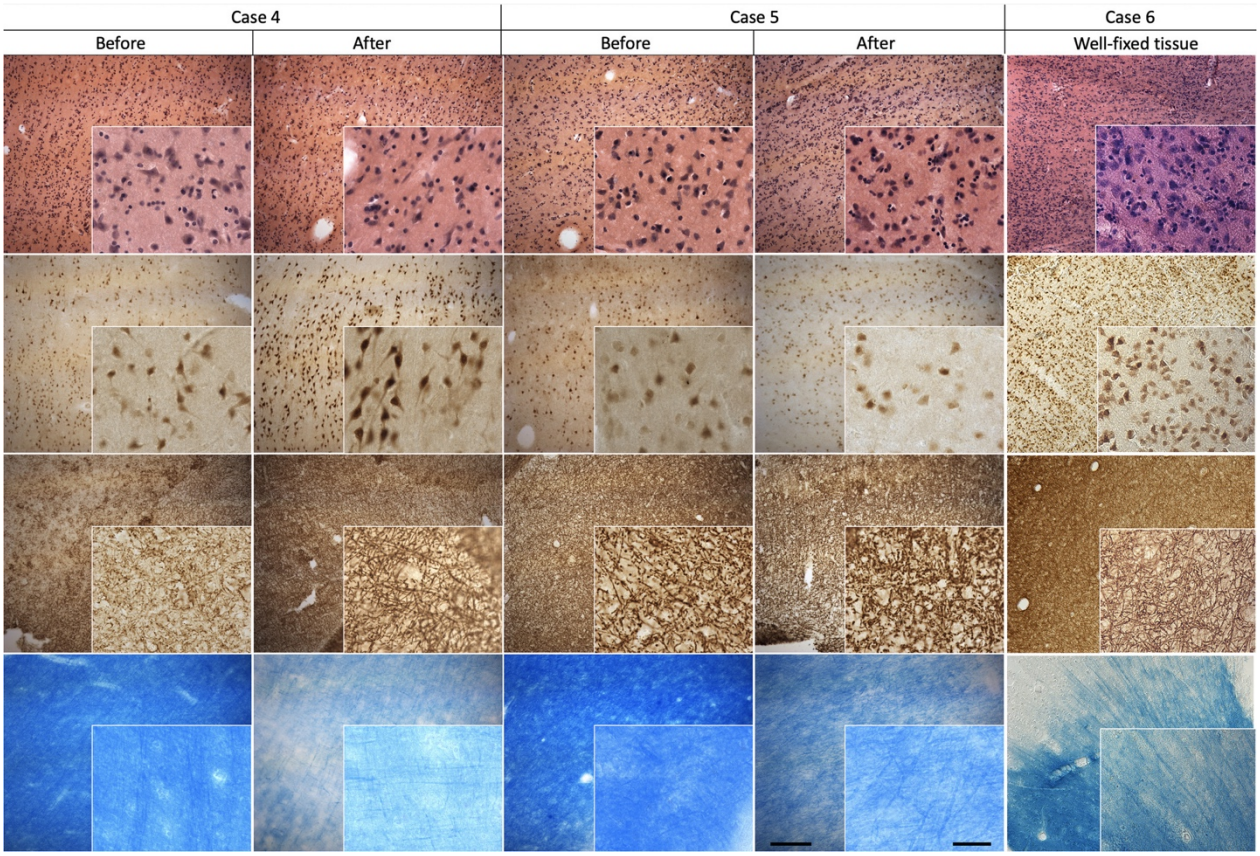


Fig. 3. Histology quality of poorly fixed regions (based on MRI loss of GM-WM contrast of Case 4 and 5), before and after post-fixation in NBF, compared with well-fixed tissue (Case 6). Photomicrographs (10X) of H&E (1st row), Neuronal Nuclei (2nd), Proteolipid protein of the myelin (3rd) and Luxol Fast Blue (4th) stains. Scale bar = 100 µm. In inserts, photomicrographs (60X) of the same staining, zoomed in to see the cellular shape and background. Scale bar = 50 µm.

6.5 Discussion

In this report, five brains were suspected of suboptimal fixation after the T1w images showed loss of GM-WM contrast, which is not usually the case in optimally AFS-fixed brains (such as Case 6) that do show conspicuous GM-WM contrast. We considered different factors that might impact the fixation process. Although these factors might not be preventable in anatomy laboratories that work with body donors, potential alternatives might be considered to minimize them. 1) Cause of death. This could impact the vascular patency and vascular permeability of the blood

vessels, but this factor is not modifiable. 2) Vascular pathology. As the age of the donors is generally beyond 75 years at the time of death (this series had an average age of 81 years at the time of death) and most of the population has different degrees of vascular pathology at that stage in life, the presence of vascular pathology is inevitable. An exclusion criterion based on vascular pathology would be both unfeasible and shortsighted, as presence of vascular pathology is part of the natural process of aging and even macroscopically poorly fixed tissue can provide acceptable T2w images and is sufficiently preserved to undergo basic histological stains. However, studies that do not specifically target vascular disorders could exclude cases with severe and clinically documented history of cerebrovascular pathology, which would increase the odds of obtaining optimally fixed specimens. 3) PMI, which also impacts lividity and blood clots formation. Our anatomy lab has a criterion of PMI not exceeding 48 hours to prevent these con- founds. Although our limited sample size precludes a quantitative analysis of fixation quality in relation to the PMI, one potential optimization strategy would be to accept specimens with lower PMI (e.g. 12 or 24 hours), to minimize the occurrence of blood clots. However, this would significantly reduce the number of specimens available for research (e.g. in our series, this would have reduced the sample size to 3 cases). 4) Amount of fixative injected, as lower amounts of fixative that reach the brain could correspond to lower fixation quality. Although our small sample size precludes a quantitative analysis of the relationship between the volume of fixative injected and fixation quality, a potential optimization criterion could be the exclusion of bodies where the full amount of fluid commonly used (i.e. 20 liters) was not possible to inject. 5) The injection procedure could impact fixation quality. Ideally, perfusion through the carotid arteries should be directed upwards towards the brain. However, fixative injection in our anatomy laboratory currently favors whole-body perfusion, from the common carotid artery, in the direction of the heart. Future studies are warranted to compare the impact of direction of fixative injection on fixation quality in bodies with similar characteristics. 6) Finally, prior to the injection of the fixative, the blood is removed (i.e., washed out) from the body using a chemical solution (e.g., Proflow, Dodge Company, Inc., SKU107031). However, whether Proflow can effectively drain 100 % of the blood and remove blood clots (either formed pre- or post-mortem) has yet to be determine. To provide information on this, we also described the presence or absence of blood clots in the main brain arteries.

In our case series, case 1 was perfused with a low volume of 14 liters of fixative (while approximately 22 liters are usually injected). This might have led to a lesser amount of fixative reaching the brain. Moreover, a history of stroke could have affected the vascular patency. Interestingly, no clots were observed in the main brain arteries. For case 2, the long PMI may have exacerbated blood clotting in the middle and anterior cerebral arteries, which is consistent with the vascular territories depicted on T1w. Case 3 had Parkinson's disease, potentially affecting the overall brain structure and tissue quality. Also, the main cerebral arteries were clogged, which was consistent with the poorly fixed territories shown macroscopically and on T1w. In case 4, there was also a long PMI (second longer PMI of the series) that we speculate may have favored the presence of clots in the right anterior and middle cerebral arteries. This is inconsistent with the GM-WM contrast in the left parietal territories, as shown on T1w. Finally, in case 5, both middle cerebral arteries were partially obstructed, and there was a small part of the tissue in the left parietal lobe that lost GM-WM contrast on T1w. These observations show that the five cases were each affected differently, reflecting the difficulty of assessing the impact of confounding variables on the fixation quality of the brain. Hypothetically, partially obstructed brain vessels may still allow some fixative to reach the tissue, resulting in unpredictable impacts on the fixation quality of the respective region. In addition, clots in small vessels and overall normalcy of the tissue structure and level of post-mortem decay as a function of PMI may have a higher impact on the fixation quality, compared to macroscopic blood clots which might still allow the fixative to reach the tissue. In other words, it would be impossible to predict GM- WM contrast and tissue characteristics in the context of suboptimal brain fixation due to partial obstruction of the fixative flow or other factors. Furthermore, we cannot ascertain whether the presence of blood clots is related to prior medical conditions of the patients (i.e., pre-mortem in nature), a purely post-mortem phenomenon, or a combination of both. Future work is warranted to determine whether coagulation is more prominent immediately after death. If so, more efficient techniques to wash out the blood (e.g., using chemicals that could dissolve blood clots, other than Proflow) before perfusing the fixative solution throughout the body could improve fixation.

Our brain specimens were post-fixed by immersion in NBF because of the suspected suboptimal fixed tissue, and because it was a necessary step in some cases for removal of the leptomeninges

since the post- fixation hardens the tissue facilitating the removal of the arachnoid with less tissue damage. However, the histology quality of the poorly fixed tissue was sufficient, so post-fixation of these brains did not significantly increase cell labeling. We assessed IHC for PLP, NeuN and H&E and Luxol Fast blue before and after post-fixation to determine whether the suboptimally fixed tissue would be suitable for basic frequently used histological stains. Future studies with larger sample sizes are warranted to assess the impact of microscopic vascular quality on the quality of the stains. Contrary to our expectations, we found no evidence that the initial suboptimal fixation in AFS substantially impacts the staining quality of the tissue. Regardless of the factors that lead to poor T1w MRI contrast and macroscopically friable tissue (e.g. vascular, PMI, or post-mortem coagulation), this case series shows that post- fixation is not always necessary for histological studies. Even if there was a minor improvement in the background contrast quality of the NeuN IHC, we did not observe morphological changes in the cells which were comparable to our optimally fixed case (case 6). Nevertheless, we acknowledge that our morphological cell assessment was limited and only qualitative. As such, future studies with larger sample sizes are necessary to better characterize potential morphological changes. Regarding *ex-situ* MRI quality, this imaging method might benefit from post-fixation since it could harden the tissue and potentially retrieve the GM-WM contrast. This warrants further investigations, which are beyond the scope of this report. Finally, we acknowledge that immersion fixation (in NBF), as commonly used by brain banks, would be the ideal solution to avoid fixation inhomogeneities related to vascular patency, but this method also presents limitations, such as an inconsistent fixation of the superficial tissue compared to deeper regions (Maranzano et al., 2020) and substantial deformation of the tissue resulting from extraction of fresh unfixed brains (Beach et al., 1987, Insausti et al., 2023, McFadden et al., 2019). Perfusion fixation followed by immersion could be a good alternative to insure efficient fixation. However, such a design also presents limitations, including increase in fixation period and costs. *Ex situ* perfusion is also an efficient alternative as the vascular quality may be inspected prior to perfusion (McFadden et al., 2019). However, this approach has limited feasibility in anatomy laboratories (which use the full body for teaching purposes), as extraction of the fresh brain before perfusion prevents the dissection of the head

for other purposes. As we demonstrated previously, perfusion fixation using AFS is feasible for neuroscientific research using histology (Frigon et al., 2024).

In brief, we conclude that multiple factors can affect the fixation quality of the brain and could be considered as confounders. Nevertheless, cases in which brain fixation is suboptimal, consequently altering the T1w signal, still have T2w of adequate quality and may also be used for some basic histology procedures.

6.5.1 Acknowledgements

We would like to thank the generosity of the body donors and their families for making our projects possible. We also acknowledge funding resources (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada) and the anatomy laboratory staff (Johanne Pellerin, Marie-Eve Lemire, Sophie Plante, Sonia Gauthier, and Kevin Desaulniers) of the Universite du Quebec a Trois-Rivieres for their support and help at the lab. We would also like to thank Elena Drobotea and Roqaie Moqadam from the Cerebral Imaging Center who helped in acquiring the images.

6.6 References

Balta, J.Y., et al., 2015. Human preservation techniques in anatomy: a 21st century medical education perspective. Clin. Anat. 28 (6), 725–734.

Beach, T.G., et al., 1987. Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation. J. Neurosci. Methods 19, 183–192.

Benet, A., et al., 2014. Novel embalming solution for neurosurgical simulation in cadavers. J. Neurosurg. 120 (5), 1229–1237.

Frigon, E.-M., et al., 2022. Antigenicity is preserved with fixative solutions used in human gross anatomy: a mice brain immunohistochemistry study. Front. Neuroanat. 16.

Frigon, E.M., et al., 2024. Comparison of histological procedures and antigenicity of human post-mortem brains fixed with solutions used in gross anatomy laboratories. Front Neuroanat. 18, 1372953.

Hammer, N., et al., 2012. Ethanol-glycerin fixation with thymol conservation: a potential alternative to formaldehyde and phenol embalming. Anat. Sci. Educ. 5 (4), 225–233.

Hyodoh, H., et al., 2012. Vascular measurement changes observed using postmortem computed tomography. Jpn. J. Radio. 30 (10), 840–845.

Insausti, R., et al., 2023. Ex vivo, in situ perfusion protocol for human brain fixation compatible with microscopy, MRI techniques, and anatomical studies. Front. Neuroanat. 17.

Jackowski,C.,etal.,2006.Postmortemimagingofbloodanditscharacteristicsusing MSCT and MRI. Int. J. Leg. Med. 120 (4), 233–240.

Klaubert, W., et al., 1988. The role of coagulation, fibrinogenolysis and fibrinolysis in the development of fluid and clotted cadaver plasma. Thromb. Res 50 (1), 53–63. Maranzano, J., et al., 2020. A novel ex vivo, in situ method to study the human brain

through MRI and histology. J. Neurosci. Methods 345, 108903. McFadden, W.C., et al., 2019. Perfusion fixation in brain banking: a systematic review.

Acta Neuropath Comm. 7, 146. Nicholson, H.D., et al., 2005. A comparison of different embalming fluids on the quality

of histological preservation in human cadavers. Eur. J. Morphol. 42 (4-5), 178–184. Rahman, S.M.N., Alam, T., Alam, N.N., 2021. Preservation of histology by phenol-based

fixative: mini review of recent findings. J. Int. J. Morphol. 39, 50–56. Shiotani, S., et al., 2002. Postmortem intravascular high-density fluid level (hypostasis):

CT findings. J. Comput. Assist Tomogr. 26 (6), 892–893. Tomalty, D., Pang, S.C., Ellis, R.E., 2019. Preservation of neural tissue with a

formaldehyde-free phenol-based embalming protocol. Clin. Anat. 32 (2), 224–230.

Chapitre 7 – Discussion globale

Cette thèse traite des effets de la fixation chimique sur la qualité de différentes colorations histologiques, des images de séquences pondérées d'IRM, et du recalage entre les deux modalités, sur des cerveaux humains des laboratoires d'anatomie (fixés avec une SA et une SSS) en comparaison avec les cerveaux que procurent les banques (fixés avec une SFA). L'objectif global des projets menés était de déterminer si les cerveaux obtenus des laboratoires d'anatomie, fixés avec des solutions mieux adaptées pour l'enseignement et la dissection, pouvaient être utilisés comme ressource de tissu pour la recherche neuroscientifique qui utilise l'IRM et l'histologie de cerveaux ex vivo. Il convient de noter que l'objectif de cette thèse n'était pas de comparer les effets biologiques, chimiques ou physiques des trois solutions sur le cerveau, ni de remplacer les techniques de fixation actuelles (des banques de cerveaux) par une solution ou une méthode que l'on jugerait idéale. Ce travail a plutôt exploré les effets d'autres solutions sur la qualité globale du tissu et d'établir des protocoles expérimentaux qui pourraient être utilisés sur des cerveaux fixés dans les laboratoires d'anatomie du monde entier.

7.1 Méthodes de fixation et populations étudiées

7.1.1 Solutions de fixation utilisées et comparaison des résultats obtenus

Les cerveaux fixés avec la SFA ont été utilisés dans les projets de cette thèse à titre de groupe contrôle, étant donné que les effets de celle-ci sur le volume du cerveau (Del Signore et al., 2022; Mouritzen Dam, 1979; Quester & Schröder, 1997), l'histologie (Fox et al., 1985; Hade et al., 2024; Ma et al., 2024), l'IRM (Dadar et al., 2024; Kojima et al., 2024; Raman et al., 2017; Shatil et al., 2018; Tovi & Ericsson, 1992) et le recalage (Goubran et al., 2015; Stille et al., 2013) sont connus, et que c'est la solution la plus couramment utilisée en neuroanatomie, pour la perfusion des espèces animales (Gage et al., 2012; Wu et al., 2021), et pour la fixation par immersion dans les banques de cerveaux (Beach et al., 1987; McFadden et al., 2019). Les résultats ont montré que le tissu fixé avec la SFA était plus facile à manipuler que celui fixé avec les deux autres solutions (Chapitre 3). Ceci était attendu, puisque les cerveaux sont macroscopiquement plus rigides en raison de la forte concentration de formaldéhyde (McFadden et al., 2019). Cela a mené à un

recalage IRM-histologie plus facile dans les blocs de cerveaux fixés avec la SFA, grâce à la colocalisation avec le tissu de bonne qualité plus élevée (Chapitre 4). La qualité de l'HC s'est également avérée supérieure lorsque les cerveaux étaient fixés avec la SFA (Chapitre 3). Cependant, l'hypothèse générale de base était que la SFA diminuerait la préservation de l'antigénicité des cerveaux, puisqu'elle formerait plus de liens covalents qu'avec les deux autres solutions conséquemment à la concentration de formaldéhyde plus élevée, ce qui fut confirmé (Chapitre 3). Ces résultats concordent avec la littérature qui montre une diminution de l'antigénicité avec une post-fixation dans la SFA (Hade et al., 2024; Ma et al., 2024; Pikkarainen et al., 2010; Webster et al., 2009). La qualité de l'IRM structurelle s'est avérée supérieure dans les cerveaux fixés avec la SFA qu'avec les deux autres solutions, avec des images pondérées en T1 et en T2 avec un contraste plus élevé entre la MB et la MG (Chapitre 5). De plus, les hémisphères fixés au formaldéhyde ont toujours montré une inversion de contraste (en relation au processus de fixation) complète en T1, ce qui était également attendu considérant les résultats d'études d'autres groupes (Dadar et al., 2024; Kojima et al., 2024; Raman et al., 2017).

Les effets de la SSS ont aussi été étudiés puisque cette solution est utilisée dans le laboratoire d'anatomie de l'UQTR pour l'embaumement du corps complet. La SSS est largement utilisée telle que Coleman et Kogan l'ont développé en 1998 (Coleman & Kogan, 1998) et ce, partout à travers le monde (Balta, Cronin, et al., 2015; Balta, Twomey, et al., 2019; Gulati et al., 2020; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016; Homma et al., 2019; Kaliappan et al., 2023; Watanabe et al., 2020). Bien que cette formulation soit largement employée, à notre connaissance, les études présentées dans cette thèse sont les premières à évaluer la qualité de l'immunohistochimie, du recalage et du signal d'IRM des cerveaux fixés avec la SSS. Il était toutefois attendu que la qualité histologique obtenue avec la SSS soit inférieure à celle obtenue avec la SFA ou la SA au niveau de la qualité histologique, puisque l'étude préalable chez les souris (Chapitre 2), ainsi qu'une étude d'un autre groupe sur les cerveaux de rats (Martins-Costa et al., 2022) ont montré une qualité du tissu diminuée. De plus, la qualité macroscopique de fixation des corps est également différente de celle des corps fixés avec la SFA ou la SA (Gulati et al., 2020; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016). Les corps sont macroscopiquement fixés beaucoup plus rapidement (Coleman & Kogan, 1998; Hayashi et al., 2014; Hayashi et al., 2016), probablement en raison d'une combinaison de

plusieurs mécanismes d'action des différents fixateurs inclus dans sa formulation, comme l'alcool isopropylique, le formaldéhyde, mais aussi le sel. Le sel peut en effet agir comme dénaturant des protéines, et utilisé à cette fin dans l'industrie alimentaire[22], bien qu'il ne soit pas considéré comme un fixateur comme tel dans la littérature. Cependant, le fait qu'il absorbe l'eau pourrait faire en sorte que le corps semble plus rapidement fixé (6 semaines), alors que la fixation cellulaire et moléculaire n'est peut-être pas encore complétée, surtout lorsque l'on considère le concept de diffusion de l'eau à travers une membrane, ce qui pourrait expliquer les résultats de moindre qualité obtenus. Malgré les défis supplémentaires avec la SSS, les techniques se sont avérées praticables. Par conséquent, nous avons poursuivi les investigations sur les cerveaux fixés avec la SSS comme source potentielle de tissu disponible aux chercheurs. Les résultats ultérieurs obtenus dans le chapitre 4 (recalage IRM-histologie, aussi de moindre qualité avec la SSS) étaient donc attendus, ayant déjà démontré la fragilité des coupes avec une perte de tissu plus grande et des déchirures plus fréquentes (Chapitre 3), résultant en une colocalisation entre les deux modalités diminuée (Chapitre 4). Finalement, les résultats obtenus dans l'étude du chapitre 5 (séquences pondérées T1 et T2 d'IRM) se sont avérés surprenants, puisque les contrastes en T1 étaient plus similaires à ceux obtenus avec la SFA, bien que diminués, que ceux fixés avec la SA. Les contrastes en T1 étaient également de qualité satisfaisante pour des études qui utiliseraient des méthodes de segmentation neuroanatomiques ou pour des études volumétriques (Chapitre 5). Cependant, nous avons omis ceux fixés avec la SSS pour l'application complète du protocole de scans des cerveaux *in situ*, puisque plus d'artéfacts étaient observés. En effet, les cerveaux *in situ* fixés avec la SSS montraient plus de bruit, probablement causé par la grande quantité de NaCl dans la solution, dont les effets sont inconnus sur le signal d'IRM. Cependant, le sel peut modifier le déplacement d'eau par absorption (Hayashi et al., 2014), un aspect crucial dans la qualité des IRMs (Shepherd, Flint, et al., 2009; Shepherd, Thelwall, et al., 2009).

L'alcool est utilisé dans différentes formulations, avec des mélanges parfois différents (éthanol, glycérol, phénol, méthanol, isopropanol, etc.) et en différentes concentrations, mais souvent à base de phénol (Hammer et al., 2012; Hopwood et al., 1989; Rahman et al., 2021; Tomalty et al., 2019; Venne et al., 2020). Par exemple, la SA utilisée dans notre laboratoire ressemble beaucoup

[22] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK50952/

à celle développée par Benet et ses collègues, conçue pour les simulations neurochirurgicales. En effet, la solution de Benet contient 62,4% d'éthanol, 17% de glycérol, 10,2% de phénol, et 0,851% de formaldéhyde (Benet et al., 2014), alors que la SA de l'UQTR contient 69% d'éthanol, 20,7% de glycérol, 1,88% de phénol et 1,42% de formaldéhyde en plus de l'acétate de sodium (0.01%) ainsi que du Dettol® (0.13%). D'ailleurs, les résultats obtenus quant à la facilité à manipuler les coupes et la texture du tissu sont cohérents avec cette étude qui avait comme objectif de développer une solution, qui rendrait les cerveaux moins rigides que lorsque fixés avec la SFA, pour des simulations neurochirurgicales (Benet et al., 2014). Puisque le Dettol® est un produit dont les effets ne sont pas répertoriés dans la littérature, le projet pilote des souris n'a pas utilisé la SA de l'UQTR, mais plutôt la formulation de Benet. Puisque les résultats étaient positifs dans les cerveaux de souris fixés avec la solution de Benet (antigénicité préservée avec une solution très similaire à la SA), en plus que la SA était la solution utilisée comme procédure standard à l'UQTR (et dans d'autres laboratoires avec des formulations très similaires), nous avons ensuite poursuivi les projets de cette thèse avec les cerveaux fixés avec la SA. La solution de Benet aurait pu être testée dans le laboratoire d'anatomie pour l'embaumement des corps si le but ultime avait été d'utiliser les cerveaux exclusivement pour des simulations chirurgicales, mais notre objectif a toujours été de les évaluer pour la recherche neuroscientifique en général. Les cerveaux fixés avec l'alcool ont mieux préservé l'antigénicité des quatre populations cellulaires, en plus de conserver une texture adéquate du tissu présentant moins de déchirures qu'avec la SSS, résultant en un meilleur recalage (Chapitres 2-3-4). Ces résultats étaient cohérents avec certaines études qui ont comparé la qualité histologique (surtout de H&E) de cerveaux fixés avec du phénol ou différents types d'alcools, qui montrent une fixation adéquate du tissu (Rahman et al., 2021; Tomalty et al., 2019). Cependant, le contraste d'IRM en T1 ne s'est pas toujours inversé dans les hémisphères *ex situ* fixés avec la SA, et le contraste entre la MB et la MG était grandement diminué en comparaison aux cerveaux fixés avec la SFA (Chapitre 5). En contrepartie, les IRM des cerveaux *in situ* fixés avec la SA sont d'une grande qualité, et ce, même lorsque la fixation des cerveaux est sous-optimale. Cet aspect est abordé dans le rapport de cas du chapitre 6. Notre hypothèse était que la différence de contraste (intensités de MB-MG inversé ou non, respectivement) dans les séquences T1 pondérées observée entre les cerveaux *in situ* et *ex situ*,

est en relation avec le liquide dans lequel le cerveau doit être immergé (*ex situ)* pour faire l'acquisition des images d'IRM et qui pourrait engendrer un changement de diffusion de l'eau à travers le tissu. Cependant, comme aucune étude n'est disponible concernant les IRM de cerveaux *ex situ* fixés avec la SA, les expériences futures de notre laboratoire seront nécessaires afin de mieux comprendre ces phénomènes.

Pour conclure cette section, il est indéniable que d'autres solutions auraient pu être testées. Cependant, nous nous sommes tenus aux solutions utilisées dans le laboratoire de l'UQTR et qui sont également largement utilisées ailleurs dans le monde. Finalement, nous avons considéré une autre solution de fixation souple largement utilisée dans les laboratoires d'anatomie et à l'UQTR; la solution de Thiel (Balta, Lamb, et al., 2015; Benkhadra et al., 2011; Eisma et al., 2013; Kennel et al., 2018; Thiel, 1992; Venne et al., 2020). Cette solution n'a toutefois pas été évaluée dans les projets de cette thèse puisque les cerveaux sont trop friables et donc inutilisables (Miyake et al., 2020). Dans notre laboratoire, la pratique est d'extraire les cerveaux frais et les mettre en immersion dans la SFA en amont de l'embaumement avec la solution Thiel, une procédure qui produit donc des cerveaux fixés à la façon des banques de cerveaux.

7.1.2 Méthodes de fixation utilisées

Les souris ont été utilisées dans le premier projet pilote afin de mieux contrôler les variables confondantes inévitables chez l'humain. Cependant, la SA diffère légèrement entre les cerveaux de souris et les cerveaux humains (solution de Benet vs SA du laboratoire, respectivement), et la méthode de fixation n'était pas la même (perfusion par gravité vs avec une pompe réglée à une pression précise de 30 psi, respectivement). Puisque la qualité du tissu cérébral dépend de la qualité de la perfusion pour que le fixateur diffuse des vaisseaux jusqu'aux tissus (Paul et al., 2008; Wu et al., 2021), la qualité de la perfusion a été évaluée chez la souris (Chapitre 2), mais pas chez l'humain (Chapitre 3), et ce, pour les raisons suivantes.

Premièrement, la plus forte concentration de glycérol de la solution de Benet l'a conféré à une viscosité supérieure à celle de la SA de notre laboratoire d'anatomie (Ferreira et al., 2017; Thiagarajan, 2017). Ceci a déterminé que la perfusion par gravité chez les souris était visiblement moins efficace (moins de ml/min. injecté) pour la solution de Benet que pour la SSS ou la SFA.

Puisque la SA du laboratoire d'anatomie n'était pas plus visqueuse que la SSS, et que la SFA était utilisée par immersion, le facteur de la viscosité n'était pas un problème pour les cerveaux humains. De plus, l'injection des spécimens humains se fait avec une pompe par la carotide commune, réglant aussi une pression stable peu importe la solution de fixation (Domagała et al., 2025; Esato et al., 1975; McFadden et al., 2019).

Deuxièmement, la perfusion chez la souris est monitorable/observable. En effet, les signes d'une mauvaise perfusion sont visibles, c.-à-d., par le gonflement des poumons qui indique une injection dans le sens inverse de la circulation, ou lorsque le foie est encore rosé, ce qui indique que le sang n'est pas correctement évacué et donc, que la solution de fixation ne rejoint pas correctement les tissus (Wu et al., 2021). Cependant, les professionnels qui embaument les corps à l'UQTR ne récoltent pas l'information sur le déroulement de la perfusion de manière systématique. La seule information recueillie est si les corps ont été injectés dans l'artère fémorale en support à l'injection dans l'artère carotide commune. Les corps utilisés dans les projets de cette thèse n'ont pas été injectés dans la fémorale, ce qui reflète un meilleur déroulement de la perfusion. Cependant, considérant l'âge des donneurs, cela ne garantit pas l'absence de maladie athérosclérotique, mais il est impossible d'anticiper ce facteur lors de l'embaumement. En effet, le seul moyen pour l'observer est par angiographie (Turkoglu et al., 2014), ce qui n'est pas une pratique utilisée dans notre laboratoire. De ce fait, la qualité de la perfusion chez l'humain n'a pas été évaluée comme variable indépendante.

En plus des différences méthodologiques de fixation entre la souris et l'humain, la méthode de fixation chez l'humain différait également. Les cerveaux des laboratoires d'anatomie sont perfusés, alors que les cerveaux des banques sont fixés par immersion. Puisque des différences ont été observées entre des cerveaux fixés par immersion vs perfusion (Beach et al., 1987; Garman, 1990), il va de soi que cette pratique représente une variable à prendre en compte dans le cadre des études présentées (voir sections 7.4 et 7.5).

7.2 L'histologie

7.2.1 Souris vs humains

Les résultats histologiques qui ont été présentés dans les chapitres 2 et 3 diffèrent quelque peu entre les deux populations étudiées pour la SFA, la SSS et la SA, premièrement au niveau de la préservation antigénique qui était toujours complète chez la souris, mais pas chez l'humain, et au niveau de la qualité du tissu. Ces différences peuvent être dû à des facteurs qui sont 1-directement reliés aux différences entre les deux espèces ou 2-reliés aux variables confondantes présentes chez l'humain.

Premièrement, les cerveaux disponibles au laboratoire d'anatomie de l'UQTR sont principalement issus de donneurs vieillissants (médiane de la population au Chapitre 3=76 ans), alors que les souris utilisées (C57BL/6J) avaient en moyenne 6 mois. L'équivalent d'une souris de 6 mois serait une personne âgée d'environ 25-30 ans (Flurkey et al., 2007; Jackson et al., 2017). Pour atteindre l'équivalent de la population humaine, les souris auraient donc dû être âgées de plus de deux ans, ce qui dépasse l'espérance de vie des souris C57BL/6J (Flurkey et al., 2007; Jackson et al., 2017). L'âge est donc une variable confondante des résultats entre les deux espèces. De plus, il n'est pas possible de contrôler les comorbidités, comme les pathologies cérébrovasculaires souvent présentes dans les cerveaux humains vieillissants. Ceci aurait pu affecter la structure et la qualité du tissu cérébral humain, mais aussi la diffusion du fixateur à travers le cerveau (Yang et al., 2017; Zimmerman et al., 2021), dans des cas où il y aurait présence de plaques d'athérome ou de thrombi.

Deuxièmement, le rapport entre la densité de myéline et de corps cellulaires neuronaux est différent entre les deux espèces, ce qui modifie donc la composition physico-chimique du cortex cérébral (Hofman, 1985; Ventura-Antunes et al., 2013; Welker, 1990; Zhang & Sejnowski, 2000). En effet, la densité de matière blanche du cerveau murin est beaucoup moins élevée que celle chez l'humain, alors que l'épaisseur corticale est également diminuée de moitié (Bakken et al., 2021; Hodge et al., 2019). Il est également connu qu'avec l'âge, la MB se dégrade plus rapidement que la MG dans le cerveau humain (Boban et al., 2022; D'Arceuil & de Crespigny, 2007; D'Arceuil et al., 2007). La fixation affecterait également plus rapidement la MB que la MG (Lüders et al.,

2019; Tovi & Ericsson, 1992). En bref, c'est pour ces raisons que la diffusion d'un fixateur dans le cerveau (outre la composition de la solution elle-même) sera différente entre les deux espèces (voir section 7.2.2.).

D'autres variables confondantes inhérentes dans la disponibilité et les techniques de préservation des cerveaux humains ne se présentent pas chez la souris, ce qui pourrait expliquer les différences des résultats histologiques observés entre les deux espèces. Premièrement, les corps sont fixés dans un DPM de 48h (pratique standard du laboratoire d'anatomie de l'UQTR), alors que les cerveaux de souris sont fixés instantanément pendant la mort par perfusion. Pendant cette période, les phénomènes de *rigor mortis*, de *lividity* et de dégradation du cerveau s'amorcent (Hyodoh et al., 2012; Jackowski et al., 2006; Shiotani et al., 2002), ce qui peut modifier les propriétés cellulaires, moléculaires et cérébrovasculaires chez l'humain.

Deuxièmement, les cerveaux de souris sont congelés directement après leur fixation. Cependant, les cerveaux humains sont conservés dans une solution de fixation au réfrigérateur. De ce fait, le délai entre la fixation initiale et le moment où les cerveaux sont utilisés est augmenté chez l'humain, mais pas chez la souris. Cela peut modifier la préservation antigénique et histologique du tissu, comme démontré dans une étude de notre groupe, où l'intensité de marquage de NeuN et de Iba1 diminuait graduellement dans des cerveaux conservés dans la solution de fixation pendant 1 an, 5 ans, 10 ans, 15 ans ou 20 ans (Ma et al., 2024). D'autres études ont aussi montré des effets négatifs d'une sur-fixation corticale et d'une sous-fixation des noyaux profonds dans des cerveaux fixés par immersion pendant de longues années (Beach et al., 1987; Garman, 1990; Hade et al., 2024; Insausti et al., 2023; McFadden et al., 2019).

7.2.2 Impacts de la fixation

Il est connu que la SFA rend les tissus rigides et est donc appelée une solution de « fixation dure », alors que la SSS est reconnue comme une solution de « fixation souple » (Balta, Lamb, et al., 2015; Balta, Twomey, et al., 2019; Venne et al., 2020). Quant à la SA, elle conserve la texture et la flexibilité des tissus qui n'est pas trop rigide comme la SFA, mais pas trop souple comme la SSS (puisqu'elle contient peu de formaldéhyde, mais tout de même plus de 1%), ce qui produit des spécimens facilement manipulables histologiquement, avec moins de distorsions que les

spécimens fixés avec la SSS, mais tout de même idéaux pour l'anatomie macroscopique, contrairement à la SFA. Des résultats similaires ont été observés entre les deux espèces.

7.2.2.1 Qualité du tissu

La qualité du tissu des cerveaux de souris, dont l'intégrité du neuropile (matrice extracellulaire) et la qualité morphologique des différentes cellules (neuronales ou gliales) est conservée avec la SFA. Puisque la SFA est une solution de formaldéhyde dilué dans une solution tampon, on pouvait s'attendre à ce que l'indice d'osmolarité des cellules et de la matrice extracellulaire soit mieux conservé avec la SFA qu'avec les deux autres solutions. De plus, les deux autres solutions contiennent une grande quantité d'alcool, qui est déshydratant (Viktorov & Proshin, 2003), ce qui pourrait mener à la mobilisation de l'eau en dehors des cellules et engendrer les artéfacts de la matrice extracellulaire et de la morphologie cellulaire qui ont été observées. En effet, la SA a montré un neuropile brisé, tandis que la SSS présentait non seulement un neuropile altéré, mais également des cellules endommagées (cellules irrégulières, c.-à-d., ridées, plissées) (Chapitre 2). L'effet de la grande quantité de sel dans la SSS a probablement conduit à la déshydratation des cellules et à l'indice d'osmolarité négatif intracellulaire, produisant des neurones avec l'apparence de « raisins secs » en histologie. Ce phénomène n'était pas aussi clair avec la SA, malgré la présence d'alcool probablement parce que 1- il n'y a pas de sel dans sa formulation et 2- la grande quantité de glycérol pouvait agir à favoriser le maintien de l'hydratation des tissus (Ferreira et al., 2017; Takamura et al., 2012). Cependant, les résultats histologiques du tissu humain sont un peu différents. Le neuropile s'est montré toujours brisé, peu importe la solution de fixation (même avec la SFA) (Chapitre 3). De ce fait, nous estimons que l'intégrité du neuropile est probablement plus relié aux caractéristiques propres du tissu humain et aux variables confondantes (comme l'âge, le DPM ou le délai de post-fixation que nous ne pouvons pas contrôler dans le contexte d'un laboratoire d'anatomie) qu'aux solutions de fixation.

7.2.2.2 Préservation de l'antigénicité

Un protocole d'HIAR n'était pas nécessaire pour les souris, puisque tous les antigènes étaient préservés de manière homogène dans tous les cerveaux fixés avec les trois solutions. La seule considération est que le GFAP ne marquait que les astrocytes fibreux dans les cerveaux de souris

(Sun & Jakobs, 2012; Walz, 2000; Zhang et al., 2019), mais ceux-ci étaient distribués de manière homogène dans la MB. Cependant, dans les cerveaux humains, la préservation de l'antigénicité était beaucoup plus variable. Tous les antigènes ont été préservés de manière plus homogène avec la SA qu'avec les deux autres solutions. Pour la SFA, notre hypothèse était que la fixation par immersion produit une sur-fixation qui diminuerait l'antigénicité, comme il a été montré précédemment (Hade et al., 2024; Ma et al., 2024; Mauriello et al., 2022; Pikkarainen et al., 2010; Webster et al., 2009). Pour la SSS, notre hypothèse était qu'elle préserve moins bien le tissu en général, par sa faible teneur en formaldéhyde, qui résulte en une moindre fixation. Un autre fait important est que la révélation de NeuN et de GFAP était moins bien préservée en général et était plus souvent complètement absente comparativement à celle de Iba1 et de PLP. Ceci est possiblement dû au fait que les protéines de NeuN et de GFAP ont un poids moléculaire beaucoup plus élevé (même doublé) (48 kDa et 50 kDa respectivement) par rapport à Iba1 et PLP (17 kDa et 25 kDa, respectivement), et sont donc possiblement plus difficiles à atteindre par les anticorps, puisqu'elles ont une conformation tridimensionnelle (hélices alphas et feuilles bêtas) plus complexe (Figure 5, section 2 du chapitre 1).

Dans les spécimens utilisés dans le Chapitre 3, un protocole d'HIAR a été appliqué ce qui a permis de récupérer tous les antigènes de manière plus homogène. Nous avons également observé que cette procédure diminue l'intensité de l'arrière-plan, ce qui concorde avec les résultats rapportés par (Yamashita, 2007), et améliore donc le rapport signal-bruit. Cela augmente aussi le contraste MB-MG et facilite les méthodes de recalage *a posteriori*, par la meilleure visualisation des repères anatomiques (Chapitre 5). Cependant, nous croyons que l'HIAR entraîne plus de distorsions des coupes (ce qui réduit la qualité du recalage), puisqu'elles flottent pendant le chauffage, même si la littérature n'appuie pas ce phénomène. En effet, cet artéfact n'est peu ou pas répertorié dans la littérature, puisque la majorité des protocoles d'histologie se fait sur des coupes enrobées en paraffine, montées directement sur lame (protocole standard en histopathologie), et non sur des cryo-sections flottantes. La majorité des études qui utilisent l'HIAR expliquent que le problème le plus courant est le détachement des coupes des lames (Culling et al., 2014; Gabe, 1976; Kiernan, 1990; Lillie, 1954; Vinod et al., 2016).

Selon les expériences ultérieures de notre laboratoire, les antigènes ne sont pas toujours préservés et ce, malgré un protocole d'HIAR. Certains spécimens obtenus au laboratoire sont utilisés dans plusieurs projets différents, ce qui nous a fait remarquer que certains blocs de tissu, qui étaient de bonne qualité dans l'étude du chapitre 3, ne préservent pas nécessairement l'antigénicité de manière égale *a posteriori* dans d'autres projets. Ceci peut être relié à plusieurs facteurs. Premièrement, puisque les analyses ultérieures sont réalisées sur une région corticale différente, il se peut que la préservation de l'antigénicité ne soit pas équivalente dans différentes régions. Deuxièmement, comme mentionné précédemment, le temps de fixation peut agir sur la formation de liens covalents et ainsi diminuer la préservation de l'antigénicité. Il serait donc intéressant de tester d'autres protocoles de RA comme présenté dans la section 1.2, afin d'optimiser la détection de chaque antigène et minimiser les effets de la variable confondante de post-fixation. D'ailleurs, notre groupe procèdera prochainement à évaluer la qualité du tissu et de l'antigénicité de manière longitudinale, à partir du moment de l'injection du fixateur et ensuite tous les 3 mois (par exemple) afin d'observer ce phénomène. Notre groupe procèdera aussi à des analyses sur de multiples régions corticales d'un même spécimen afin d'établir les différences histologiques induites par un gradient différent de fixation entre les régions.

7.2.2.3 Qualité de l'IHC

La qualité du protocole d'IHC a été évaluée chez les souris (Chapitre 2), puisque cette étude permettait de contrôler les variables confondantes (délai post-mortem et délai de post-fixation absent chez les souris) et donc, d'établir des protocoles d'IHC plus adaptés aux différentes solutions de fixation. Nous avons donc évalué le degré de pénétration des anticorps dans le tissu, ainsi que l'intensité de l'arrière-plan, deux facteurs qui peuvent influencer la détection des antigènes. L'anti-PLP pénétrait mieux dans les cerveaux fixés avec la SA qu'avec les deux autres solutions, possiblement parce que l'éthanol agit comme un agent non-polaire qui peut dissoudre les lipides, perméabilisant ainsi la matrice extracellulaire et les membranes cellulaires (Koji, 2025; Patra et al., 2006; Wolman, 1958). Nous pensons donc que l'éthanol pourrait aussi agir sur les phospholipides de la myéline, les rendre moins denses, et ainsi permettre aux anticorps pour la PLP de mieux atteindre les différents sites antigéniques. Des résultats similaires ont été observés

dans les cerveaux humains (Note : cette variable n'a pas été incluse dans l'article présenté au Chapitre 3 parce que les résultats étaient similaires et dans l'intérêt d'être synthétique).

L'autre critère de la qualité de l'IHC qui a été évalué dans les cerveaux de souris est l'intensité de l'arrière-plan (intensité du bruit de fond). Les arrière-plans des cerveaux fixés avec la SSS étaient significativement plus foncés que ceux fixés avec la SFA et la SA. Des résultats similaires ont été obtenus chez l'humain, bien que ce critère n'ait pas été inclut dans l'article du chapitre 3 dans le but de synthétiser. De plus, une analyse similaire a été conduite dans le cadre du projet du recalage (Chapitre 4), où l'intensité de la coloration a été évaluée puisqu'elle pouvait influencer les repères intrinsèques anatomiques. Dans ces gros blocs de tissu, les protocoles d'IHC ont produit des coupes plus pâles lorsque fixées avec la SSS. Ceci reflète une qualité inférieure de l'IHC avec cette fixation, pour deux raisons : 1- Les cellules sont moins marquées donc la coloration globale est plus pâle. Dans ce projet, il n'y a pas eu de distinction entre le marquage de l'arrière-plan nuisible et le marquage cellulaire désiré, ce n'est donc pas le rapport signal-bruit qui a été évalué, mais l'intensité du marquage de la coupe; 2- Le protocole d'IHC a été fait sur les coupes directement montées sur lames, et non sur des coupes flottantes. De ce fait, la DAB agit d'un seul côté de la coupe, réduisant l'intensité du marquage (Potts et al., 2020).

La qualité de l'IF a aussi été évaluée dans les cerveaux de souris (Chapitre 2) et dans les cerveaux humains (Résultats supplémentaires, Chapitre 3). Le NeuN et le GFAP ont été détectés par IF dans les cerveaux de souris fixés avec les trois solutions et ce, avec une qualité similaire. Des artéfacts d'AF de l'arrière-plan ont été observés dans la longueur d'onde de 488nm (pour visualiser les neurones) dans les cerveaux fixés avec la SFA et dans le 555nm (pour visualiser les astrocytes) dans les cerveaux fixés avec la SA. Ceci était attendu puisque les aldéhydes (très concentrés dans la SFA, un peu moins dans la SA, mais tout de même près de deux fois plus que dans la SSS) sont connus pour créer des bases de Schiff autofluorescentes dans les tissus (Baschong et al., 2001; Clancy & Cauller, 1998). Dans les cerveaux humains, les deux antigènes n'ont pas toujours été préservés de façon homogène, comme le montrent les résultats d'IHC. De plus, l'AF était beaucoup plus significative et ce, dans les trois longueurs d'onde évaluées (488, 555, 647nm). En effet, en plus de l'AF de l'arrière-plan plus intense, les granules de lipofuscines présents dans les différentes cellules neuronales et gliales sont aussi connus pour s'accumuler dans les cerveaux

humains vieillissants (Goyal, 1982), et engendrer de l'AF (Schnell et al., 1999). Différents traitements sont connus depuis de nombreuses années afin de réduire l'AF des coupes (Baschong et al., 2001; Clancy & Cauller, 1998; Humason, 1967; Peter, 1958; Schnell et al., 1999; Sun & Jakobs, 2012; Wang et al., 2023). Des traitements de borohydrure de sodium ($NaBH_4$) et de noir de soudan ont donc été testés. Le $NaBH_4$ a été démontré comme efficace pour neutraliser les bases de Schiff reliées aux aldéhydes (Clancy & Cauller, 1998), donc on s'attendait à ce que ce traitement soit plus efficace dans les cerveaux fixés avec la SFA. Le $NaBH_4$ a d'ailleurs diminué l'AF de l'arrière-plan dans la SFA, mais pas l'AF des lipofuscines. Le noir de soudan est une coloration noire qui tapisse l'arrière-plan des coupes et qui s'est donc montré plus efficace dans toutes les solutions, autant pour réduire l'AF de l'arrière-plan que des lipofuscines. Il est donc souhaitable d'utiliser une technique de réduction d'AF dans les analyses d'IF des cerveaux humains, surtout si les cerveaux sont vieillissants et qu'ils sont préservés avec une grande quantité d'aldéhydes. D'autres techniques comme le photoblanchiment par lumière ou irradiation (Neumann & Gabel, 2002), ou d'autres techniques de microscopie plus sélective au signal d'IF que de l'AF (Hwang et al., 2025), sont aussi disponibles.

7.2.2.4 Qualité de l'HC

La qualité des colorations HC a été évaluée uniquement dans les cerveaux humains puisqu'elles sont largement utilisées en histopathologie depuis près d'un siècle (Peter, 1958; Waters, 2009; Wick, 2012, 2019). Les colorations de Nissl (rouge neutre, CV et H&E) sont réalisables et de qualité suffisante dans des cerveaux fixés avec les trois solutions (Chapitre 3). Les cerveaux complets des laboratoires d'anatomie pourraient donc être utilisés pour des études de cytoarchitecture, comme pour créer un atlas similaire à celui du Big Brain (*The Human Brain Project, EBRAINS*), par exemple (Amunts et al., 2020; Amunts & Zilles, 2015; Paquola et al., 2021). Cependant, la qualité des colorations était diminuée dans les cerveaux fixés avec la SSS, où le contraste arrière-plan-cellules était réduit, reflétant la diminution du contraste MB-MG retrouvé dans le chapitre 4.

La coloration de PB a permis de détecter des amas de fer dans les cerveaux fixés avec les trois solutions. Il a même été possible de colocaliser les amas d'hémosidérine avec le signal hypointense dans les aires de HMB sur une séquence T2* d'un bloc de cerveau vieillissant fixé

avec la SSS (Résultats supplémentaires, Chapitre 4), ce qui démontre l'utilité des cerveaux fixés avec la SSS pour des corrélations en neuropathologie.

La coloration de LFB n'a pas toujours été homogène, surtout dans les cerveaux fixés avec la SFA. Ces résultats étaient surprenants, puisque tous les protocoles de LFB ont été établis sur des cerveaux des banques de cerveaux, ou pour la neuropathologie, qui utilise le formaldéhyde comme fixateur (Taqi et al., 2018). De plus, la SA, qui contient de fortes concentrations d'alcools et du Dettol® (détergent avec propriétés lipophiles) pourrait entraîner une perte de myéline plus flagrante, dont la densité diminue habituellement en raison de la fixation (Schmierer et al., 2010; Schmierer et al., 2008; Tovi & Ericsson, 1992) et avec l'éthanol (Patra et al., 2006). C'est pourquoi on s'attendait à ce que la qualité du marquage des fibres de myéline par une coloration de LFB soit supérieure avec la SFA qu'avec la SA. Cependant, avec les expériences acquises en laboratoire et les tests effectués sur des blocs de tissu cérébral enrobés en paraffine, notre hypothèse était que les protocoles de LFB ne sont pas particulièrement adaptés à des coupes de cerveaux flottantes plus épaisses (40 μm utilisé dans le Chapitre 3), mais plutôt à des coupes très minces de paraffine (6-10 μm), adaptées à l'histopathologie (Bouman et al., 2020; Jonkman et al., 2015; Lahna et al., 2022; Peter, 1958). De plus, la LFB permet de détecter une diminution de densité de la myéline et est donc utilisée dans des cerveaux avec des HMB ou pour la détection de lésions de sclérose en plaques (Gouw et al., 2011; Laule et al., 2008; Moll et al., 2011; Solé-Guardia et al., 2023). De ce fait, les inhomogénéités retrouvées dans nos spécimens vieillissants ne sont peut-être pas associées à la fixation, mais plutôt aux coupes épaisses et à la possible présence des aires de démyélinisation de la MB associées au vieillissement (Dadar, Mahmoud, Zhernovaia, et al., 2022; Wardlaw et al., 2015).

Finalement, la coloration de Bielschowsky était plus homogène dans les cerveaux fixés avec la SFA, mais plus hétérogène et de moins bonne qualité dans les cerveaux fixés avec la SA, et pire avec la SSS. Une ancienne étude a stipulé que les imprégnations d'argent étaient affectées négativement par l'extraction des lipides (Wolman, 1958), ce qui pourrait être le cas dans les solutions de SA et de SSS, puisqu'elles contiennent du Dettol® et beaucoup d'alcools, des produits qui pourraient affecter la qualité des phospholipides de la MB.

7.2.3 Conclusions générales

En bref, l'histologie est réalisable sur des cerveaux fixés avec tous les fixateurs testés, et produit des résultats satisfaisants même lorsque la fixation est sous-optimale. La qualité histologique n'a pas non plus été modifiée par une post-fixation (Chapitre 6). On s'attendait également à une qualité histologique moindre avec des spécimens fixés avec un DPM plus long (Hade et al., 2024) ou avec un temps de post-fixation plus long (Ma et al., 2024), mais les résultats montrent une qualité satisfaisante malgré ces variables confondantes. De plus, les résultats supplémentaires du chapitre 4 appuient l'utilisation de la SSS pour préserver la MB et MG profondes (bloc coupé avec une partie de la capsule interne et de la tête du noyau caudé).

Globalement, les études histologiques de cette thèse ont démontré que la SA serait idéale pour la préservation antigénique et pour la manipulation des spécimens, comparativement à la SSS, qui produit des coupes de moindre qualité, mais tout de même suffisante (et ce, pour l'IHC, IF, HC). De plus, certains protocoles pourraient être développés dans le futur, de manière plus spécifique pour améliorer la qualité des cerveaux SSS, comme un protocole d'EIAR, ou une post-fixation dans la SFA pour durcir le tissu et ainsi minimiser la perte de tissu par déchirures, par exemple.

7.3 L'imagerie par résonance magnétique

Les manuscrits présentés dans les chapitres 4, 5 et 6 de cette thèse représentent les différentes étapes des protocoles d'imagerie développés. Le but éventuel du *pipeline* complet de notre laboratoire est de réaliser le recalage de l'histologie vers l'IRM d'un bloc de tissu 7T, vers l'IRM *ex situ* de l'hémisphère et vers l'IRM *in situ* du spécimen complet. Ceci permettrait d'obtenir un scan plus fidèle aux IRM *in vivo*, tout en utilisant les avantages des IRM *ex vivo* (Meyer et al., 2006; Post, 2008). Ceci représenterait une avancée majeure dans le cadre de la validation de la neuroimagerie par la méthode étalon-or.

7.3.1 Scans des blocs

Le recalage entre l'histologie et l'IRM 7T a pu être effectué dans des blocs de cerveaux fixés avec les trois solutions (Chapitre 4). L'utilisation de l'IRM 7T est nécessaire afin d'augmenter la

résolution de l'image, se rapprochant de celle de l'histologie (des tests de notre équipe ont mené à une résolution de 100 μm de voxel) et facilite ainsi les corrélations entre les deux modalités (Apostolova et al., 2015; Augustinack & van der Kouwe, 2016; Harteveld et al., 2018; Laule et al., 2008; Maranzano et al., 2019). La méthode de recalage utilisée dans le chapitre 4 a été décrite, à notre connaissance, pour la première fois, puisque la coupe histologique a été guidée par l'ouverture des images d'IRM, ce qui est intéressant pour les laboratoires qui n'ont pas accès à des scans complets facilement orientables en 3D, ou même à un système d'imagerie en face sur bloc (Choe et al., 2011).

Le recalage entre la séquence T2-TurboRARE et les différentes colorations dans des blocs de tissus fixés avec différentes solutions est prometteur. La T2 TurboRARE a été utilisée puisqu'elle est plus similaire aux IRM *in vivo* (Dadar et al., 2024). En effet, comme les différentes séquences d'IRM acquises au même moment sont facilement recalables entre elles (*co-registered*), il va de soi que le recalage de l'histologie à d'autres séquences est réalisable, ce qui permettrait des corrélations et validations entre multiples modalités. Par exemple, une étude récente a corrélé l'intensité de marquage des colorations de bleu de luxol rapide et la coloration d'argent de Bielschowsky avec les cartes de relaxation T1, T2 et FLAIR pour évaluer la perte de myéline dans une région de HMB comparativement aux régions de MB d'apparence normale. En effet, dans les régions de HMB, les temps de relaxation T1, T2 et FLAIR sont augmentés, et plus ils augmentent, plus il y a une diminution de l'intensité de marquage des deux colorations (Roseborough et al., 2020). Dans notre cas, les protocoles établis et la qualité du recalage démontrée dans le chapitre 4 ouvrent la porte à effectuer des études similaires avec des cerveaux fixés avec la SSS ou la SA.

Les images des blocs de cerveaux acquises à 7T ont un contraste MB-MG d'excellente qualité dans les cerveaux fixés avec les trois soutions. Le contraste était un peu plus faible dans ceux fixés avec la SSS, mais tout de même beaucoup plus élevé que dans les IRM *ex situ* 3T des hémisphères du chapitre 5. De ce fait, la qualité du recalage ne dépendait pas de la qualité de l'IRM, mais plutôt de la qualité des coupes histologiques. L'intensité du marquage ainsi que le contraste MB-MG des différentes colorations histologiques ont donc été mesurés qualitativement afin d'évaluer si le choix des repères anatomiques pouvait être influencé par ces variables. Le contraste MB-MG des coupes fixées avec la SSS était significativement plus bas en histologie, ce qui a mené à l'utilisation

d'un nombre plus élevé de repères (*tags*) dans ces blocs pour initier le recalage semi-automatique. Comme expliqué dans la section 7.2, la difficulté à manipuler les coupes est un autre facteur qui a mené à l'utilisation de plus de marqueurs (*tags*) dans les cerveaux fixés avec la SSS, ce qui a occasionné une plus grande quantité de distorsions, de déchirures et de pertes de tissu. Selon l'étude présentée au chapitre 4, c'est la variable *ease of manipulation* qui affecterait la qualité du recalage entre l'IRM et l'histologie de manière plus significative. Ceci est en accord avec les méthodes employées dans, entres autres, l'étude de Choe et al., 2011, où l'histologie a dû être « réparée » par des manipulations d'images 2D-2D avant le recalage des deux modalités (Choe et al., 2011).

7.3.2 Scan *ex situ*

Les scans *ex situ* ont montré que les changements de contraste entre la MG et MB ne sont pas similaires avec toutes les solutions de fixation. En effet, certains cerveaux fixés avec la SA (et ce, dans différentes régions) ont montré des contrastes MB-MG en T1 non-inversés, mais pas dans les cerveaux fixés avec les deux autres solutions qui ont toujours montré une inversion de contraste. Cette inversion de contraste en fonction de la fixation pourrait être causée par la perte accentuée de myéline en rapport à la MG (Tovi & Ericsson, 1992). De plus, les IRM ex situ sont réalisés en immersion dans un contenant rempli de formaldéhyde 1%, ce qui pourrait affecter la diffusion de l'eau à travers le tissu et ainsi modifier le comportement des protons en IRM. Cependant, le phénomène de fixation est un phénomène chimique, alors que l'IRM est une modalité physique; il est donc très difficile d'établir des liens de cause à effet entre le signal obtenu par IRM et le dégrée de fixation des cerveaux. À notre connaissance, il n'y a pas d'études sur les caractéristiques qualitatives des séquences pondérées obtenues après la fixation. De plus, les cerveaux fixés avec la SA et la SSS montraient des ratios d'intensité entre la MB et la MG plus près de 1, ce qui montre moins de contraste MB-MG. Finalement, il a été démontré que le contraste en T2 diminue dans les cerveaux fixés avec la SSS.

Nos travaux n'ont pas exploré les effets de la fixation sur l'IRM quantitative. Certaines études mentionnent comment les temps de relaxation T1 et T2 sont diminués longitudinalement pendant la fixation avec le NBF (Raman et al., 2017; Shatil et al., 2018); il serait donc intéressant

d'évaluer ce phénomène dans les cerveaux fixés avec les trois solutions. Nous n'avons pas évalué les effets des solutions de fixation sur le volume du cerveau ou des structures neuroanatomiques qui pourraient potentiellement être segmentées. Puisque des différences volumétriques ont été rapportées avant et après la fixation de cerveaux fixés avec la NBF (Neuhaus et al., 2025), il serait également pertinent de mesurer le volume des structures des cerveaux fixés avec la SSS et la SA dans des études futures. Toutefois, l'étude présentée au chapitre 5 était essentielle pour évaluer la faisabilité des séquences de base et a montré que les IRM qualitatives (séquences pondérées) peuvent être utilisées dans des cerveaux fixés avec les trois solutions de fixation, dépendamment des objectifs de l'étude et de la résolution des images. Dans le cas d'une résolution telle que celle utilisée dans nos études, les IRM cérébrales sont d'une qualité suffisante pour être utilisés en recherche.

7.3.3 Scan *in situ*

Une première étude pilote de notre groupe a scanné des cerveaux *in situ* fixés avec la SSS dans un scanner IRM 1.5T (Maranzano et al., 2020). Cette étude a montré des résultats concluants quant à la procédure de prélèvement des têtes et de la préservation du LCR à l'intérieur des ventricules et de l'espace subarachnoïdien. À notre connaissance, notre groupe est un pionnier dans de telles méthodes de préparation de têtes anatomiques, étant donné que les chercheurs qui utilisent des scans *in situ* des cerveaux ont généralement un scanner d'IRM dans leur centre. Par conséquent, ils n'ont pas besoin préparer la tête isolée. Cette première étude pilote n'a cependant acquis qu'un seul scan de chaque spécimen avec une machine moins puissante qui montrait donc moins d'artéfacts en général. Nous nous sommes ensuite intéressés à scanner des cerveaux *in situ* de manière longitudinale avec un scanner 3T afin de valider le temps nécessaire à la fixation complète après perfusion et ce, de manière longitudinale. Cette étude a mené à des résultats préliminaires présentés au congrès *Society for Neuroscience*s en 2021 (Frigon et al., 2021). Par la suite, notre laboratoire a donc établi un protocole de scan *in situ* où tous les cerveaux, fixés avec la SSS ou la SA, sont scannés *a priori* de l'extraction des cerveaux. À notre connaissance, il n'y a pas d'études qui s'intéressent à la fixation *in situ* des cerveaux, puisque les cerveaux obtenus en recherche proviennent des banques de cerveaux fixés dans le NBF par immersion (c.-à-d., toujours *ex situ*).

La mise en place de protocoles d'IRM *in situ* a mené à la courte communication présentée au chapitre 6 qui portait sur un contraste inhabituel en séquence pondérée T1 observé dans certains des cerveaux scannés *in situ*, phénomène jamais répertorié dans la littérature. L'extraction de ces cerveaux a permis de confirmer qu'ils étaient fixés de manière sous-optimale. En effet, du sang était encore présent dans des régions qui étaient aussi dégradées (tissu très mou, odeur de putréfaction), ce qui correspondait aux régions où le signal en T1 était différent. De ce fait, et puisque d'autres études ont montré que le contraste MB-MG en T1 s'inverse généralement par le phénomène de fixation (Dadar et al., 2024; Kojima et al., 2024; Raman et al., 2017), nous avons émis l'hypothèse que les cerveaux sous-fixés (ou avec une fixation hétérogène et sous-optimale) présentaient un contraste MB-MG non-inversé dans la séquence pondérée T1. Puisqu'il n'est pas possible de prédire la qualité de la fixation dans les cerveaux *in situ* avant de les scanner par IRM, c.-à-d., qu'il n'y a pas moyen de prédire les changements du contraste, ni de savoir si les vaisseaux auraient pu être affectés par des caillots nuisibles à la perfusion, les cerveaux ont ensuite été scannés *ex situ*. Il faut noter que peu d'études portent sur la préparation des corps pour optimiser la fixation du cerveau (Insausti et al., 2023). Malgré cela, la grande majorité des cerveaux obtenus au laboratoire de l'UQTR sont bien fixés, et la fixation par perfusion a des avantages sur la fixation par immersion des cerveaux (McFadden et al., 2019). Cette courte communication (chapitre 6) a permis d'observer les cerveaux et procéder à une post-fixation si nécessaire, en plus d'ajouter une étape intermédiaire au processus complet de recalage. Finalement, il est important de noter que les colorations histologiques étaient réalisables et de qualité suffisante malgré une fixation sous-optimale. Encore une fois, il est important de noter que malgré une fixation macroscopique sous-optimale, la qualité microscopique était préservée, ce qui reflète une qualité de fixation suffisante. D'autre part, certaines études appliquent des protocoles histologiques sur du tissu non fixé, mais congelé directement après l'extraction du cerveau (Nair et al., 2024; Palomero-Gallagher & Zilles, 2019; Shi et al., 2008). Ceci appuie l'analyse de tissu cérébral pas fixé (ou, dans notre cas, sous-optimalement fixé) avec des protocoles histologiques adaptés pour obtenir une qualité du tissu suffisante, en plus de conserver l'antigénicité des principales populations cellulaires.

7.3.4 Conclusions générales

En général, le contraste observé dans la séquence pondérée en T1 semble plus affecté par la fixation que lorsque pondérée en T2, et ce, dans toutes les solutions de fixation, puisque le contraste entre la MB et la MG est inversé par rapport à un T1 *in vivo* (Dadar et al., 2024; Kojima et al., 2024). De plus, le T1 est plus affecté dans les cerveaux des laboratoires d'anatomie (fixés avec SSS et SA), qui montrent une diminution du contraste dans plusieurs régions. Le contraste en T2 est aussi affecté dans les cerveaux fixés avec la SSS, mais dans un moindre degré qu'en T1. Ceci a aussi mené à un recalage plus difficile, toutefois toujours réalisable, avec les blocs de cerveaux fixés avec la SSS.

Pour conclure, puisque les séquences T1 et T2 pondérées sont affectées dans les cerveaux *ex situ*, une potentielle solution serait de procéder à une post-fixation des hémisphères dans une SFA, ou bien d'attendre plus longtemps avant de prélever les têtes ou les cerveaux pour les scans. Ceci permettrait ainsi d'augmenter le temps de fixation et possiblement la qualité du contraste MB-MG. Finalement, puisque le contraste en T2 est de qualité suffisante dans les cerveaux fixés avec les trois solutions, cette séquence pourrait être considérée pour des études structurelles ou volumétriques (Gérin-Lajoie et al., 2025), au lieu de la séquence pondérée T1, qui est généralement préférée dans la recherche neuroscientifique *in vivo*. Aussi, des séquences *multi-echo* pourront être utilisées pour des IRM quantitatives (c.-à-d. pour produire des cartes de relaxation T1 et T2*) dans des études futures. Finalement, malgré les différences de contrastes de MB-MG entre les cerveaux fixés avec les trois solutions, nous avons démontré que l'IRM pondérée ainsi que le recalage avec l'histologie sont de qualité suffisante dans tous les spécimens, ce qui démontre l'utilité des cerveaux des laboratoires d'anatomie dans la recherche nécessitant le recalage des IRM *ex situ*, *in situ* et potentiellement *in vivo*.

7.4 Limitations générales

Les études de cette thèse ont toutes été conduites grâce à un échantillonnage de convenance. Tous les cerveaux mis à notre disposition ont été utilisés dans les différentes étapes des protocoles complets de notre laboratoire, et même si plusieurs des variables confondantes n'ont pas été contrôlées, certaines d'entre elles sont toutefois réduites en utilisant des critères

d'inclusion spécifiques. En effet, les corps sont refusés au laboratoire s'ils ne peuvent pas être embaumés dans un DPM de 48h ou moins. De plus, les cerveaux des donneurs avec un diagnostic de maladies neurologiques ou neurodégénératives ont été exclus des analyses. L'utilisation de tissu provenant de cerveaux avec plusieurs variables confondantes pourraient être perçue comme un désavantage dans les études rapportées dans cette thèse. Cependant, les travaux montrent que malgré ces variables confondantes, les méthodes proposées sont réalisables et avec une qualité adéquate; l'utilisation de cerveaux humains post-mortem peuvent donc être utilisés même si certaines variables ne sont pas contrôlées.

7.5 Prochaines avenues des projets de cette thèse

Comme une des limites importantes est le faible échantillonnage, la bonification de l'échantillonnage pourrait mener à des études quantitatives plus approfondies. Ceci permettrait aussi d'inclure la méthode d'administration du fixateur (immersion vs perfusion) comme covariable dans des modèles statistiques. Une autre possibilité pour évaluer cette variable confondante serait d'effectuer les mêmes analyses du projet pilote chez la souris (Chapitre 2), mais avec des cerveaux mis en immersion dans la SFA, la SSS et la SA. De cette manière, il serait possible d'évaluer si les effets des solutions de fixation diffèrent selon la méthode d'administration du fluide.

De plus, l'histologie a été effectuée sur du cortex cérébral et la MB sous corticale seulement. Il serait aussi bénéfique pour la communauté scientifique d'effectuer les mêmes analyses sur les noyaux gris centraux (NGC), le tronc cérébral, le cervelet et la moelle épinière, puisque ceux-ci peuvent aussi être affectés différemment par la fixation chimique. Une étude récente a d'ailleurs procédé à des analyses histologiques de base (H&E, bleu de toluidine, rouge neutre, etc.) sur des moelles allongées et moelle épinières fixées avec une SA (formulation similaire à notre laboratoire), qui démontre une qualité satisfaisante pour des études histologiques (Trucas et al., 2024). De plus, les neuroscientifiques intéressés par les NGC, le tronc cérébral ou la moelle épinière, ou par des maladies neurodégénératives qui les impliquent, pourraient avoir accès aux spécimens complets des laboratoires d'anatomie.

Puisque notre laboratoire a acquis plus de 20 scans de cerveaux *in situ* et possède environ une centaine d'hémisphères cérébraux pouvant être scannés *ex situ*, d'autres analyses d'IRM pourront être effectuées. Une prochaine étape serait d'évaluer si la post-fixation des cerveaux pourrait améliorer le contraste MB-MG dans la séquence pondérée T1, et même de renverser le contraste lorsque la non-inversion des cerveaux est observée. De plus, les scans *in situ* des têtes fixées avec la SA (puisqu'elles résultent en un meilleur contraste que les SSS) seront utilisés pour élaborer un atlas stéréotaxique *ex vivo* basé sur la moyenne (comme le MNI-*ICBM152 average template* reconnu mondialement[23]). Le développement de techniques de recalage automatique et non-linéaire serait également une avenue à explorer dans les cerveaux fixés avec les trois solutions afin d'établir des protocoles qui prendraient en compte les déformations histologiques de manière plus sensible et efficace pour chaque solution.

Finalement, les protocoles développés pour cette thèse ont été testés sur des cerveaux humains vieillissants normaux, mais il serait pertinent de faire des études sur des cerveaux fixés avec la SSS et la SA atteints de neuropathologie, ce qui sera d'ailleurs exploré dans le cadre de mon stage post-doctoral.

7.6 Conclusions globales

En conclusion, la SA serait la meilleure pour conserver une qualité satisfaisante pour toutes les avenues testées durant les projets de cette thèse. En effet, la SA est la solution de choix pour conserver les corps pour l'anatomie macroscopique, en plus de préserver l'antigénicité des principales populations cellulaires et d'offrir une meilleure qualité globale de IHC et de HC. Les cerveaux fixés avec la SA sont utilisables pour l'IRM, surtout en T2, ainsi que pour le recalage d'images. La SSS serait la solution la moins adaptée pour la recherche neuroscientifique, bien que tous les résultats de cette thèse montrent tout de même la faisabilité des différentes techniques avec ces cerveaux. De plus, les protocoles pourraient être optimisés pour chaque solution dans de futures études. **Les cerveaux des laboratoires d'anatomie pourraient donc être utilisés**

[23] https://www.bic.mni.mcgill.ca/ServicesAtlases/ICBM152NLin2009

comme une source de tissu cérébral pour la recherche neuroscientifique qui utilise l'IRM et l'histologie.

Références bibliographiques

Acosta-Cabronero, J., Milovic, C., Mattern, H., Tejos, C., Speck, O., & Callaghan, M. F. (2018). A robust multi-scale approach to quantitative susceptibility mapping. *Neuroimage*, *183*, 7-24. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.07.065

Adam, S. A., Schnell, O., Pöschl, J., Eigenbrod, S., Kretzschmar, H. A., Tonn, J. C., & Schüller, U. (2012). ALDH1A1 is a marker of astrocytic differentiation during brain development and correlates with better survival in glioblastoma patients. *Brain Pathol*, *22*(6), 788-797. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00592.x

Adiele, R. C., & Adiele, C. A. (2019). Metabolic defects in multiple sclerosis. *Mitochondrion*, *44*, 7-14. https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.12.005

Adler, D. H., Liu, A. Y., Pluta, J., Kadivar, S., Orozco, S., Wang, H., Gee, J. C., Avants, B. B., & Yushkevich, P. A. (2012). Reconstruction of the human hippocampus in 3D from histology and high-resolution ex-vivo MRI. *Proc IEEE Int Symp Biomed Imaging*, *2012*, 294-297. https://doi.org/10.1109/isbi.2012.6235542

Adler, D. H., Pluta, J., Kadivar, S., Craige, C., Gee, J. C., Avants, B. B., & Yushkevich, P. A. (2014). Histology-derived volumetric annotation of the human hippocampal subfields in postmortem MRI. *Neuroimage*, *84*, 505-523. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.067

Alelú-Paz, R., Iturrieta-Zuazo, I., Byne, W., Haroutunian, V., García-Villanueva, M., Rábano, A., García-Amado, M., Prensa, L., & Giménez-Amaya, J. M. (2008). A new antigen retrieval technique for human brain tissue. *PLoS One*, *3*(10), e3378. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003378

Alkemade, A., Groot, J. M., & Forstmann, B. U. (2018). Do We Need a Human post mortem Whole-Brain Anatomical Ground Truth in in vivo Magnetic Resonance Imaging? *Frontiers in neuroanatomy*, *12*, 110. https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00110

Alkemade, A., Pine, K., Kirilina, E., Keuken, M. C., Mulder, M. J., Balesar, R., Groot, J. M., Bleys, R. L. A. W., Trampel, R., Weiskopf, N., Herrler, A., Möller, H. E., Bazin, P.-L., & Forstmann, B. U. (2020). 7 Tesla MRI Followed by Histological 3D Reconstructions in Whole-Brain Specimens [Original Research]. *14*(68). https://doi.org/10.3389/fnana.2020.536838

Allsop, D. (2000). Introduction to Alzheimer's disease. *Methods Mol Med*, *32*, 1-21. https://doi.org/10.1385/1-59259-195-7:1

Alnawafleh, T. M., Radzi, Y., Alshipli, M., Oglat, A. A., & Alflahat, A. (2024). A Comprehensive Review of the Recent Advancements in Imaging Segmentation and Registration Techniques for Glioblastoma and Focusing on the Utilization of Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Computed Tomography (CT) Scans. *Curr Med Imaging*, *20*(1), e15734056309829. https://doi.org/10.2174/0115734056309829240909095801

Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M., & Mohammedsaleh, Z. M. (2015). Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Glob J Health Sci*, *8*(3), 72-79. https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72

Alvernia, J. E., Pradilla, G., Mertens, P., Lanzino, G., & Tamargo, R. J. (2010). Latex injection of cadaver heads: technical note. *Neurosurgery*, *67*(2 Suppl Operative), 362-367. https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e3181f8c247

Amunts, K., Lepage, C., Borgeat, L., Mohlberg, H., Dickscheid, T., Rousseau, M., Bludau, S., Bazin, P. L., Lewis, L. B., Oros-Peusquens, A. M., Shah, N. J., Lippert, T., Zilles, K., & Evans, A. C. (2013). BigBrain: an ultrahigh-resolution 3D human brain model. *Science*, *340*(6139), 1472-1475. https://doi.org/10.1126/science.1235381

Amunts, K., Mohlberg, H., Bludau, S., & Zilles, K. (2020). Julich-Brain: A 3D probabilistic atlas of the human brain's cytoarchitecture. *Science*, *369*(6506), 988-992. https://doi.org/10.1126/science.abb4588

Amunts, K., & Zilles, K. (2015). Architectonic Mapping of the Human Brain beyond Brodmann. *Neuron*, *88*(6), 1086-1107. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.001

Aoki, T., Kobayashi, K., & Isaki, K. (1999). Microglial and astrocytic change in brains of Creutzfeldt-Jakob disease: an immunocytochemical and quantitative study. *Clin Neuropathol*, *18*(2), 51-60.

Apostolova, L. G., Zarow, C., Biado, K., Hurtz, S., Boccardi, M., Somme, J., Honarpisheh, H., Blanken, A. E., Brook, J., Tung, S., Lo, D., Ng, D., Alger, J. R., Vinters, H. V., Bocchetta, M., Duvernoy, H., Jack, C. R., Jr., & Frisoni, G. B. (2015). Relationship between hippocampal atrophy and neuropathology markers: a 7T MRI validation study of the EADC-ADNI Harmonized Hippocampal Segmentation Protocol. *Alzheimers Dement*, *11*(2), 139-150. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.01.001

Arlinghaus, L. R., Dortch, R. D., Whisenant, J. G., Kang, H., Abramson, R. G., & Yankeelov, T. E. (2016). Quantitative Magnetization Transfer Imaging of the Breast at 3.0 T: Reproducibility in Healthy Volunteers. *Tomography*, *2*(4), 260-266. https://doi.org/10.18383/j.tom.2016.00142

Arnold, M. M., Srivastava, S., Fredenburgh, J., Stockard, C. R., Myers, R. B., & Grizzle, W. E. (1996). Effects of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. *Biotech Histochem*, *71*(5), 224-230. https://doi.org/10.3109/10520299609117164

Auer, H., Cabalo, D. G., Rodríguez-Cruces, R., Benkarim, O., Paquola, C., DeKraker, J., Wang, Y., Valk, S. L., Bernhardt, B. C., & Royer, J. (2025). From histology to macroscale function in the human amygdala. *Elife*, *13*. https://doi.org/10.7554/eLife.101950

Augustinack, J. C., & van der Kouwe, A. J. (2016). Postmortem imaging and neuropathologic correlations. *Handb Clin Neurol*, *136*, 1321-1339. https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53486-6.00069-7

Avesta, A., Hossain, S., Lin, M., Aboian, M., Krumholz, H. M., & Aneja, S. (2023). Comparing 3D, 2.5D, and 2D Approaches to Brain Image Auto-Segmentation. *Bioengineering (Basel)*, *10*(2). https://doi.org/10.3390/bioengineering10020181

Azkona, G., & Sanchez-Pernaute, R. (2022). Mice in translational neuroscience: What R we doing? *Prog Neurobiol*, *217*, 102330. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2022.102330

Bakken, T. E., Jorstad, N. L., Hu, Q., Lake, B. B., Tian, W., Kalmbach, B. E., Crow, M., Hodge, R. D., Krienen, F. M., Sorensen, S. A., Eggermont, J., Yao, Z., Aevermann, B. D., Aldridge, A. I., Bartlett, A., Bertagnolli, D., Casper, T., Castanon, R. G., Crichton, K., . . . Lein, E. S. (2021).

Comparative cellular analysis of motor cortex in human, marmoset and mouse. *Nature*, *598*(7879), 111-119. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03465-8

Baldwin, K. T., Murai, K. K., & Khakh, B. S. (2024). Astrocyte morphology. *Trends Cell Biol*, *34*(7), 547-565. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.09.006

Balta, J. Y., Cronin, M., Cryan, J. F., & O'Mahony, S. M. (2015). Human preservation techniques in anatomy: A 21st century medical education perspective. *Clin Anat*, *28*(6), 725-734. https://doi.org/10.1002/ca.22585

Balta, J. Y., Cryan, J. F., & O'Mahony, S. M. (2019). The antimicrobial capacity of embalming solutions: a comparative study. *J Appl Microbiol*, *126*(3), 764-770. https://doi.org/10.1111/jam.14191

Balta, J. Y., Lamb, C., & Soames, R. W. (2015). A pilot study comparing the use of Thiel- and formalin-embalmed cadavers in the teaching of human anatomy. *Anat Sci Educ*, *8*(1), 86-91. https://doi.org/10.1002/ase.1470

Balta, J. Y., Twomey, M., Moloney, F., Duggan, O., Murphy, K. P., O'Connor, O. J., Cronin, M., Cryan, J. F., Maher, M. M., & O'Mahony, S. M. (2019). A comparison of embalming fluids on the structures and properties of tissue in human cadavers. *Anat Histol Embryol*, *48*(1), 64-73. https://doi.org/10.1111/ahe.12412

Balta, J. Y., Venne, G., & Noël, G. (2022). 10 tips on working with human body donors in medical training and research. *Anat Sci Int*, *97*(3), 307-312. https://doi.org/10.1007/s12565-022-00651-0

Barton, D. P., Davies, D. C., Mahadevan, V., Dennis, L., Adib, T., Mudan, S., Sohaib, A., & Ellis, H. (2009). Dissection of soft-preserved cadavers in the training of gynaecological oncologists: report of the first UK workshop. *Gynecol Oncol*, *113*(3), 352-356. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.02.012

Baschong, W., Suetterlin, R., & Laeng, R. H. (2001). Control of Autofluorescence of Archival Formaldehyde-fixed, Paraffin-embedded Tissue in Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *49*(12), 1565-1571. https://doi.org/10.1177/002215540104901210

Basu, K., Green, E. M., Cheng, Y., & Craik, C. S. (2019). Why recombinant antibodies - benefits and applications. *Curr Opin Biotechnol*, *60*, 153-158. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.01.012

Bauer, D. R., Stevens, B., Chafin, D., Theiss, A. P., & Otter, M. (2016). Active monitoring of formaldehyde diffusion into histological tissues with digital acoustic interferometry. *J Med Imaging (Bellingham)*, *3*(1), 017002. https://doi.org/10.1117/1.Jmi.3.1.017002

Beach, T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Serrano, G., Shill, H. A., Walker, D. G., Lue, L., Roher, A. E., Dugger, B. N., Maarouf, C., Birdsill, A. C., Intorcia, A., Saxon-Labelle, M., Pullen, J., Scroggins, A., Filon, J., Scott, S., Hoffman, B., Garcia, A., . . . Sabbagh, M. N. (2015). Arizona Study of Aging and Neurodegenerative Disorders and Brain and Body Donation Program. *Neuropathology*, *35*(4), 354-389. https://doi.org/10.1111/neup.12189

Beach, T. G., Sue, L. I., Scott, S., Intorcia, A. J., Walker, J. E., Arce, R. A., Glass, M. J., Borja, C. I., Cline, M. P., Hemmingsen, S. J., Qiji, S., Stewart, A., Martinez, K. N., Krupp, A., McHattie, R., Mariner, M., Lorenzini, I., Kuramoto, A., Long, K. E., . . . Serrano, G. E. (2023). Cerebral white matter rarefaction has both neurodegenerative and vascular causes and may

primarily be a distal axonopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*, *82*(6), 457-466. https://doi.org/10.1093/jnen/nlad026

Beach, T. G., Tago, H., Nagai, T., Kimura, H., McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1987). Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation. *J Neurosci Methods*, *19*(3), 183-192. https://doi.org/10.1016/s0165-0270(87)80001-8

Beare, R., Richards, K., Murphy, S., Petrou, S., & Reutens, D. (2008). An assessment of methods for aligning two-dimensional microscope sections to create image volumes. *J Neurosci Methods*, *170*(2), 332-344. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.012

Beaujoin, J., Palomero-Gallagher, N., Boumezbeur, F., Axer, M., Bernard, J., Poupon, F., Schmitz, D., Mangin, J. F., & Poupon, C. (2018). Post-mortem inference of the human hippocampal connectivity and microstructure using ultra-high field diffusion MRI at 11.7 T. *Brain Struct Funct*, *223*(5), 2157-2179. https://doi.org/10.1007/s00429-018-1617-1

Benet, A., Rincon-Torroella, J., Lawton, M. T., & González Sánchez, J. J. (2014). Novel embalming solution for neurosurgical simulation in cadavers. *J Neurosurg*, *120*(5), 1229-1237. https://doi.org/10.3171/2014.1.Jns131857

Benkhadra, M., Gérard, J., Genelot, D., Trouilloud, P., Girard, C., Anderhuber, F., & Feigl, G. (2011). Is Thiel's embalming method widely known? A world survey about its use. *Surg Radiol Anat*, *33*(4), 359-363. https://doi.org/10.1007/s00276-010-0705-6

Benninger, B., Matsler, N., & Delamarter, T. (2014). Classic versus millennial medical lab anatomy. *Clin Anat*, *27*(7), 988-993. https://doi.org/10.1002/ca.22260

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*(4), 458-465. https://doi.org/10.1002/nbm.3477

Blair, J. A., Wang, C., Hernandez, D., Siedlak, S. L., Rodgers, M. S., Achar, R. K., Fahmy, L. M., Torres, S. L., Petersen, R. B., Zhu, X., Casadesus, G., & Lee, H.-g. (2016). Correction: Individual Case Analysis of Postmortem Interval Time on Brain Tissue Preservation. *PLoS One*, *11*(6), e0157209. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157209

Blamire, A. M., Rowe, J. G., Styles, P., & McDonald, B. (1999). Optimising imaging parameters for post mortem MR imaging of the human brain. *Acta Radiol*, *40*(6), 593-597. https://doi.org/10.3109/02841859909175593

Bloch, F. (1946). Nuclear Induction. *Physical Review*, *70*(7-8), 460-474. https://doi.org/10.1103/PhysRev.70.460

Boban, J., Thurnher, M. M., Boban, N., Law, M., Jahanshad, N., Nir, T. M., Lendak, D. F., & Kozic, D. (2022). Gradient Patterns of Age-Related Diffusivity Changes in Cerebral White Matter. *Frontiers in neurology*, *13*, 870909. https://doi.org/10.3389/fneur.2022.870909

Bobinski, M., de Leon, M. J., Wegiel, J., Desanti, S., Convit, A., Saint Louis, L. A., Rusinek, H., & Wisniewski, H. M. (2000). The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *95*(3), 721-725. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00476-5

Böhm, E. (1983). A preparative technique for morphological analysis of the vessels in head and neck for medico-legal examinations. *Scan Electron Microsc*(Pt 4), 1973-1981.

Bolton, W. K., & Mesnard, R. M. (1982). Methods in laboratory investigation. New technique of kidney tissue processing for immunofluorescence microscopy: Formol sucrose/gum

sucrose/paraffin [Article]. *Laboratory Investigation*, *47*(2), 206-213. https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0019986293&partnerID=40&md5=2c7b04fdc5e359bff7cbdd81f7bf1fe0

Bos, D., Wolters, F. J., Darweesh, S. K. L., Vernooij, M. W., de Wolf, F., Ikram, M. A., & Hofman, A. (2018). Cerebral small vessel disease and the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis of population-based evidence. *Alzheimers Dement*, *14*(11), 1482-1492. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.04.007

Boulant, N., Mauconduit, F., Gras, V., Amadon, A., Le Ster, C., Luong, M., Massire, A., Pallier, C., Sabatier, L., Bottlaender, M., Vignaud, A., & Le Bihan, D. (2024). In vivo imaging of the human brain with the Iseult 11.7-T MRI scanner. *Nature Methods*, *21*(11), 2013-2016. https://doi.org/10.1038/s41592-024-02472-7

Bouman, P. M., Steenwijk, M. D., Pouwels, P. J. W., Schoonheim, M. M., Barkhof, F., Jonkman, L. E., & Geurts, J. J. G. (2020). Histopathology-validated recommendations for cortical lesion imaging in multiple sclerosis. *Brain*, *143*(10), 2988-2997. https://doi.org/10.1093/brain/awaa233

Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretzschmar, H., & Del Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*, *112*(4), 389-404. https://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z

Bradbury, S. A., & Hoshino, K. (1978). An improved embalming procedure for long-lasting preservation of the cadaver for anatomical study. *Acta Anat (Basel)*, *101*(2), 97-103. https://doi.org/10.1159/000144954

Braffman, B. H., Zimmerman, R. A., Trojanowski, J. Q., Gonatas, N. K., Hickey, W. F., & Schlaepfer, W. W. (1988). Brain MR: pathologic correlation with gross and histopathology. 1. Lacunar infarction and Virchow-Robin spaces. *AJR Am J Roentgenol*, *151*(3), 551-558. https://doi.org/10.2214/ajr.151.3.551

Brant-Zawadzki, M., Gillan, G. D., & Nitz, W. R. (1992). MP RAGE: a three-dimensional, T1-weighted, gradient-echo sequence--initial experience in the brain. *Radiology*, *182*(3), 769-775. https://doi.org/10.1148/radiology.182.3.1535892

Brenner, E. (2014). Human body preservation - old and new techniques. *J Anat*, *224*(3), 316-344. https://doi.org/10.1111/joa.12160

Brodmann, K. (1909). Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. *Barth JA, Leipzig*.

Bronge, L., Bogdanovic, N., & Wahlund, L. O. (2002). Postmortem MRI and histopathology of white matter changes in Alzheimer brains. A quantitative, comparative study. *Dement Geriatr Cogn Disord*, *13*(4), 205-212. https://doi.org/10.1159/000057698

Brown, D., Lydon, J., McLaughlin, M., Stuart-Tilley, A., Tyszkowski, R., & Alper, S. (1996). Antigen retrieval in cryostat tissue sections and cultured cells by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS). *Histochemistry and Cell Biology*, *105*(4), 261-267. https://doi.org/10.1007/BF01463929

Brown, L. G. (1992). A survey of image registration techniques. *ACM Comput. Surv.*, *24*(4), 325–376. https://doi.org/10.1145/146370.146374

Brown, R. W., Norman Cheng, Y.-C., Mark Haacke, E., Thompson, M. R., & Venkatesan, R. (2014). *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design* (2nd ed.).

Brun, A., Liu, X., & Erikson, C. (1995). Synapse loss and gliosis in the molecular layer of the cerebral cortex in Alzheimer's disease and in frontal lobe degeneration. *Neurodegeneration*, *4*(2), 171-177. https://doi.org/10.1006/neur.1995.0021

Brunner, C., Lassmann, H., Waehneldt, T. V., Matthieu, J.-M., & Linington, C. (1989). Differential Ultrastructural Localization of Myelin Basic Protein, Myelin/Oligodendroglial Glycoprotein, and 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase in the CNS of Adult Rats. *Journal of Neurochemistry*, *52*(1), 296-304. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb10930.x

Bruns, J., Werner, M., & Habermann, C. (2018). Osteochondritis Dissecans: Etiology, Pathology, and Imaging with a Special Focus on the Knee Joint. *Cartilage*, *9*(4), 346-362. https://doi.org/10.1177/1947603517715736

Cabrera, N. C., Espinoza, J. R., Vargas-Jentzsch, P., Sandoval, P., Ramos, L. A., & Aponte, P. M. (2017). Alcohol-based solutions for bovine testicular tissue fixation. *J Vet Diagn Invest*, *29*(1), 91-99. https://doi.org/10.1177/1040638716672252

Campbell, J. M., JL. (1998). *Preservative and embalming fluid*. https://patents.google.com/patent/US5827511A/en

Campbell, M. J., & Morrison, J. H. (1989). Monoclonal antibody to neurofilament protein (SMI-32) labels a subpopulation of pyramidal neurons in the human and monkey neocortex. *J Comp Neurol*, *282*(2), 191-205. https://doi.org/10.1002/cne.902820204

Caplan, J., Niethammer, M., Taylor, R. M., 2nd, & Czymmek, K. J. (2011). The power of correlative microscopy: multi-modal, multi-scale, multi-dimensional. *Curr Opin Struct Biol*, *21*(5), 686-693. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.06.010

Cardinale, F., Chinnici, G., Bramerio, M., Mai, R., Sartori, I., Cossu, M., Lo Russo, G., Castana, L., Colombo, N., Caborni, C., De Momi, E., & Ferrigno, G. (2014). Validation of FreeSurfer-estimated brain cortical thickness: comparison with histologic measurements. *Neuroinformatics*, *12*(4), 535-542. https://doi.org/10.1007/s12021-014-9229-2

Cardoso, J. R., Pereira, L. M., Iversen, M. D., & Ramos, A. L. (2014). What is gold standard and what is ground truth? *Dental Press J Orthod*, *19*(5), 27-30. https://doi.org/10.1590/2176-9451.19.5.027-030.ebo

Carlos, A. F., Poloni, T. E., Medici, V., Chikhladze, M., Guaita, A., & Ceroni, M. (2019). From brain collections to modern brain banks: A historical perspective. *Alzheimers Dement (N Y)*, *5*, 52-60. https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.12.002

Carpenter, T. A., & Williams, E. J. (1999). MRI - from basic knowledge to advanced strategies: hardware. *Eur Radiol*, *9*(6), 1015-1019. https://doi.org/10.1007/s003300050787

Ceritoglu, C., Wang, L., Selemon, L. D., Csernansky, J. G., Miller, M. I., & Ratnanather, J. T. (2010). Large Deformation Diffeomorphic Metric Mapping Registration of Reconstructed 3D Histological Section Images and in vivo MR Images. *Front Hum Neurosci*, *4*, 43. https://doi.org/10.3389/fnhum.2010.00043

Cho, W., Kim, S., & Park, Y.-G. (2023). Towards multiplexed immunofluorescence of 3D tissues. *Molecular Brain*, *16*(1), 37. https://doi.org/10.1186/s13041-023-01027-9

Choe, A. S., Gao, Y., Li, X., Compton, K. B., Stepniewska, I., & Anderson, A. W. (2011). Accuracy of image registration between MRI and light microscopy in the ex vivo brain. *Magnetic Resonance Imaging*, *29*(5), 683-692. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mri.2011.02.022

Chumchob, N., & Chen, K. (2008). A robust affine image registration method. *International Journal of Numerical Analysis and Modeling*, *6*(2), 311-334.
Churukian, C. J. (2008). 14 - Pigments and Minerals. In J. D. Bancroft & M. Gamble (Eds.), *Theory and Practice of Histological Techniques (Sixth Edition)* (pp. 233-259). Churchill Livingstone. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10279-0.50021-X
Cifor, A., Bai, L., & Pitiot, A. (2011). Smoothness-guided 3-D reconstruction of 2-D histological images. *Neuroimage*, *56*(1), 197-211. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.01.060
Clancy, B., & Cauller, L. J. (1998). Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. *Journal of Neuroscience Methods*, *83*(2), 97-102. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-0270(98)00066-1
Cloney, M. B., Smith, Z. A., Weber, K. A., 2nd, & Parrish, T. B. (2018). Quantitative Magnetization Transfer MRI Measurements of the Anterior Spinal Cord Region are Associated With Clinical Outcomes in Cervical Spondylotic Myelopathy. *Spine (Phila Pa 1976)*, *43*(10), 675-680. https://doi.org/10.1097/brs.0000000000002470
Coleman, R., & Kogan, I. (1998). An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. *J Anat*, *192 (Pt 3)*(Pt 3), 443-446. https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1998.19230443.x
Connor, J. R., & Benkovic, S. A. (1992). Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical, and molecular considerations. *Ann Neurol*, *32 Suppl*, S51-61. https://doi.org/10.1002/ana.410320710
Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, *164*(4), 1079-1106. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x
Crosado, B., Löffler, S., Ondruschka, B., Zhang, M., Zwirner, J., & Hammer, N. (2020). Phenoxyethanol-Based Embalming for Anatomy Teaching: An 18 Years' Experience with Crosado Embalming at the University of Otago in New Zealand. *Anat Sci Educ*, *13*(6), 778-793. https://doi.org/10.1002/ase.1933
Crum, W. R., Hartkens, T., & Hill, D. L. G. (2004). Non-rigid image registration: theory and practice. *British Journal of Radiology*, *77*(suppl_2), S140-S153. https://doi.org/10.1259/bjr/25329214
Culling, C. F. A., Allison, R., & Barr, W. (2014). *Cellular pathology technique*. Elsevier.
D'Arceuil, H., & de Crespigny, A. (2007). The effects of brain tissue decomposition on diffusion tensor imaging and tractography. *Neuroimage*, *36*(1), 64-68. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.02.039
D'Arceuil, H. E., Westmoreland, S., & de Crespigny, A. J. (2007). An approach to high resolution diffusion tensor imaging in fixed primate brain. *Neuroimage*, *35*(2), 553-565. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.12.028
Dadar, M., Fonov, V. S., & Collins, D. L. (2018). A comparison of publicly available linear MRI stereotaxic registration techniques. *Neuroimage*, *174*, 191-200. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.03.025
Dadar, M., Mahmoud, S., Narayanan, S., Collins, D. L., Arnold, D. L., & Maranzano, J. (2022). Diffusely abnormal white matter converts to T2 lesion volume in the absence of MRI-detectable acute inflammation. *Brain*, *145*(6), 2008-2017. https://doi.org/10.1093/brain/awab448

Dadar, M., Mahmoud, S., Zhernovaia, M., Camicioli, R., Maranzano, J., & Duchesne, S. (2022). White matter hyperintensity distribution differences in aging and neurodegenerative disease cohorts. *Neuroimage Clin*, *36*, 103204. https://doi.org/10.1016/j.nicl.2022.103204

Dadar, M., Maranzano, J., Misquitta, K., Anor, C. J., Fonov, V. S., Tartaglia, M. C., Carmichael, O. T., Decarli, C., & Collins, D. L. (2017). Performance comparison of 10 different classification techniques in segmenting white matter hyperintensities in aging. *Neuroimage*, *157*, 233-249. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.06.009

Dadar, M., Sanches, L. G., Fouquet, J., Moqadam, R., Alasmar, Z., Leppert, I., Mirault, D., Maranzano, J., Mechawar, N., Chakravarty, M., & Zeighami, Y. (2024). The Douglas-Bell Canada Brain Bank Post-mortem Brain Imaging Protocol. *Aperture Neuro*, *4*. https://doi.org/https://doi.org/10.52294/001c.123347

Dauguet, J. (2005). *L'imagerie post mortem tridimensionnelle cérébrale: constitution et apport pour l'analyse conjointe de données histologiques anatomo-fonctionnelles et la mise en correspondance avec l'imagerie in vivo.* (Publication Number 2005-15) École centrale des arts et manufactures "École centrale Paris"]. Paris.

Dauguet, J., Delzescaux, T., Condé, F., Mangin, J. F., Ayache, N., Hantraye, P., & Frouin, V. (2007). Three-dimensional reconstruction of stained histological slices and 3D non-linear registration with in-vivo MRI for whole baboon brain. *J Neurosci Methods*, *164*(1), 191-204. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.04.017

Dawe, R. J., Bennett, D. A., Schneider, J. A., & Arfanakis, K. (2011). Neuropathologic correlates of hippocampal atrophy in the elderly: a clinical, pathologic, postmortem MRI study. *PLoS One*, *6*(10), e26286. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026286

Dawe, R. J., Bennett, D. A., Schneider, J. A., Vasireddi, S. K., & Arfanakis, K. (2009). Postmortem MRI of human brain hemispheres: T2 relaxation times during formaldehyde fixation. *Magn Reson Med*, *61*(4), 810-818. https://doi.org/10.1002/mrm.21909

De Barros, A., Arribarat, G., Combis, J., Chaynes, P., & Péran, P. (2019). Matching ex vivo MRI With Iron Histology: Pearls and Pitfalls. *Frontiers in neuroanatomy*, *13*, 68-68. https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00068

de Flores, R., Berron, D., Ding, S. L., Ittyerah, R., Pluta, J. B., Xie, L., Adler, D. H., Robinson, J. L., Schuck, T., Trojanowski, J. Q., Grossman, M., Liu, W., Pickup, S., Das, S. R., Wolk, D. A., Yushkevich, P. A., & Wisse, L. E. M. (2020). Characterization of hippocampal subfields using ex vivo MRI and histology data: Lessons for in vivo segmentation. *Hippocampus*, *30*(6), 545-564. https://doi.org/10.1002/hipo.23172

de Guzman, A. E., Wong, M. D., Gleave, J. A., & Nieman, B. J. (2016). Variations in post-perfusion immersion fixation and storage alter MRI measurements of mouse brain morphometry. *Neuroimage*, *142*, 687-695. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.06.028

de Oliveira, K. C., Nery, F. G., Ferreti, R. E., Lima, M. C., Cappi, C., Machado-Lima, A., Polichiso, L., Carreira, L. L., Ávila, C., Alho, A. T., Brentani, H. P., Miguel, E. C., Heinsen, H., Jacob-Filho, W., Pasqualucci, C. A., Lafer, B., & Grinberg, L. T. (2012). Brazilian psychiatric brain bank: a new contribution tool to network studies. *Cell Tissue Bank*, *13*(2), 315-326. https://doi.org/10.1007/s10561-011-9258-0

Debette, S., & Markus, H. S. (2010). The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, *341*, c3666. https://doi.org/10.1136/bmj.c3666

Del Signore, F., Arribarat, G., Della Salda, L., Mogicato, G., Deviers, A., Cartiaux, B., Vignoli, M., Peran, P., & de Pasquale, F. (2022). Volumetric assessment and longitudinal changes of subcortical structures in formalinized Beagle brains. *PLoS One*, *17*(10), e0261484. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261484

Delzescaux, T., Lebenberg, J., Raguet, H., Hantraye, P., Souedet, N., & Gregoire, M. C. (2010). Segmentation of small animal PET/CT mouse brain scans using an MRI-based 3D digital atlas. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, *2010*, 3097-3100. https://doi.org/10.1109/iembs.2010.5626106

den Bakker, M. A. (2017). [Is histopathology still the gold standard?]. *Ned Tijdschr Geneeskd*, *160*, D981. (Histopathologisch onderzoek als gouden standaard?)

Denis de Senneville, B., Manjón, J. V., & Coupé, P. (2020). RegQCNET: Deep quality control for image-to-template brain MRI affine registration. *Phys Med Biol*, *65*(22), 225022. https://doi.org/10.1088/1361-6560/abb6be

Denk, W., & Horstmann, H. (2004). Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol*, *2*(11), e329. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020329

Despotović, I., Goossens, B., & Philips, W. (2015). MRI segmentation of the human brain: challenges, methods, and applications. *Comput Math Methods Med*, *2015*, 450341. https://doi.org/10.1155/2015/450341

Dickerson, B. C., Feczko, E., Augustinack, J. C., Pacheco, J., Morris, J. C., Fischl, B., & Buckner, R. L. (2009). Differential effects of aging and Alzheimer's disease on medial temporal lobe cortical thickness and surface area. *Neurobiol Aging*, *30*(3), 432-440. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.022

Ding, S. L., Royall, J. J., Sunkin, S. M., Ng, L., Facer, B. A., Lesnar, P., Guillozet-Bongaarts, A., McMurray, B., Szafer, A., Dolbeare, T. A., Stevens, A., Tirrell, L., Benner, T., Caldejon, S., Dalley, R. A., Dee, N., Lau, C., Nyhus, J., Reding, M., . . . Lein, E. S. (2016). Comprehensive cellular-resolution atlas of the adult human brain. *J Comp Neurol*, *524*(16), 3127-3481. https://doi.org/10.1002/cne.24080

Domagała, Z., Drazyk, M., Pioterek, O., Kozlowski, O., Lubieniecki, P., Sroczynski, M., Dudek, A., Woźniak, S., Tarkowski, V., & Mazurek, M. (2025). Precision in preservation: mastering cadaver embalming with the femoral artery approach — a technical note. *Folia Morphologica*, *84*(1), 243-248. https://doi.org/10.5603/fm.99260

Du, J., Yi, M., Zhou, F., He, W., Yang, A., Qiu, M., & Huang, H. (2021). S100B is selectively expressed by gray matter protoplasmic astrocytes and myelinating oligodendrocytes in the developing CNS. *Mol Brain*, *14*(1), 154. https://doi.org/10.1186/s13041-021-00865-9

Dubost, F., Bruijne, M., Nardin, M., Dalca, A. V., Donahue, K. L., Giese, A. K., Etherton, M. R., Wu, O., Groot, M., Niessen, W., Vernooij, M., Rost, N. S., & Schirmer, M. D. (2020). Multi-atlas image registration of clinical data with automated quality assessment using ventricle segmentation. *Med Image Anal*, *63*, 101698. https://doi.org/10.1016/j.media.2020.101698

Duffy, B. A., Zhao, L., Sepehrband, F., Min, J., Wang, D. J., Shi, Y., Toga, A. W., & Kim, H. (2021). Retrospective motion artifact correction of structural MRI images using deep learning improves the quality of cortical surface reconstructions. *Neuroimage*, *230*, 117756. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.117756

Durand-Martel, P., Tremblay, D., Brodeur, C., & Paquet, N. (2010). Autopsy as gold standard in FDG-PET studies in dementia. *Can J Neurol Sci*, *37*(3), 336-342. https://doi.org/10.1017/s0317167100010222

Dusek, P., Hofer, T., Alexander, J., Roos, P. M., & Aaseth, J. O. (2022). Cerebral Iron Deposition in Neurodegeneration. *Biomolecules*, *12*(5). https://doi.org/10.3390/biom12050714

Duyn, J. (2013). MR susceptibility imaging. *J Magn Reson*, *229*, 198-207. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2012.11.013

Edlow, B. L., Mareyam, A., Horn, A., Polimeni, J. R., Witzel, T., Tisdall, M. D., Augustinack, J. C., Stockmann, J. P., Diamond, B. R., Stevens, A., Tirrell, L. S., Folkerth, R. D., Wald, L. L., Fischl, B., & van der Kouwe, A. (2019). 7 Tesla MRI of the ex vivo human brain at 100 micron resolution. *Sci Data*, *6*(1), 244. https://doi.org/10.1038/s41597-019-0254-8

Eickhoff, S., Walters, N. B., Schleicher, A., Kril, J., Egan, G. F., Zilles, K., Watson, J. D., & Amunts, K. (2005). High-resolution MRI reflects myeloarchitecture and cytoarchitecture of human cerebral cortex. *Hum Brain Mapp*, *24*(3), 206-215. https://doi.org/10.1002/hbm.20082

Eilam-Altstädter, R., Las, L., Witter, M. P., & Ulanovsky, N. (2021). Methods. In R. Eilam-Altstädter, L. Las, M. P. Witter, & N. Ulanovsky (Eds.), *Stereotaxic Brain Atlas of the Egyptian Fruit Bat* (pp. 1-9). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819297-9.00001-5

Eisenstein, M. (2024). Pushing the limits of MRI brain imaging. *Nature Methods*, *21*(11), 1975-1979. https://doi.org/10.1038/s41592-024-02489-y

Eisma, R., Lamb, C., & Soames, R. W. (2013). From formalin to Thiel embalming: What changes? One anatomy department's experiences. *Clin Anat*, *26*(5), 564-571. https://doi.org/10.1002/ca.22222

Eisma, R., & Wilkinson, T. (2014). From "silent teachers" to models. *PLoS Biol*, *12*(10), e1001971. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001971

Elobeid, A., Rantakömi, S., Soininen, H., & Alafuzoff, I. (2014). Alzheimer's disease-related plaques in nondemented subjects. *Alzheimers Dement*, *10*(5), 522-529. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.12.009

Elster, A. D. (1993). Gradient-echo MR imaging: techniques and acronyms. *Radiology*, *186*(1), 1-8. https://doi.org/10.1148/radiology.186.1.8416546

Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R. B., & Grizzle, W. E. (2001). Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues. *Journal of Histotechnology*, *24*(3), 173-190. https://doi.org/10.1179/his.2001.24.3.173

Eng, L. F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol*, *8*(4-6), 203-214. https://doi.org/10.1016/s0165-5728(85)80063-1

Eriksson, S. H., Free, S. L., Thom, M., Harkness, W., Sisodiya, S. M., & Duncan, J. S. (2005). Reliable registration of preoperative MRI with histopathology after temporal lobe resections. *Epilepsia*, *46*(10), 1646-1653. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00257.x

Esato, K., Richards, R., & Eiseman, B. (1975). Distribution of oxygenated blood in experimental perfusion via the femoral and carotid arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg*, *69*(3), 467-471.

Evers, P., Uylings, H. B., & Suurmeijer, A. J. (1998). Antigen retrieval in formaldehyde-fixed human brain tissue. *Methods*, *15*(2), 133-140. https://doi.org/10.1006/meth.1998.0616

Fairhurst, S. (2003). Hazard and risk assessment of industrial chemicals in the occupational context in Europe: some current issues. *Food Chem Toxicol*, *41*(11), 1453-1462. https://doi.org/10.1016/s0278-6915(03)00193-5

Fan, S., Zheng, Y., Liu, X., Fang, W., Chen, X., Liao, W., Jing, X., Lei, M., Tao, E., Ma, Q., Zhang, X., Guo, R., & Liu, J. (2018). Curcumin-loaded PLGA-PEG nanoparticles conjugated with B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *Drug Deliv*, *25*(1), 1091-1102. https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1461955

Farso, M., Ménard, C., Colby-Milley, J., & Quirion, R. (2013). The immune marker CD68 correlates with cognitive impairment in normally aged rats. *Neurobiology of Aging*, *34*(8), 1971-1976. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.008

Fatterpekar, G. M., Naidich, T. P., Delman, B. N., Aguinaldo, J. G., Gultekin, S. H., Sherwood, C. C., Hof, P. R., Drayer, B. P., & Fayad, Z. A. (2002). Cytoarchitecture of the human cerebral cortex: MR microscopy of excised specimens at 9.4 Tesla. *AJNR Am J Neuroradiol*, *23*(8), 1313-1321.

Fazekas, F., Kleinert, R., Offenbacher, H., Schmidt, R., Kleinert, G., Payer, F., Radner, H., & Lechner, H. (1993). Pathologic correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities. *Neurology*, *43*(9), 1683-1689. https://doi.org/10.1212/wnl.43.9.1683

Feczko, E., Augustinack, J. C., Fischl, B., & Dickerson, B. C. (2009). An MRI-based method for measuring volume, thickness and surface area of entorhinal, perirhinal, and posterior parahippocampal cortex. *Neurobiol Aging*, *30*(3), 420-431. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.023

Feigl, G., & Sammer, A. (2022). The influence of dissection on clinical anatomical knowledge for surgical needs. *Surg Radiol Anat*, *44*(1), 9-14. https://doi.org/10.1007/s00276-021-02802-w

Ferreira, A. G. M., Egas, A. P. V., Fonseca, I. M. A., Costa, A. C., Abreu, D. C., & Lobo, L. Q. (2017). The viscosity of glycerol. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, *113*, 162-182. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.05.042

Festa, L. K., Grinspan, J. B., & Jordan-Sciutto, K. L. (2024). White matter injury across neurodegenerative disease. *Trends Neurosci*, *47*(1), 47-57. https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.11.003

Figley, C. R., Uddin, M. N., Wong, K., Kornelsen, J., Puig, J., & Figley, T. D. (2021). Potential Pitfalls of Using Fractional Anisotropy, Axial Diffusivity, and Radial Diffusivity as Biomarkers of Cerebral White Matter Microstructure. *Front Neurosci*, *15*, 799576. https://doi.org/10.3389/fnins.2021.799576

Filippi, M., Brück, W., Chard, D., Fazekas, F., Geurts, J. J. G., Enzinger, C., Hametner, S., Kuhlmann, T., Preziosa, P., Rovira, À., Schmierer, K., Stadelmann, C., & Rocca, M. A. (2019). Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, *18*(2), 198-210. https://doi.org/10.1016/s1474-4422(18)30451-4

Fisher, M. M. (1905). The toxic effects of formaldehyde and formalin. *The Journal of Experimental Medicine*, *6*, 487-517.

Fitzpatrick, J. M. (2010). The role of registration in accurate surgical guidance. *Proc Inst Mech Eng H*, *224*(5), 607-622. https://doi.org/10.1243/09544119jeim589

Flurkey, K., Currer, J. M., & Harrison, D. E. (2007). Mouse Models in Aging Research. In J. G. Fox, M. T. Davisson, F. W. Quimby, S. W. Barthold, C. E. Newcomer, & A. L. Smith (Eds.), *The mouse in biomedical research* (2nd ed., Vol. History, Wild Mice, and Genetics). Academic Press, Elsevier.

Foit, N. A., Yung, S., Lee, H. M., Bernasconi, A., Bernasconi, N., & Hong, S.-J. (2022). A whole-brain 3D myeloarchitectonic atlas: Mapping the Vogt-Vogt legacy to the cortical surface. *Neuroimage*, *263*, 119617. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119617

Fonov, V. S., Dadar, M., Adni, T., & Collins, D. L. (2022). DARQ: Deep learning of quality control for stereotaxic registration of human brain MRI to the T1w MNI-ICBM 152 template. *Neuroimage*, *257*, 119266. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119266

Fonov, V. S., Evans, A. C., McKinstry, R. C., Almli, C. R., & Collins, D. L. (2009). Unbiased nonlinear average age-appropriate brain templates from birth to adulthood. *Neuroimage*, *47*, S102. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1053-8119(09)70884-5

Fortier, J. C., & Hould, R. (2014). *Histotechnologie: théorie et procédés* (2e ed.).

Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., & Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *33*(8), 845-853. https://doi.org/10.1177/33.8.3894502

Fracasso, A., van Veluw, S. J., Visser, F., Luijten, P. R., Spliet, W., Zwanenburg, J. J. M., Dumoulin, S. O., & Petridou, N. (2016). Lines of Baillarger in vivo and ex vivo: Myelin contrast across lamina at 7T MRI and histology. *Neuroimage*, *133*, 163-175. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.02.072

Frigerio, I., Boon, B. D. C., Lin, C. P., Galis-de Graaf, Y., Bol, J., Preziosa, P., Twisk, J., Barkhof, F., Hoozemans, J. J. M., Bouwman, F. H., Rozemuller, A. J. M., van de Berg, W. D. J., & Jonkman, L. E. (2021). Amyloid-β, p-tau and reactive microglia are pathological correlates of MRI cortical atrophy in Alzheimer's disease. *Brain Commun*, *3*(4), fcab281. https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab281

Frigon, E. M., Leppert, I., Tardif, C. L., Dadar, M., & Maranzano, J. (2021). *Longitudinal changes in gray to white matter T1-weighted contrat and T2* relaxation times in an ex vivo-in situ human brain fixed by perfusion* Society for Neuroscience, Virtual.

Frølich, K. W., Andersen, L. M., Knutsen, A., & Flood, P. R. (1984). Phenoxyethanol as a nontoxic substitute for formaldehyde in long-term preservation of human anatomical specimens for dissection and demonstration purposes. *Anat Rec*, *208*(2), 271-278. https://doi.org/10.1002/ar.1092080214

Gabe, M. (1976). *Histological techniques*. Springer-Verlag.

Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*(65). https://doi.org/10.3791/3564

Garbern, J. Y., Cambi, F., Tang, X.-M., Sima, A. A. F., Vallat, J. M., Bosch, E. P., Lewis, R., Shy, M., Sohi, J., Kraft, G., Chen, K. L., Joshi, I., Leonard, D. G. B., Johnson, W., Raskind, W., Dlouhy, S. R., Pratt, V., Hodes, M. E., Bird, T., & Kamholz, J. (1997). Proteolipid Protein Is Necessary in Peripheral as Well as Central Myelin. *Neuron*, *19*(1), 205-218. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80360-8

García-Cabezas, M. Á., Hacker, J. L., & Zikopoulos, B. (2020). A Protocol for Cortical Type Analysis of the Human Neocortex Applied on Histological Samples, the Atlas of Von Economo and Koskinas, and Magnetic Resonance Imaging [Methods]. *14*(97). https://doi.org/10.3389/fnana.2020.576015

García-García Ó, D., Carriel, V., & Chato-Astrain, J. (2024). Myelin histology: a key tool in nervous system research. *Neural Regen Res*, *19*(2), 277-281. https://doi.org/10.4103/1673-5374.375318

Garman, R. H. (1990). Artifacts in routinely immersion fixed nervous tissue. *Toxicol Pathol*, *18*(1 Pt 2), 149-153. https://doi.org/10.1177/019262339001800120

Garrood, M., Keberle, A., Taylor, G. A., Thorn, E. L., Sanctis, C., Farrell, K., Crary, J. F., Sparks, J. S., & McKenzie, A. T. (2025). Mechanical perfusion in brain banking: methods of assessment and relationship to the postmortem interval. *Free Neuropathol*, *6*, 20. https://doi.org/10.17879/freeneuropathology-2025-8880

Gérin-Lajoie, A., Adame-Gonzalez, W., Frigon, E. M., Guerra Sanches, L., Nayouf, A., Boire, D., Dadar, M., & Maranzano, J. (2025). Ex vivo human brain volumetry: Validation of MRI measurements. *Magn Reson Med*. https://doi.org/10.1002/mrm.70083

Gheorghe, R. O., Deftu, A., Filippi, A., Grosu, A., Bica-Popi, M., Chiritoiu, M., Chiritoiu, G., Munteanu, C., Silvestro, L., & Ristoiu, V. (2020). Silencing the Cytoskeleton Protein Iba1 (Ionized Calcium Binding Adapter Protein 1) Interferes with BV2 Microglia Functioning. *Cell Mol Neurobiol*, *40*(6), 1011-1027. https://doi.org/10.1007/s10571-020-00790-w

Giovannoni, F., & Quintana, F. J. (2020). The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. *Trends Immunol*, *41*(9), 805-819. https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.007

Glover, G. H. (2011). Overview of functional magnetic resonance imaging. *Neurosurg Clin N Am*, *22*(2), 133-139, vii. https://doi.org/10.1016/j.nec.2010.11.001

Goldman, M. (2001). Formal theory of spin-lattice relaxation. *J Magn Reson*, *149*(2), 160-187. https://doi.org/10.1006/jmre.2000.2239

Golgi, C. (1873). Sulla sruttura della sostanza grigia del cervello. *Gaz. Med. Ital.*(33), 244-246.

González Ibanez, F., Picard, K., Bordeleau, M., Sharma, K., Bisht, K., & Tremblay, M. (2019). Immunofluorescence Staining Using IBA1 and TMEM119 for Microglial Density, Morphology and Peripheral Myeloid Cell Infiltration Analysis in Mouse Brain. *J Vis Exp*(152). https://doi.org/10.3791/60510

Gonzalez-Riano, C., Tapia-González, S., García, A., Muñoz, A., DeFelipe, J., & Barbas, C. (2017). Metabolomics and neuroanatomical evaluation of post-mortem changes in the hippocampus. *Brain Structure and Function*, *222*(6), 2831-2853. https://doi.org/10.1007/s00429-017-1375-5

Górecka, Ż., Teichmann, J., Nitschke, M., Chlanda, A., Choińska, E., Werner, C., & Swięszkowski, W. (2016). Biodegradable fiducial markers for X-ray imaging - soft tissue integration and biocompatibility. *J Mater Chem B*, *4*(34), 5700-5712. https://doi.org/10.1039/c6tb01001f

Goubran, M., Crukley, C., de Ribaupierre, S., Peters, T. M., & Khan, A. R. (2013). Image registration of ex-vivo MRI to sparsely sectioned histology of hippocampal and neocortical temporal lobe specimens. *Neuroimage*, *83*, 770-781. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.07.053

Goubran, M., de Ribaupierre, S., Hammond, R. R., Currie, C., Burneo, J. G., Parrent, A. G., Peters, T. M., & Khan, A. R. (2015). Registration of in-vivo to ex-vivo MRI of surgically resected

specimens: a pipeline for histology to in-vivo registration. *J Neurosci Methods*, *241*, 53-65. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.12.005

Goubran, M., Leuze, C., Hsueh, B., Aswendt, M., Ye, L., Tian, Q., Cheng, M. Y., Crow, A., Steinberg, G. K., McNab, J. A., Deisseroth, K., & Zeineh, M. (2019). Multimodal image registration and connectivity analysis for integration of connectomic data from microscopy to MRI. *Nature Communications*, *10*(1), 5504. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13374-0

Gouw, A. A., Seewann, A., van der Flier, W. M., Barkhof, F., Rozemuller, A. M., Scheltens, P., & Geurts, J. J. (2011). Heterogeneity of small vessel disease: a systematic review of MRI and histopathology correlations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *82*(2), 126-135. https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.204685

Goyal, V. K. (1982). Lipofuscin pigment accumulation in human brain during aging. *Experimental Gerontology*, *17*(6), 481-487. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0531-5565(82)80010-7

Goyri-O'Neill, J., Pais, D., Freire de Andrade, F., Ribeiro, P., Belo, A., O'Neill, A., Ramos, S., & Neves Marques, C. (2013). Improvement of the embalming perfusion method: the innovation and the results by light and scanning electron microscopy. *Acta Med Port*, *26*(3), 188-194.

Grachev, I. D., Berdichevsky, D., Rauch, S. L., Heckers, S., Kennedy, D. N., Caviness, V. S., & Alpert, N. M. (1999). A method for assessing the accuracy of intersubject registration of the human brain using anatomic landmarks. *Neuroimage*, *9*(2), 250-268. https://doi.org/10.1006/nimg.1998.0397

Greer, J. M., & Lees, M. B. (2002). Myelin proteolipid protein--the first 50 years. *Int J Biochem Cell Biol*, *34*(3), 211-215. https://doi.org/10.1016/s1357-2725(01)00136-4

Greer, J. M., & Pender, M. P. (2008). Myelin proteolipid protein: An effective autoantigen and target of autoimmunity in multiple sclerosis. *Journal of Autoimmunity*, *31*(3), 281-287. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.04.018

Greer, J. M., Trifilieff, E., & Pender, M. P. (2020). Correlation Between Anti-Myelin Proteolipid Protein (PLP) Antibodies and Disease Severity in Multiple Sclerosis Patients With PLP Response-Permissive HLA Types. *Front Immunol*, *11*, 1891. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01891

Grinberg, L. T., Amaro, E., Jr., Teipel, S., dos Santos, D. D., Pasqualucci, C. A., Leite, R. E., Camargo, C. R., Gonçalves, J. A., Sanches, A. G., Santana, M., Ferretti, R. E., Jacob-Filho, W., Nitrini, R., & Heinsen, H. (2008). Assessment of factors that confound MRI and neuropathological correlation of human postmortem brain tissue. *Cell Tissue Bank*, *9*(3), 195-203. https://doi.org/10.1007/s10561-008-9080-5

Grinberg, L. T., Amaro Junior, E., da Silva, A. V., da Silva, R. E., Sato, J. R., dos Santos, D. D., de Paula Pacheco, S., de Lucena Ferretti, R. E., Paraizo Leite, R. E., Pasqualucci, C. A., Teipel, S. J., Flatz, W. H., & Heinsen, H. (2009). Improved detection of incipient vascular changes by a biotechnological platform combining post mortem MRI in situ with neuropathology. *J Neurol Sci*, *283*(1-2), 2-8. https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.02.327

Guilfoyle, D. N., Helpern, J. A., & Lim, K. O. (2003). Diffusion tensor imaging in fixed brain tissue at 7.0 T. *NMR Biomed*, *16*(2), 77-81. https://doi.org/10.1002/nbm.814

Guindi, M. (2018). 11 - Liver Disease in Iron Overload. In R. Saxena (Ed.), *Practical Hepatic Pathology: a Diagnostic Approach (Second Edition)* (pp. 151-165). Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42873-6.00011-1

Gulati, R., Ahuja, M. S., Langer, V., Gopal, P., Rustagi, S. M., & Dave, V. (2020). Comparative study of formalin solution and saturated salt solution for embalming cadavers for surgical skills training. *Indian J Anat.*, *1*, 33-37.

Haacke, E. M., Mittal, S., Wu, Z., Neelavalli, J., & Cheng, Y. C. (2009). Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 1. *AJNR Am J Neuroradiol*, *30*(1), 19-30. https://doi.org/10.3174/ajnr.A1400

Hade, A. C., Philips, M. A., Promet, L., Jagomäe, T., Hanumantharaju, A., Salumäe, L., Reimann, E., Plaas, M., Vasar, E., & Väli, M. (2024). A cost-effective and efficient ex vivo, ex situ human whole brain perfusion protocol for immunohistochemistry. *J Neurosci Methods*, *404*, 110059. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2024.110059

Haller, S., Haacke, E. M., Thurnher, M. M., & Barkhof, F. (2021). Susceptibility-weighted Imaging: Technical Essentials and Clinical Neurologic Applications. *Radiology*, *299*(1), 3-26. https://doi.org/10.1148/radiol.2021203071

Hametner, S., Endmayr, V., Deistung, A., Palmrich, P., Prihoda, M., Haimburger, E., Menard, C., Feng, X., Haider, T., Leisser, M., Köck, U., Kaider, A., Höftberger, R., Robinson, S., Reichenbach, J. R., Lassmann, H., Traxler, H., Trattnig, S., & Grabner, G. (2018). The influence of brain iron and myelin on magnetic susceptibility and effective transverse relaxation - A biochemical and histological validation study. *Neuroimage*, *179*, 117-133. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.06.007

Hammer, N., Löffler, S., Feja, C., Bechmann, I., & Steinke, H. (2011). Substitution of formaldehyde in cross anatomy is possible. *J Natl Cancer Inst*, *103*(7), 610-611. https://doi.org/10.1093/jnci/djr035

Hammer, N., Löffler, S., Feja, C., Sandrock, M., Schmidt, W., Bechmann, I., & Steinke, H. (2012). Ethanol-glycerin fixation with thymol conservation: a potential alternative to formaldehyde and phenol embalming. *Anat Sci Educ*, *5*(4), 225-233. https://doi.org/10.1002/ase.1270

Han, D., Gao, Y., Wu, G., Yap, P.-T., & Shen, D. (2015). Robust anatomical landmark detection with application to MR brain image registration. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, *46*, 277-290. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2015.09.002

Harada, T., Kudo, K., Fujima, N., Yoshikawa, M., Ikebe, Y., Sato, R., Shirai, T., Bito, Y., Uwano, I., & Miyata, M. (2022). Quantitative Susceptibility Mapping: Basic Methods and Clinical Applications. *Radiographics*, *42*(4), 1161-1176. https://doi.org/10.1148/rg.210054

Harteveld, A. A., Denswil, N. P., Van Hecke, W., Kuijf, H. J., Vink, A., Spliet, W. G. M., Daemen, M. J., Luijten, P. R., Zwanenburg, J. J. M., Hendrikse, J., & van der Kolk, A. G. (2018). Ex vivo vessel wall thickness measurements of the human circle of Willis using 7T MRI. *Atherosclerosis*, *273*, 106-114. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.023

Hayashi, S., Homma, H., Naito, M., Oda, J., Nishiyama, T., Kawamoto, A., Kawata, S., Sato, N., Fukuhara, T., Taguchi, H., Mashiko, K., Azuhata, T., Ito, M., Kawai, K., Suzuki, T., Nishizawa, Y., Araki, J., Matsuno, N., Shirai, T., . . . Itoh, M. (2014). Saturated Salt Solution

Method: A Useful Cadaver Embalming for Surgical Skills Training. *Medicine*, *93*(27), e196. https://doi.org/10.1097/md.0000000000000196

Hayashi, S., Naito, M., Kawata, S., Qu, N., Hatayama, N., Hirai, S., & Itoh, M. (2016). History and future of human cadaver preservation for surgical training: from formalin to saturated salt solution method. *Anat Sci Int*, *91*(1), 1-7. https://doi.org/10.1007/s12565-015-0299-5

Hayat, M. A. (1981). *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications*. Edward Arnold. https://books.google.ca/books?id=66SyxwEACAAJ

Hayes, K., Buist, R., Vincent, T. J., Thiessen, J. D., Zhang, Y., Zhang, H., Wang, J., Summers, A. R., Kong, J., Li, X.-M., & Martin, M. (2014). Comparison of manual and semi-automated segmentation methods to evaluate hippocampus volume in APP and PS1 transgenic mice obtained via in vivo magnetic resonance imaging. *J Neurosci Methods*, *221*, 103-111. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.09.014

Heim, B., Krismer, F., De Marzi, R., & Seppi, K. (2017). Magnetic resonance imaging for the diagnosis of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, *124*(8), 915-964. https://doi.org/10.1007/s00702-017-1717-8

Helander, K. G. (1994). Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem*, *69*(3), 177-179. https://doi.org/10.3109/10520299409106282

Henney, J., Taylor, C., & Boon, C. (2010). Preservation and physical property roles of sodium in foods. In N. A. Press (Ed.), *Strategies to reduce sodium intake in the united states*.

Hennig, J., Nauerth, A., & Friedburg, H. (1986). RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. *Magn Reson Med*, *3*(6), 823-833. https://doi.org/10.1002/mrm.1910030602

Hobro, A. J., & Smith, N. I. (2017). An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vibrational Spectroscopy*, *91*, 31-45. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.10.012

Hodge, R. D., Bakken, T. E., Miller, J. A., Smith, K. A., Barkan, E. R., Graybuck, L. T., Close, J. L., Long, B., Johansen, N., Penn, O., Yao, Z., Eggermont, J., Höllt, T., Levi, B. P., Shehata, S. I., Aevermann, B., Beller, A., Bertagnolli, D., Brouner, K., . . . Lein, E. S. (2019). Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*, *573*(7772), 61-68. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1506-7

Hoffman, E. A., Frey, B. L., Smith, L. M., & Auble, D. T. (2015). Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. *J Biol Chem*, *290*(44), 26404-26411. https://doi.org/10.1074/jbc.R115.651679

Hoffmann, A., Bredno, J., Wendland, M. F., Derugin, N., Hom, J., Schuster, T., Su, H., Ohara, P. T., Young, W. L., & Wintermark, M. (2011). Validation of in vivo magnetic resonance imaging blood-brain barrier permeability measurements by comparison with gold standard histology. *Stroke*, *42*(7), 2054-2060. https://doi.org/10.1161/strokeaha.110.597997

Hofman, M. A. (1985). Size and shape of the cerebral cortex in mammals. I. The cortical surface. *Brain Behav Evol*, *27*(1), 28-40. https://doi.org/10.1159/000118718

Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*, *32*, 121-130. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004

Holden, D. N., Yung, F. H., & Entezami, P. (2021). Hypertonic saline buffered with sodium acetate for intracranial pressure management. *Clin Neurol Neurosurg*, *201*, 106435. https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.106435

Homma, H., Oda, J., Sano, H., Kawai, K., Koizumi, N., Uramoto, H., Sato, N., Mashiko, K., Yasumatsu, H., Ito, M., Fukuhara, T., Watanabe, Y., Kim, S., Hayashi, S., Kawata, S., Miyawaki, M., Miyaso, H., & Itoh, M. (2019). Advanced cadaver-based educational seminar for trauma surgery using saturated salt solution-embalmed cadavers. *Acute Med Surg*, *6*(2), 123-130. https://doi.org/10.1002/ams2.390

Hopperton, K. E., Mohammad, D., Trépanier, M. O., Giuliano, V., & Bazinet, R. P. (2018). Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Molecular Psychiatry*, *23*(2), 177-198. https://doi.org/10.1038/mp.2017.246

Hopwood, D., Slidders, W., & Yeaman, G. R. (1989). Tissue fixation with phenol-formaldehyde for routine histopathology. *Histochem J*, *21*(4), 228-234. https://doi.org/10.1007/bf01747525

Horobin, R. W. (1982). *Histochemistry: An Explanatory Outline of Histochemistry and Biophysical Staining*. G. Fischer. https://books.google.ca/books?id=7zwVAQAAIAAJ

Huang, S. N. (1975). Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections [Article]. *Laboratory Investigation*, *33*(1), 88-95. https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0016722946&partnerID=40&md5=a08fc222e803beb706dbe7e231ab1226

Hubbell, D. S., Dwornik, J. J., Alway, S. E., Eliason, R., & Norenberg, R. E. (2002). Teaching gross anatomy using living tissue. *Clin Anat*, *15*(2), 157-159. https://doi.org/10.1002/ca.1113

Hulette, C. M. (2003). Brain banking in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol*, *62*(7), 715-722. https://doi.org/10.1093/jnen/62.7.715

Hulshof, L. A., van Nuijs, D., Hol, E. M., & Middeldorp, J. (2022). The Role of Astrocytes in Synapse Loss in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Front Cell Neurosci*, *16*, 899251. https://doi.org/10.3389/fncel.2022.899251

Humason, G. L. (1967). *Animal Tissue Techniques* (D. Kennedy & R. B. Park, Eds. 3rd ed., Vol. 0-7167-0692-X).

Humphreys, C. A., Jansen, M. A., Muñoz Maniega, S., González-Castro, V., Pernet, C., Deary, I. J., Al-Shahi Salman, R., Wardlaw, J. M., & Smith, C. (2019). A protocol for precise comparisons of small vessel disease lesions between ex vivo magnetic resonance imaging and histopathology. *Int J Stroke*, *14*(3), 310-320. https://doi.org/10.1177/1747493018799962

Hussaini, H. M., Seo, B., & Rich, A. M. (2023). Immunohistochemistry and Immunofluorescence. *Methods Mol Biol*, *2588*, 439-450. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2780-8_26

Huszar, I. N., Pallebage-Gamarallage, M., Bangerter-Christensen, S., Brooks, H., Fitzgibbon, S., Foxley, S., Hiemstra, M., Howard, A. F. D., Jbabdi, S., Kor, D. Z. L., Leonte, A., Mollink, J., Smart, A., Tendler, B. C., Turner, M. R., Ansorge, O., Miller, K. L., & Jenkinson, M. (2023). Tensor image registration library: Deformable registration of stand-alone histology images to whole-brain post-mortem MRI data. *Neuroimage*, *265*, 119792. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119792

Hwang, W., McPartland, T., Jeong, S., & Evans, C. L. (2025). A robust method for autofluorescence-free immunofluorescence using high-speed fluorescence lifetime imaging microscopy. *Scientific Reports*, *15*(1), 5503. https://doi.org/10.1038/s41598-025-89142-6

Hyodoh, H., Sato, T., Onodera, M., Washio, H., Hasegawa, T., & Hatakenaka, M. (2012). Vascular measurement changes observed using postmortem computed tomography. *Jpn J Radiol*, *30*(10), 840-845. https://doi.org/10.1007/s11604-012-0134-z

Iglesias, J. E., Crampsie, S., Strand, C., Tachrount, M., Thomas, D. L., & Holton, J. L. (2018). Effect of Fluorinert on the Histological Properties of Formalin-Fixed Human Brain Tissue. *J Neuropathol Exp Neurol*, *77*(12), 1085-1090. https://doi.org/10.1093/jnen/nly098

Ikeda, M. (1988). Multiple exposure to chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol*, *8*(4), 414-421. https://doi.org/10.1016/0273-2300(88)90040-2

Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*, *1897*, 299-311. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26

Imai, Y., Ibata, I., Ito, D., Ohsawa, K., & Kohsaka, S. (1996). A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*, *224*(3), 855-862. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1112

Insausti, R., Insausti, A. M., Muñoz López, M., Medina Lorenzo, I., Arroyo-Jiménez, M. d. M., Marcos Rabal, M. P., de la Rosa-Prieto, C., Delgado-González, J. C., Montón Etxeberria, J., Cebada-Sánchez, S., Raspeño-García, J. F., Iñiguez de Onzoño, M. M., Molina Romero, F. J., Benavides-Piccione, R., Tapia-González, S., Wisse, L. E. M., Ravikumar, S., Wolk, D. A., DeFelipe, J., . . . Artacho-Pérula, E. (2023). Ex vivo, in situ perfusion protocol for human brain fixation compatible with microscopy, MRI techniques, and anatomical studies [Methods]. *Frontiers in neuroanatomy*, *17*. https://doi.org/10.3389/fnana.2023.1149674

Insausti, R., Tuñón, T., Sobreviela, T., Insausti, A. M., & Gonzalo, L. M. (1995). The human entorhinal cortex: a cytoarchitectonic analysis. *J Comp Neurol*, *355*(2), 171-198. https://doi.org/10.1002/cne.903550203

Istomin, A. A. (1994). [The use of perfusion for brain fixation]. *Arkh Patol*, *56*(2), 78-79. (Opyt primeneniia metoda perfuzii dlia fiksatsii golovnogo mozga cheloveka.)

Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., & Fukuuchi, Y. (2001). Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke*, *32*(5), 1208-1215. https://doi.org/10.1161/01.str.32.5.1208

Jackowski, C., Thali, M., Aghayev, E., Yen, K., Sonnenschein, M., Zwygart, K., Dirnhofer, R., & Vock, P. (2006). Postmortem imaging of blood and its characteristics using MSCT and MRI. *Int J Legal Med*, *120*(4), 233-240. https://doi.org/10.1007/s00414-005-0023-4

Jackson, S. J., Andrews, N., Ball, D., Bellantuono, I., Gray, J., Hachoumi, L., Holmes, A., Latcham, J., Petrie, A., Potter, P., Rice, A., Ritchie, A., Stewart, M., Strepka, C., Yeoman, M., & Chapman, K. (2017). Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. *Lab Anim*, *51*(2), 160-169. https://doi.org/10.1177/0023677216653984

Jacobs, M. A., Windham, J. P., Soltanian-Zadeh, H., Peck, D. J., & Knight, R. A. (1999). Registration and warping of magnetic resonance images to histological sections. *Med Phys*, *26*(8), 1568-1578. https://doi.org/10.1118/1.598671

Jaiswal, S. (2016). Role of immunohistochemistry in the diagnosis of central nervous system tumors. *Neurology India*, *64*(3). https://journals.lww.com/neur/fulltext/2016/64030/role_of_immunohistochemistry_in_the_diagnosis_of.24.aspx

Janczyk, P., Weigner, J., Luebke-Becker, A., Kaessmeyer, S., & Plendl, J. (2011). Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy--A study based on histo- and microbiological analyses. *Ann Anat*, *193*(1), 71-75. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2010.08.003

Jenkinson, M., & Smith, S. (2001). A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Medical Image Analysis*, *5*(2), 143-156. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1361-8415(01)00036-6

Jeon, S. B., & Kang, D. W. (2009). Cerebral air emboli on T2-weighted gradient-echo magnetic resonance imaging. *BMJ Case Rep*, *2009*, bcr2006102954. https://doi.org/10.1136/bcr.2006.102954

Jiao, Y., Sun, Z., Lee, T., Fusco, F. R., Kimble, T. D., Meade, C. A., Cuthbertson, S., & Reiner, A. (1999). A simple and sensitive antigen retrieval method for free-floating and slide-mounted tissue sections. *J Neurosci Methods*, *93*(2), 149-162. https://doi.org/10.1016/s0165-0270(99)00142-9

Jones, D. G. (1997). Anatomy departments and anatomy education: reflections and myths. *Clin Anat*, *10*(1), 34-40. https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2353(1997)10:1<34::Aid-ca6>3.0.Co;2-t

Jonkman, L. E., Kenkhuis, B., Geurts, J. J. G., & van de Berg, W. D. J. (2019). Post-Mortem MRI and Histopathology in Neurologic Disease: A Translational Approach. *Neurosci Bull*, *35*(2), 229-243. https://doi.org/10.1007/s12264-019-00342-3

Jonkman, L. E., Soriano, A. L., Amor, S., Barkhof, F., van der Valk, P., Vrenken, H., & Geurts, J. J. (2015). Can MS lesion stages be distinguished with MRI? A postmortem MRI and histopathology study. *J Neurol*, *262*(4), 1074-1080. https://doi.org/10.1007/s00415-015-7689-4

Joshi, A., Spalletta, G., Piras, F., & Gili, T. (2018). Registration. In *Brain Morphometry* (Vol. 136).

Jung, W., Jeong, G., Kim, S., Hwang, I., Choi, S. H., Jeon, Y. H., Choi, K. S., Lee, J. Y., Yoo, R. E., Yun, T. J., & Kang, K. M. (2025). Reliability of brain volume measures of accelerated 3D T1-weighted images with deep learning-based reconstruction. *Neuroradiology*, *67*(1), 171-182. https://doi.org/10.1007/s00234-024-03461-5

Kádár, A., Wittmann, G., Liposits, Z., & Fekete, C. (2009). Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *J Neurosci Methods*, *184*(1), 115-118. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.07.010

Kajimura, J., Ito, R., Manley, N. R., & Hale, L. P. (2016). Optimization of Single- and Dual-Color Immunofluorescence Protocols for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *64*(2), 112-124. https://doi.org/10.1369/0022155415610792

Kakite, S., Fujii, S., Kurosaki, M., Kanasaki, Y., Matsusue, E., Kaminou, T., & Ogawa, T. (2011). Three-dimensional gradient echo versus spin echo sequence in contrast-enhanced imaging of the pituitary gland at 3T. *European Journal of Radiology*, *79*(1), 108-112. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2009.12.036

Kaliappan, A., Motwani, R., Gupta, T., & Chandrupatla, M. (2023). Innovative Cadaver Preservation Techniques: a Systematic Review. *Maedica (Bucur)*, *18*(1), 127-135. https://doi.org/10.26574/maedica.2023.18.1.127

Kalimo, H., Garcia, J. H., Kamijyo, Y., Tanaka, J., Viloria, J. E., Valigorsky, J. M., Jones, R. T., Kim, K. M., Mergner, W. J., Pendergrass, R. E., & Trump, B. F. (1974). Cellular and subcellular alterations of human CNS: studies utilizing in situ perfusion fixation at immediate autopsy. *Arch Pathol*, *97*(6), 352-359.

Kamal, F., Morrison, C., Maranzano, J., Zeighami, Y., & Dadar, M. (2023). Topographical differences in white matter hyperintensity burden and cognition in aging, MCI, and AD. *Geroscience*, *45*(1), 1-16. https://doi.org/10.1007/s11357-022-00665-6

Kamphuis, W., Middeldorp, J., Kooijman, L., Sluijs, J. A., Kooi, E. J., Moeton, M., Freriks, M., Mizee, M. R., & Hol, E. M. (2014). Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *35*(3), 492-510. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.035

Kastler, B. (2011a). Chapitre 1 - Magnétisme nucléaire. In B. Kastler & D. Vetter (Eds.), *Comprendre L'IRM (Septième Édition)* (pp. 1-4). Elsevier Masson. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-2-294-71044-5.00001-4

Kastler, B. (2011b). Chapitre 2 - Le phénomène de résonance magnétique. In B. Kastler & D. Vetter (Eds.), *Comprendre L'IRM (Septième Édition)* (pp. 5-17). Elsevier Masson. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-2-294-71044-5.00002-6

Kastler, B. (2011c). Chapitre 4 - La séquence de base: séquence d'écho de spin. In B. Kastler & D. Vetter (Eds.), *Comprendre L'IRM (Septième Édition)* (pp. 29-36). Elsevier Masson. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-2-294-71044-5.00004-X

Kastler, B., & Vetter, D. (2011). Chapitre 6 - Codage spatial du signal et mise en place des événements d'une séquence IRM. In B. Kastler & D. Vetter (Eds.), *Comprendre L'IRM (Septième Édition)* (pp. 67-92). Elsevier Masson. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-2-294-71044-5.00007-5

Kastler, B., Vetter, D., Patay, Z., & Germain, P. (2011). Chapitre 5 - Contraste en T1, T2 et densité protonique. In B. Kastler & D. Vetter (Eds.), *Comprendre L'IRM (Septième Édition)* (pp. 37-66). Elsevier Masson. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-2-294-71044-5.00005-1

Kastler, B., Vetter, D., Pousse, A., Choquet, P., & Parmentier, M. (2011). Chapitre 7 - Plan de Fourier et reconstruction de l'image. In B. Kastler & D. Vetter (Eds.), *Comprendre L'IRM (Septième Édition)* (pp. 93-114). Elsevier Masson. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-2-294-71044-5.00008-7

Kenkhuis, B., Somarakis, A., Kleindouwel, L. R. T., van Roon-Mom, W. M. C., Höllt, T., & van der Weerd, L. (2022). Co-expression patterns of microglia markers Iba1, TMEM119 and P2RY12 in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *167*, 105684. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105684

Kennel, L., Martin, D. M. A., Shaw, H., & Wilkinson, T. (2018). Learning anatomy through Thiel- vs. formalin-embalmed cadavers: Student perceptions of embalming methods and effect on functional anatomy knowledge. *Anat Sci Educ*, *11*(2), 166-174. https://doi.org/10.1002/ase.1715

Kerchner, G. A., Deutsch, G. K., Zeineh, M., Dougherty, R. F., Saranathan, M., & Rutt, B. K. (2012). Hippocampal CA1 apical neuropil atrophy and memory performance in Alzheimer's disease. *Neuroimage*, *63*(1), 194-202. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.06.048

Khandelwal, P., Duong, M. T., Sadaghiani, S., Lim, S., Denning, A. E., Chung, E., Ravikumar, S., Arezoumandan, S., Peterson, C., Bedard, M., Capp, N., Ittyerah, R., Migdal, E., Choi, G., Kopp, E., Loja, B., Hasan, E., Li, J., Bahena, A., . . . Yushkevich, P. A. (2024). Automated deep learning segmentation of high-resolution 7 Tesla postmortem MRI for quantitative analysis of structure-pathology correlations in neurodegenerative diseases. *Imaging Neurosci (Camb)*, *2*, 1-30. https://doi.org/10.1162/imag_a_00171

Kiernan, J. (1990). *Histological and histochemical methods: theory and practice* (2nd ed.). Pergamon Press.

Kiernan, J. A. (2000). Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do. *Microscopy Today*, *8*(1), 8-13. https://doi.org/10.1017/S1551929500057060

Kim, K. K., Adelstein, R. S., & Kawamoto, S. (2009). Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem*, *284*(45), 31052-31061. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052969

Kim, K. Y., Shin, K. Y., & Chang, K. A. (2023). GFAP as a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cells*, *12*(9). https://doi.org/10.3390/cells12091309

Kim, N.-S., & Chung, W.-S. (2023). Astrocytes regulate neuronal network activity by mediating synapse remodeling. *Neuroscience Research*, *187*, 3-13. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neures.2022.09.007

Kingsley, P. B. (2006). Introduction to diffusion tensor imaging mathematics: Part I. Tensors, rotations, and eigenvectors. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, *28A*(2), 101-122. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cmr.a.20048

Kirik, O. V., Sukhorukova, E. G., Vlasov, T. D., & Korzhevskiĭ, D. E. (2009). [Selective death of the striatum neurons in rats after the transient occlusion of the middle cerebral artery]. *Morfologiia*, *135*(2), 80-82.

Kloska, S. P., Wintermark, M., Engelhorn, T., & Fiebach, J. B. (2010). Acute stroke magnetic resonance imaging: current status and future perspective. *Neuroradiology*, *52*(3), 189-201. https://doi.org/10.1007/s00234-009-0637-1

Knapp, P. E. (1996). Proteolipid protein: is it more than just a structural component of myelin? *Dev Neurosci*, *18*(4), 297-308. https://doi.org/10.1159/000111420

Koeppen, A. H. (1995). The history of iron in the brain. *Journal of the Neurological Sciences*, *134*, 1-9. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-510X(95)00202-D

Koizumi, T., Kerkhofs, D., Mizuno, T., Steinbusch, H. W. M., & Foulquier, S. (2019). Vessel-Associated Immune Cells in Cerebrovascular Diseases: From Perivascular Macrophages to Vessel-Associated Microglia. *Front Neurosci*, *13*, 1291. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01291

Koji, T. (2025). Reflections on the Principles of Fixation in Histochemistry and Cytochemistry: With a Special Focus on Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. *Acta Histochem Cytochem*, *58*(2), 31-43. https://doi.org/10.1267/ahc.25-00006

Kojima, M., Makino, Y., Yamaguchi, R., Motomura, A., Yajima, D., Inokuchi, G., Saito, N., Torimitsu, S., Hoshioka, Y., Urabe, S., Yoshida, M., Iwase, H., & Miyati, T. (2024). Gray–white matter contrast reversal on T1-weighted spin-echo in postmortem brain. *Forensic Science International*, *360*, 112031. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112031

Korzhevskii, D. E., Kirik, O. V., Baisa, A. E., & Vlasov, T. D. (2009). Simulation of unilateral ischemic injury to the striatal neurons inflicted by short-term occlusion of the middle cerebral artery. *Bull Exp Biol Med*, *147*(2), 255-256. https://doi.org/10.1007/s10517-009-0487-1

Kotrotsou, A., Bennett, D. A., Schneider, J. A., Dawe, R. J., Golak, T., Leurgans, S. E., Yu, L., & Arfanakis, K. (2014). Ex vivo MR volumetry of human brain hemispheres. *Magn Reson Med*, *71*(1), 364-374. https://doi.org/10.1002/mrm.24661

Kovacs, G. G., & Budka, H. (2010). Current concepts of neuropathological diagnostics in practice: neurodegenerative diseases. *Clin Neuropathol*, *29*(5), 271-288. https://doi.org/10.5414/npp29271

Krassner, M. M., Kauffman, J., Sowa, A., Cialowicz, K., Walsh, S., Farrell, K., Crary, J. F., & McKenzie, A. T. (2023). Postmortem changes in brain cell structure: a review. *Free Neuropathol*, *4*, 10. https://doi.org/10.17879/freeneuropathology-2023-4790

Krenacs, L., Krenacs, T., Stelkovics, E., & Raffeld, M. (2010). Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Methods Mol Biol*, *588*, 103-119. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_14

Kretzschmar, H. (2009). Brain banking: opportunities, challenges and meaning for the future. *Nat Rev Neurosci*, *10*(1), 70-78. https://doi.org/10.1038/nrn2535

Kruer, M. C. (2013). The neuropathology of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Int Rev Neurobiol*, *110*, 165-194. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-410502-7.00009-0

Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Brück, W., & Lassmann, H. (2017). An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*, *133*(1), 13-24. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1653-y

Kurth, F., Luders, E., & Gaser, C. (2015). Voxel-Based Morphometry. In A. W. Toga (Ed.), *Brain Mapping* (pp. 345-349). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397025-1.00304-3

Kwan, B. Y. M., Salehi, F., Kope, R., Lee, D. H., Sharma, M., Hammond, R., Burneo, J. G., Steven, D., Peters, T., & Khan, A. R. (2017). Evaluation of ex-vivo 9.4T MRI in post-surgical specimens from temporal lobe epilepsy patients. *J Neuroradiol*, *44*(6), 377-380. https://doi.org/10.1016/j.neurad.2017.05.007

Lahna, D., Roese, N., Woltjer, R., Boespflug, E. L., Schwartz, D., Grinstead, J., Dodge, H. H., Wall, R., Kaye, J. A., Rooney, W. D., & Silbert, L. C. (2022). Postmortem 7T MRI for guided histopathology and evaluation of cerebrovascular disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, *82*(1), 57-70. https://doi.org/10.1093/jnen/nlac103

Lamberts, R., & Goldsmith, P. C. (1986). Fixation, fine structure, and immunostaining for neuropeptides: perfusion versus immersion of the neuroendocrine hypothalamus. *J Histochem Cytochem*, *34*(3), 389-398. https://doi.org/10.1177/34.3.2419392

Lassmann, H. (2018). Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *8*(3). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028936

Lassmann, H., Brück, W., & Lucchinetti, C. F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*, *17*(2), 210-218. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x

Laule, C., Kozlowski, P., Leung, E., Li, D. K., Mackay, A. L., & Moore, G. R. (2008). Myelin water imaging of multiple sclerosis at 7 T: correlations with histopathology. *Neuroimage*, *40*(4), 1575-1580. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.12.008

Laule, C., & Moore, G. R. W. (2018). Myelin water imaging to detect demyelination and remyelination and its validation in pathology. *Brain Pathol*, *28*(5), 750-764. https://doi.org/10.1111/bpa.12645

Lavenex, P., Lavenex, P. B., Bennett, J. L., & Amaral, D. G. (2009). Postmortem changes in the neuroanatomical characteristics of the primate brain: hippocampal formation. *J Comp Neurol*, *512*(1), 27-51. https://doi.org/10.1002/cne.21906

Lebenberg, J., Hérard, A. S., Dubois, A., Dauguet, J., Frouin, V., Dhenain, M., Hantraye, P., & Delzescaux, T. (2010). Validation of MRI-based 3D digital atlas registration with histological and autoradiographic volumes: an anatomofunctional transgenic mouse brain imaging study. *Neuroimage*, *51*(3), 1037-1046. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.03.014

Lee, S., Viqar, F., Zimmerman, M. E., Narkhede, A., Tosto, G., Benzinger, T. L., Marcus, D. S., Fagan, A. M., Goate, A., Fox, N. C., Cairns, N. J., Holtzman, D. M., Buckles, V., Ghetti, B., McDade, E., Martins, R. N., Saykin, A. J., Masters, C. L., Ringman, J. M., . . . Brickman, A. M. (2016). White matter hyperintensities are a core feature of Alzheimer's disease: Evidence from the dominantly inherited Alzheimer network. *Ann Neurol*, *79*(6), 929-939. https://doi.org/10.1002/ana.24647

LeVine, S. M. (1997). Iron deposits in multiple sclerosis and Alzheimer's disease brains. *Brain Res*, *760*(1-2), 298-303. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00470-8

Li, K., Rashid, T., Li, J., Honnorat, N., Nirmala, A. B., Fadaee, E., Wang, D., Charisis, S., Liu, H., Franklin, C., Maybrier, M., Katragadda, H., Abazid, L., Ganapathy, V., Valaparla, V. L., Badugu, P., Vasquez, E., Solano, L., Clarke, G., . . . Habes, M. (2023). Postmortem Brain Imaging in Alzheimer's Disease and Related Dementias: The South Texas Alzheimer's Disease Research Center Repository. *J Alzheimers Dis*, *96*(3), 1267-1283. https://doi.org/10.3233/jad-230389

Li, X., Yankeelov, T. E., Rosen, G. D., Gore, J. C., & Dawant, B. M. (2009). Enhancement of histological volumes through averaging and their use for the analysis of magnetic resonance images. *Magn Reson Imaging*, *27*(3), 401-416. https://doi.org/10.1016/j.mri.2008.07.016

Lillie, R. D. (1954). Histopathologic technic and practical histochemistry.

Lin, J., Wang, D., Lan, L., & Fan, Y. (2017). Multiple Factors Involved in the Pathogenesis of White Matter Lesions. *Biomed Res Int*, *2017*, 9372050. https://doi.org/10.1155/2017/9372050

Lindberg, M. R., & Lamps, L. W. (2018). Central Nervous System. In M. R. Lindberg & L. W. Lamps (Eds.), *Diagnostic Pathology: Normal Histology (Second Edition)* (pp. 108-111). Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54803-8.50029-2

Lombardero, M., Yllera, M. M., Costa, E. S. A., Oliveira, M. J., & Ferreira, P. G. (2017). Saturated salt solution: a further step to a formaldehyde-free embalming method for veterinary gross anatomy. *J Anat*, *231*(2), 309-317. https://doi.org/10.1111/joa.12634

Love, S., & Nicoll, J. A. (1992). Comparison of modified Bielschowsky silver impregnation and anti-ubiquitin immunostaining of cortical and nigral Lewy bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *18*(6), 585-592. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1992.tb00830.x

Lüders, K. A., Nessler, S., Kusch, K., Patzig, J., Jung, R. B., Möbius, W., Nave, K. A., & Werner, H. B. (2019). Maintenance of high proteolipid protein level in adult central nervous system myelin is required to preserve the integrity of myelin and axons. *Glia*, *67*(4), 634-649. https://doi.org/10.1002/glia.23549

Lyck, L., Dalmau, I., Chemnitz, J., Finsen, B., & Schrøder, H. D. (2008). Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *J Histochem Cytochem*, *56*(3), 201-221. https://doi.org/10.1369/jhc.7A7187.2007

Lycklama à Nijeholt, G., & Barkhof, F. (2003). Differences between subgroups of MS: MRI findings and correlation with histopathology. *J Neurol Sci*, *206*(2), 173-174. https://doi.org/10.1016/s0022-510x(02)00336-2

Lynn, J. D., Anand, C., Arshad, M., Homayouni, R., Rosenberg, D. R., Ofen, N., Raz, N., & Stanley, J. A. (2021). Microstructure of Human Corpus Callosum across the Lifespan: Regional Variations in Axon Caliber, Density, and Myelin Content. *Cereb Cortex*, *31*(2), 1032-1045. https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa272

Ma, W., Frigon, E.-M., Maranzano, J., Zeighami, Y., & Dadar, M. (2024). Differential effects of prolonged post-fixation on immunohistochemical and histochemical staining for postmortem human brains [Original Research]. *Front in Neuroanat*, *Volume 18 - 2024*. https://doi.org/10.3389/fnana.2024.1477973

Mafraji, M. A. (2023, 2023/10). *Imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)*. Le Manuel Merck. https://www.merckmanuals.com/fr-ca/professional/sujets-spéciaux/principes-d-imagerie-radiologique/imagerie-par-résonance-magnétique-nucléaire-irm

Magnain, C., Augustinack, J. C., Reuter, M., Wachinger, C., Frosch, M. P., Ragan, T., Akkin, T., Wedeen, V. J., Boas, D. A., & Fischl, B. (2014). Blockface histology with optical coherence tomography: a comparison with Nissl staining. *Neuroimage*, *84*, 524-533. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.072

Mai, J. K., Majtanik, M., & Paxinos, G. (2015). *Atlas of the Human Brain*. Academic Press. https://books.google.ca/books?id=4S01CgAAQBAJ

Maintz, J. B., & Viergever, M. A. (1998). A survey of medical image registration. *Med Image Anal*, *2*(1), 1-36. https://doi.org/10.1016/s1361-8415(01)80026-8

Malandain, G., Bardinet, É., Nelissen, K., & Vanduffel, W. (2004). Fusion of autoradiographs with an MR volume using 2-D and 3-D linear transformations. *Neuroimage*, *23*(1), 111-127. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.04.038

Manera, A. L., Dadar, M., Fonov, V., & Collins, D. L. (2020). CerebrA, registration and manual label correction of Mindboggle-101 atlas for MNI-ICBM152 template. *Sci Data*, *7*(1), 237. https://doi.org/10.1038/s41597-020-0557-9

Maranzano, J., Dadar, M., Bertrand-Grenier, A., Frigon, E. M., Pellerin, J., Plante, S., Duchesne, S., Tardif, C. L., Boire, D., & Bronchti, G. (2020). A novel ex vivo, in situ method to study the human brain through MRI and histology. *J Neurosci Methods*, *345*, 108903. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108903

Maranzano, J., Dadar, M., Rudko, D. A., De Nigris, D., Elliott, C., Gati, J. S., Morrow, S. A., Menon, R. S., Collins, D. L., Arnold, D. L., & Narayanan, S. (2019). Comparison of Multiple

Sclerosis Cortical Lesion Types Detected by Multicontrast 3T and 7T MRI. *AJNR Am J Neuroradiol*, *40*(7), 1162-1169. https://doi.org/10.3174/ajnr.A6099

Maranzano, J., Rudko, D. A., Arnold, D. L., & Narayanan, S. (2016). Manual Segmentation of MS Cortical Lesions Using MRI: A Comparison of 3 MRI Reading Protocols. *AJNR Am J Neuroradiol*, *37*(9), 1623-1628. https://doi.org/10.3174/ajnr.A4799

Markl, M., & Leupold, J. (2012). Gradient echo imaging. *J Magn Reson Imaging*, *35*(6), 1274-1289. https://doi.org/10.1002/jmri.23638

Martins-Costa, C., Nunes, T. C., & Anjos-Ramos, L. D. (2022). Anatomo-comparative study of formaldehyde, alcohol, and saturated salt solution as fixatives in Wistar rat brains. *Anat Histol Embryol*, *51*(6), 740-745. https://doi.org/10.1111/ahe.12852

Matsuda, H. (2013). Voxel-based Morphometry of Brain MRI in Normal Aging and Alzheimer's Disease. *Aging Dis*, *4*(1), 29-37.

Maurer, C. R., Jr., Fitzpatrick, J. M., Wang, M. Y., Galloway, R. L., Jr., Maciunas, R. J., & Allen, G. S. (1997). Registration of head volume images using implantable fiducial markers. *IEEE Trans Med Imaging*, *16*(4), 447-462. https://doi.org/10.1109/42.611354

Mauriello, S., Treglia, M., Pallocci, M., Bonfiglio, R., Giacobbi, E., Passalacqua, P., Cammarano, A., D'Ovidio, C., Marsella, L. T., & Scimeca, M. (2022). Antigenicity Preservation Is Related to Tissue Characteristics and the Post-Mortem Interval: Immunohistochemical Study and Literature Review. *Healthcare (Basel)*, *10*(8). https://doi.org/10.3390/healthcare10081495

Maurya, S. K., & Mishra, R. (2018). Co-Localization and Interaction of Pax5 with Iba1 in Brain of Mice. *Cell Mol Neurobiol*, *38*(4), 919-927. https://doi.org/10.1007/s10571-017-0566-1

Mayer, R. (2011). *Embalming: History, Theory, and Practice* (McGraw-Hill, Ed. 5th ed.). McGraw-Hill.

Mazoyer, B. (2008). In memoriam: Jean Talairach (1911-2007): a life in stereotaxy. *Hum Brain Mapp*, *29*(2), 250-252. https://doi.org/10.1002/hbm.20473

McFadden, W. C., Walsh, H., Richter, F., Soudant, C., Bryce, C. H., Hof, P. R., Fowkes, M., Crary, J. F., & McKenzie, A. T. (2019). Perfusion fixation in brain banking: a systematic review. *Acta Neuropathol Commun*, *7*(1), 146. https://doi.org/10.1186/s40478-019-0799-y

McGrath, H., Li, P., Dorent, R., Bradford, R., Saeed, S., Bisdas, S., Ourselin, S., Shapey, J., & Vercauteren, T. (2020). Manual segmentation versus semi-automated segmentation for quantifying vestibular schwannoma volume on MRI. *Int J Comput Assist Radiol Surg*, *15*(9), 1445-1455. https://doi.org/10.1007/s11548-020-02222-y

McKenzie, A. T., Nnadi, O., Slagell, K. D., Thorn, E. L., Farrell, K., & Crary, J. F. (2024). Fluid preservation in brain banking: a review. *Free Neuropathol*, *5*, 10. https://doi.org/10.17879/freeneuropathology-2024-5373

McKenzie, C., Bucks, R. S., Weinborn, M., Bourgeat, P., Salvado, O., & Gavett, B. E. (2022). Tau and amyloid biomarkers modify the degree to which cognitive reserve and brain reserve predict cognitive decline. *J Int Neuropsychol Soc*, 1-10. https://doi.org/10.1017/s1355617722000546

Mebratie, D. Y., & Dagnaw, G. G. (2024). Review of immunohistochemistry techniques: Applications, current status, and future perspectives. *Semin Diagn Pathol*, *41*(3), 154-160. https://doi.org/10.1053/j.semdp.2024.05.001

Mederos, S., González-Arias, C., & Perea, G. (2018). Astrocyte-Neuron Networks: A Multilane Highway of Signaling for Homeostatic Brain Function. *Front Synaptic Neurosci*, *10*, 45. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00045

Mega, M. S., Chen, S. S., Thompson, P. M., Woods, R. P., Karaca, T. J., Tiwari, A., Vinters, H. V., Small, G. W., & Toga, A. W. (1997). Mapping histology to metabolism: coregistration of stained whole-brain sections to premortem PET in Alzheimer's disease. *Neuroimage*, *5*(2), 147-153. https://doi.org/10.1006/nimg.1996.0255

Merkulyeva, N., & Mikhalkin, A. (2021). SMI-32 labeling in Cajal-Retzius cells of feline primary visual cortex. *Neurosci Lett*, *762*, 136165. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136165

Meyer, C. R., Moffat, B. A., Kuszpit, K. K., Bland, P. L., McKeever, P. E., Johnson, T. D., Chenevert, T. L., Rehemtulla, A., & Ross, B. D. (2006). A methodology for registration of a histological slide and in vivo MRI volume based on optimizing mutual information. *Mol Imaging*, *5*(1), 16-23.

Michalovicz, L. T., Kelly, K. A., Vashishtha, S., Ben-Hamo, R., Efroni, S., Miller, J. V., Locker, A. R., Sullivan, K., Broderick, G., Miller, D. B., & O'Callaghan, J. P. (2019). Astrocyte-specific transcriptome analysis using the ALDH1L1 bacTRAP mouse reveals novel biomarkers of astrogliosis in response to neurotoxicity. *J Neurochem*, *150*(4), 420-440. https://doi.org/10.1111/jnc.14800

Miko, M., & Varga, I. (2015). Chapter 6 - Histologic Examination of Peripheral Nerves. In R. S. Tubbs, E. Rizk, M. M. Shoja, M. Loukas, N. Barbaro, & R. J. Spinner (Eds.), *Nerves and Nerve Injuries* (pp. 79-89). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410390-0.00006-8

Miller, K. L., Stagg, C. J., Douaud, G., Jbabdi, S., Smith, S. M., Behrens, T. E. J., Jenkinson, M., Chance, S. A., Esiri, M. M., Voets, N. L., Jenkinson, N., Aziz, T. Z., Turner, M. R., Johansen-Berg, H., & McNab, J. A. (2011). Diffusion imaging of whole, post-mortem human brains on a clinical MRI scanner. *Neuroimage*, *57*(1), 167-181. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.03.070

Milles, J., Zhu, Y. M., Gimenez, G., Guttmann, C. R., & Magnin, I. E. (2007). MRI intensity nonuniformity correction using simultaneously spatial and gray-level histogram information. *Comput Med Imaging Graph*, *31*(2), 81-90. https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2006.11.001

Minati, L., & Węglarz, W. P. (2007). Physical foundations, models, and methods of diffusion magnetic resonance imaging of the brain: A review. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, *30A*(5), 278-307. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cmr.a.20094

Minett, T., Classey, J., Matthews, F. E., Fahrenhold, M., Taga, M., Brayne, C., Ince, P. G., Nicoll, J. A., & Boche, D. (2016). Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation*, *13*(1), 135. https://doi.org/10.1186/s12974-016-0601-z

Miyake, S., Suenaga, J., Miyazaki, R., Sasame, J., Akimoto, T., Tanaka, T., Ohtake, M., Takase, H., Tateishi, K., Shimizu, N., Murata, H., Funakoshi, K., & Yamamoto, T. (2020). Thiel's embalming method with additional intra-cerebral ventricular formalin injection (TEIF) for cadaver training of head and brain surgery. *Anat Sci Int*, *95*(4), 564-570. https://doi.org/10.1007/s12565-020-00545-z

Mizee, M. R., Miedema, S. S., van der Poel, M., Adelia, Schuurman, K. G., van Strien, M. E., Melief, J., Smolders, J., Hendrickx, D. A., Heutinck, K. M., Hamann, J., & Huitinga, I.

(2017). Isolation of primary microglia from the human post-mortem brain: effects of ante- and post-mortem variables. *Acta Neuropathol Commun*, *5*(1), 16. https://doi.org/10.1186/s40478-017-0418-8

Modersitzki, J., Heldmann, S., & Papenberg, N. (2015). Nonlinear registration via displacement fields. In *Acquisition Methods, Methods and Modeling* (pp. 307-314). Elsevier Inc.

Mohebimoushaei, S., Antipova, V., Biedermann, U., Brand-Saberi, B., Bräuer, L., Caspers, S., Doll, S., Engelhardt, M., Filler, T. J., Gericke, M., Gümüsalan, Y., Gundlach, S., Hayn-Leichsenring, G. U., Heermann, S., Hiepe, L., Hirt, B., Hirtler, L., Kulisch, C., Konschake, M., . . . Hammer, N. (2025). Cluster analyses of contemporary embalming protocols in central European anatomy institutions: A collaborative effort to minimize chemical exposure. *Ann Anat*, *260*, 152403. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2025.152403

Moll, N. M., Rietsch, A. M., Thomas, S., Ransohoff, A. J., Lee, J. C., Fox, R., Chang, A., Ransohoff, R. M., & Fisher, E. (2011). Multiple sclerosis normal-appearing white matter: pathology-imaging correlations. *Ann Neurol*, *70*(5), 764-773. https://doi.org/10.1002/ana.22521

Moon, J., Ahn, J. H., & Won, M. H. (2025). NeuN expression in health and disease: A histological perspective on neuronal heterogeneity. *Histol Histopathol*, 18965. https://doi.org/10.14670/hh-18-965

Moore, Z., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2019). The involvement of microglia in Alzheimer's disease: a new dog in the fight. *Br J Pharmacol*, *176*(18), 3533-3543. https://doi.org/10.1111/bph.14546

Morin, F., Crevier, C., Bouvier, G., Lacaille, J. C., & Beaulieu, C. (1997). A fixation procedure for ultrastructural investigation of synaptic connections in resected human cortex. *Brain Res Bull*, *44*(2), 205-210. https://doi.org/10.1016/s0361-9230(97)84254-2

Morrison, C., Dadar, M., Villeneuve, S., & Collins, D. L. (2022). White matter lesions may be an early marker for age-related cognitive decline. *Neuroimage Clin*, *35*, 103096. https://doi.org/10.1016/j.nicl.2022.103096

Mouritzen Dam, A. (1979). Shrinkage of the brain during histological procedures with fixation in formaldehyde solutions of different concentrations. *J Hirnforsch*, *20*(2), 115-119.

Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebratesxs. *Development*, *116*(1), 201-211. https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201

Murray, M. E., Vemuri, P., Preboske, G. M., Murphy, M. C., Schweitzer, K. J., Parisi, J. E., Jack, C. R., Jr., & Dickson, D. W. (2012). A quantitative postmortem MRI design sensitive to white matter hyperintensity differences and their relationship with underlying pathology. *J Neuropathol Exp Neurol*, *71*(12), 1113-1122. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318277387e

Musiał, A., Gryglewski, R. W., Kielczewski, S., Loukas, M., & Wajda, J. (2016). Formalin use in anatomical and histological science in the 19th and 20th centuries. *Folia Med Cracov*, *56*(3), 31-40.

Musumeci, G. (2015). The old and the new concepts of histochemistry. *Journal of Histology & Histopathology*, *2*. https://doi.org/10.7243/2055-091X-2-10

Nacul, L., O'Donovan, D. G., Lacerda, E. M., Gveric, D., Goldring, K., Hall, A., Bowman, E., & Pheby, D. (2014). Considerations in establishing a post-mortem brain and tissue bank for the study of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: a proposed protocol. *BMC Res Notes*, *7*, 370. https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-370

Nag, S., Chen, E. Y., Johnson, R., Tamhane, A., Arfanakis, K., & Schneider, J. A. (2021). Ex vivo MRI facilitates localization of cerebral microbleeds of different ages during neuropathology assessment. *Free Neuropathol*, *2*, 35. https://doi.org/10.17879/freeneuropathology-2021-3638

Nagara, H., Inoue, T., Koga, T., Kitaguchi, T., Tateishi, J., & Goto, I. (1987). Formalin fixed brains are useful for magnetic resonance imaging (MRI) study. *J Neurol Sci*, *81*(1), 67-77. https://doi.org/10.1016/0022-510x(87)90184-5

Nair, G., Sun, R., Merkle, H., Xu, Q., Hoskin, K., Bree, K., Dodd, S., & Koretsky, A. P. (2024). A method to image brain tissue frozen at autopsy. *Neuroimage*, *296*, 120680. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2024.120680

Nárai, Á., Hermann, P., Auer, T., Kemenczky, P., Szalma, J., Homolya, I., Somogyi, E., Vakli, P., Weiss, B., & Vidnyánszky, Z. (2022). Movement-related artefacts (MR-ART) dataset of matched motion-corrupted and clean structural MRI brain scans. *Scientific Data*, *9*(1), 630. https://doi.org/10.1038/s41597-022-01694-8

Nazemorroaya, A., Aghaeifar, A., Shiozawa, T., Hirt, B., Schulz, H., Scheffler, K., & Hagberg, G. E. (2022). Developing formalin-based fixative agents for post mortem brain MRI at 9.4 T. *Magn Reson Med*, *87*(5), 2481-2494. https://doi.org/10.1002/mrm.29122

Neuhaus, D., Rost, T., Haas, T., Wendebourg, M. J., Schulze, K., Schlaeger, R., Scheurer, E., & Lenz, C. (2025). Comparative analysis of in situ and ex situ postmortem brain MRI: Evaluating volumetry, DTI, and relaxometry. *Magn Reson Med*, *93*(1), 213-227. https://doi.org/10.1002/mrm.30264

Neumann, M., & Gabel, D. (2002). Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem*, *50*(3), 437-439. https://doi.org/10.1177/002215540205000315

Noël, G., Dubé, J., & Venne, G. (2021). The Unintentional Effects on Body Donation Programs of a Competency-Based Curriculum in Postgraduate Medical Education. *Anat Sci Educ*, *14*(5), 675-681. https://doi.org/10.1002/ase.2033

Noël, G., Heron, J., & Naismith, C. (2022). From 1883 to 2019; Variables Influencing Body Procurement at McGill University. *Anat Sci Educ*, *15*(3), 599-608. https://doi.org/10.1002/ase.2063

Nosova, O. I., Sufieva, D. A., & Korzhevsky, D. E. (2021). An Astrocyte Structural Organization Analysis Based on Fluorescent Microscopy with 2D and 3D Quantitative Approaches. *Cell and Tissue Biology*, *15*(3), 273-279. https://doi.org/10.1134/S1990519X21030081

Nunez, P. L., & Silberstein, R. B. (2000). On the relationship of synaptic activity to macroscopic measurements: does co-registration of EEG with fMRI make sense? *Brain Topogr*, *13*(2), 79-96. https://doi.org/10.1023/a:1026683200895

O'Sullivan, E., & Mitchell, B. S. (1993). An improved composition for embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching in the United Kingdom. *J Anat*, *182 (Pt 2)*(Pt 2), 295-297.

Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J. D., Pilcher, W., Ojemann, J. G., Ransom, B. R., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*, *29*(10), 3276-3287. https://doi.org/10.1523/jneurosci.4707-08.2009

Ogawa, Y. (1990). Silver Impregnation Method for Neurons Using Synthetic Surfactants: A Contribution to Golgi Method. In P. M. Conn (Ed.), *Quantitative and Qualitative Microscopy* (Vol. 3). Methods in Neurosciences.

Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*, *88*(4), 844-856. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x

Oizumi, H., Yamasaki, K., Suzuki, H., Ohshiro, S., Saito, Y., Murayama, S., Sugimura, Y., Hasegawa, T., Fukunaga, K., & Takeda, A. (2022). Phosphorylated alpha-synuclein in Iba1-positive macrophages in the skin of patients with Parkinson's disease. *Ann Clin Transl Neurol*, *9*(8), 1136-1146. https://doi.org/10.1002/acn3.51610

Osechinskiy, S., & Kruggel, F. (2011a). Deformable registration of histological sections to brain MR images using a hybrid boundary-based slice-to-volume approach. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, *2011*, 4876-4879. https://doi.org/10.1109/iembs.2011.6091208

Osechinskiy, S., & Kruggel, F. (2011b). Slice-to-Volume Nonrigid Registration of Histological Sections to MR Images of the Human Brain. *Anat Res Int*, *2011*, 287860. https://doi.org/10.1155/2011/287860

Ouellette, R., Mangeat, G., Polyak, I., Warntjes, M., Forslin, Y., Bergendal, Å., Plattén, M., Uppman, M., Treaba, C. A., Cohen-Adad, J., Piehl, F., Kristoffersen Wiberg, M., Fredrikson, S., Mainero, C., & Granberg, T. (2020). Validation of Rapid Magnetic Resonance Myelin Imaging in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*, *87*(5), 710-724. https://doi.org/10.1002/ana.25705

Ourselin, S., Bardinet, E., Dormont, D., Malandain, G., Roche, A., Ayache, N., Tandé, D., Parain, K., & Yelnik, J. (2001, 2001//). Fusion of Histological Sections and MR Images: Towards the Construction of an Atlas of the Human Basal Ganglia. Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2001, Berlin, Heidelberg.

Oyejide, L., Mendes, O. R., & Mikaelian, I. (2017). Chapter 16 - Molecular Pathology: Applications in Nonclinical Drug Development. In A. S. Faqi (Ed.), *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development (Second Edition)* (pp. 407-445). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620-4.00016-5

Palomero-Gallagher, N., & Zilles, K. (2019). Cortical layers: Cyto-, myelo-, receptor- and synaptic architecture in human cortical areas. *Neuroimage*, *197*, 716-741. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.08.035

Pantazis, D., Joshi, A., Jiang, J., Shattuck, D. W., Bernstein, L. E., Damasio, H., & Leahy, R. M. (2010). Comparison of landmark-based and automatic methods for cortical surface registration. *Neuroimage*, *49*(3), 2479-2493. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.09.027

Paquola, C., Bethlehem, R. A., Seidlitz, J., Wagstyl, K., Romero-Garcia, R., Whitaker, K. J., Vos de Wael, R., Williams, G. B., Vértes, P. E., Margulies, D. S., Bernhardt, B., & Bullmore, E. T. (2019). Shifts in myeloarchitecture characterise adolescent development of cortical gradients. *Elife*, *8*. https://doi.org/10.7554/eLife.50482

Paquola, C., Royer, J., Lewis, L. B., Lepage, C., Glatard, T., Wagstyl, K., DeKraker, J., Toussaint, P. J., Valk, S. L., Collins, L., Khan, A. R., Amunts, K., Evans, A. C., Dickscheid, T., & Bernhardt, B. (2021). The BigBrainWarp toolbox for integration of BigBrain 3D histology with multimodal neuroimaging. *Elife*, *10*. https://doi.org/10.7554/eLife.70119

Parent, O., Bussy, A., Devenyi, G. A., Dai, A., Costantino, M., Tullo, S., Salaciak, A., Bedford, S., Farzin, S., Béland, M. L., Valiquette, V., Villeneuve, S., Poirier, J., Tardif, C. L., Dadar, M., & Chakravarty, M. M. (2023). Assessment of white matter hyperintensity severity using multimodal magnetic resonance imaging. *Brain Commun*, *5*(6), fcad279. https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad279

Parra-Damas, A., & Saura, C. A. (2020). Tissue Clearing and Expansion Methods for Imaging Brain Pathology in Neurodegeneration: From Circuits to Synapses and Beyond [Mini Review]. *Frontiers in Neuroscience*, *Volume 14 - 2020*. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00914

Patra, M., Salonen, E., Terama, E., Vattulainen, I., Faller, R., Lee, B. W., Holopainen, J., & Karttunen, M. (2006). Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. *Biophys J*, *90*(4), 1121-1135. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.062364

Paul, C. A., Beltz, B., & Berger-Sweeney, J. (2008). Perfusion of brain tissues with fixative. *CSH Protoc*, *2008*, pdb.prot4802. https://doi.org/10.1101/pdb.prot4802

Pelizzari, C. A., Chen, G. T., Spelbring, D. R., Weichselbaum, R. R., & Chen, C. T. (1989). Accurate three-dimensional registration of CT, PET, and/or MR images of the brain. *J Comput Assist Tomogr*, *13*(1), 20-26. https://doi.org/10.1097/00004728-198901000-00004

Pellicciari, C. (2018). Histochemistry as a versatile research toolkit in biological research, not only an applied discipline in pathology. *Eur J Histochem*, *62*(4). https://doi.org/10.4081/ejh.2018.3006

Peter, G. (1958). *Handbook of Basic microtechnique* (2nd ed.). McGraw-Hill.

Petrasch-Parwez, E., Schöbel, A., Benali, A., Moinfar, Z., Förster, E., Brüne, M., & Juckel, G. (2020). Lateralization of increased density of Iba1-immunopositive microglial cells in the anterior midcingulate cortex of schizophrenia and bipolar disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, *270*(7), 819-828. https://doi.org/10.1007/s00406-020-01107-0

Pfefferbaum, A., Sullivan, E. V., Adalsteinsson, E., Garrick, T., & Harper, C. (2004). Postmortem MR imaging of formalin-fixed human brain. *Neuroimage*, *21*(4), 1585-1595. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.11.024

Pietrzak, K., Czarnecka, K., Mikiciuk-Olasik, E., & Szymanski, P. (2018). New Perspectives of Alzheimer Disease Diagnosis - the Most Popular and Future Methods. *Med Chem*, *14*(1), 34-43. https://doi.org/10.2174/1573406413666171002120847

Pikkarainen, M., Martikainen, P., & Alafuzoff, I. (2010). The Effect of Prolonged Fixation Time on Immunohistochemical Staining of Common Neurodegenerative Disease Markers. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *69*(1), 40-52. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181c6c13d

Pitiot, A., Bardinet, E., Thompson, P. M., & Malandain, G. (2006). Piecewise affine registration of biological images for volume reconstruction. *Med Image Anal*, *10*(3), 465-483. https://doi.org/10.1016/j.media.2005.03.008

Polgár, T. F., Spisák, K., Kádár, Z., Alodah, N., Szebeni, G. J., Klein, K., Patai, R., Siklós, L., & Nógrádi, B. (2025). Photobleaching alters the morphometric analysis of fluorescently labeled neurons and microglial cells. *Pathol Oncol Res*, *31*, 1612087. https://doi.org/10.3389/pore.2025.1612087

Post, M. J. (2008). A new era in neuroradiology: ex vivo validation of in vivo imaging research. *AJNR Am J Neuroradiol*, *29*(2), 212-213. https://doi.org/10.3174/ajnr.A0837

Potts, E. M., Coppotelli, G., & Ross, J. M. (2020). Histological-Based Stainings using Free-Floating Tissue Sections. *J Vis Exp*(162). https://doi.org/10.3791/61622

Prkačin, M. V., Petanjek, Z., & Banovac, I. (2024). A novel approach to cytoarchitectonics: developing an objective framework for the morphological analysis of the cerebral cortex. *Frontiers in neuroanatomy*, *18*, 1441645. https://doi.org/10.3389/fnana.2024.1441645

Pruessner, J. C., Köhler, S., Crane, J., Pruessner, M., Lord, C., Byrne, A., Kabani, N., Collins, D. L., & Evans, A. C. (2002). Volumetry of temporopolar, perirhinal, entorhinal and parahippocampal cortex from high-resolution MR images: considering the variability of the collateral sulcus. *Cereb Cortex*, *12*(12), 1342-1353. https://doi.org/10.1093/cercor/12.12.1342

Pruessner, J. C., Li, L. M., Serles, W., Pruessner, M., Collins, D. L., Kabani, N., Lupien, S., & Evans, A. C. (2000). Volumetry of Hippocampus and Amygdala with High-resolution MRI and Three-dimensional Analysis Software: Minimizing the Discrepancies between Laboratories. *Cerebral Cortex*, *10*(4), 433-442. https://doi.org/10.1093/cercor/10.4.433

Puchtler, H., & Meloan, S. N. (1985). On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry*, *82*(3), 201-204. https://doi.org/10.1007/bf00501395

Quester, R., & Schröder, R. (1997). The shrinkage of the human brain stem during formalin fixation and embedding in paraffin. *J Neurosci Methods*, *75*(1), 81-89. https://doi.org/10.1016/s0165-0270(97)00050-2

Quick-Weller, J., Tichy, J., Harter, P. N., Tritt, S., Baumgarten, P., Bähr, O., Dinc, N., Behmanesh, B., Weise, L., Seifert, V., & Marquardt, G. (2018). "Two is not enough" - Impact of the number of tissue samples obtained from stereotactic brain biopsies in suspected glioblastoma. *J Clin Neurosci*, *47*, 311-314. https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.09.032

Rae, G., Newman, W. P., 3rd, McGoey, R., Donthamsetty, S., Karpinski, A. C., & Green, J. (2018). The histopathologic reliability of tissue taken from cadavers within the gross anatomy laboratory. *Anat Sci Educ*, *11*(2), 207-214. https://doi.org/10.1002/ase.1743

Rahman, S. M. N., Alam, T., & Alam, N. N. (2021). Preservation of Histology by Phenol-Based Fixative: Mini Review of Recent Findings *Int J Morphol*, *39*, 50-56. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022021000100050&nrm=iso

Raja, D. S., & Sultana, B. (2012). Potential health hazards for students exposed to formaldehyde in the gross anatomy laboratory. *J Environ Health*, *74*(6), 36-40.

Raman, M. R., Shu, Y., Lesnick, T. G., Jack, C. R., & Kantarci, K. (2017). Regional T(1) relaxation time constants in Ex vivo human brain: Longitudinal effects of formalin exposure. *Magn Reson Med*, *77*(2), 774-778. https://doi.org/10.1002/mrm.26140

Ravid, R., Van Zwieten, E. J., & Swaab, D. F. (1992). Brain banking and the human hypothalamus--factors to match for, pitfalls and potentials. *Prog Brain Res*, *93*, 83-95. https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)64565-3

Reeves, C., Tachrount, M., Thomas, D., Michalak, Z., Liu, J., Ellis, M., Diehl, B., Miserocchi, A., McEvoy, A. W., Eriksson, S., Yousry, T., & Thom, M. (2016). Combined Ex Vivo 9.4T MRI and Quantitative Histopathological Study in Normal and Pathological Neocortical Resections in Focal Epilepsy. *26*(3), 319-333. https://doi.org/10.1111/bpa.12298

Robinson, J. M., & Vandré, D. D. (2001). Antigen retrieval in cells and tissues: enhancement with sodium dodecyl sulfate. *Histochem Cell Biol*, *116*(2), 119-130. https://doi.org/10.1007/s004180100299

Roebroeck, A., Miller, K. L., & Aggarwal, M. (2019). Ex vivo diffusion MRI of the human brain: Technical challenges and recent advances. *NMR Biomed*, *32*(4), e3941. https://doi.org/10.1002/nbm.3941

Roher, A. E., Weiss, N., Kokjohn, T. A., Kuo, Y. M., Kalback, W., Anthony, J., Watson, D., Luehrs, D. C., Sue, L., Walker, D., Emmerling, M., Goux, W., & Beach, T. (2002). Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Biochemistry*, *41*(37), 11080-11090. https://doi.org/10.1021/bi026173d

Rolls, M. M., Hall, D. H., Victor, M., Stelzer, E. H., & Rapoport, T. A. (2002). Targeting of rough endoplasmic reticulum membrane proteins and ribosomes in invertebrate neurons. *Mol Biol Cell*, *13*(5), 1778-1791. https://doi.org/10.1091/mbc.01-10-0514

Rosas, H. D., Liu, A. K., Hersch, S., Glessner, M., Ferrante, R. J., Salat, D. H., van der Kouwe, A., Jenkins, B. G., Dale, A. M., & Fischl, B. (2002). Regional and progressive thinning of the cortical ribbon in Huntington's disease. *Neurology*, *58*(5), 695-701. https://doi.org/10.1212/wnl.58.5.695

Roseborough, A. D., Langdon, K. D., Hammond, R., Cipriano, L. E., Pasternak, S. H., Whitehead, S. N., & Khan, A. R. (2020). Post-mortem 7 Tesla MRI detection of white matter hyperintensities: A multidisciplinary voxel-wise comparison of imaging and histological correlates. *NeuroImage: Clinical*, *27*, 102340. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nicl.2020.102340

Salat, D. H., Buckner, R. L., Snyder, A. Z., Greve, D. N., Desikan, R. S., Busa, E., Morris, J. C., Dale, A. M., & Fischl, B. (2004). Thinning of the cerebral cortex in aging. *Cereb Cortex*, *14*(7), 721-730. https://doi.org/10.1093/cercor/bhh032

Santini, T., Shim, A., Liou, J. J., Rahman, N., Varela-Mattatall, G., Budde, M. D., Inoue, W., Everling, S., & Baron, C. A. (2025). Investigating microstructural changes between in vivo and perfused ex vivo marmoset brains using oscillating gradient and b-tensor encoded diffusion MRI at 9.4 T. *Magn Reson Med*, *93*(2), 788-802. https://doi.org/10.1002/mrm.30298

Schild, H. H. (1990). *L'IRM apprivoisée (…enfin, presque)*. Diagnostics.

Schleicher, A., Amunts, K., Geyer, S., Morosan, P., & Zilles, K. (1999). Observer-independent method for microstructural parcellation of cerebral cortex: A quantitative approach to cytoarchitectonics. *Neuroimage*, *9*(1), 165-177. https://doi.org/10.1006/nimg.1998.0385

Schmierer, K., Thavarajah, J. R., An, S. F., Brandner, S., Miller, D. H., & Tozer, D. J. (2010). Effects of formalin fixation on magnetic resonance indices in multiple sclerosis cortical gray matter. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, *32*(5), 1054-1060. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmri.22381

Schmierer, K., Wheeler-Kingshott, C. A., Tozer, D. J., Boulby, P. A., Parkes, H. G., Yousry, T. A., Scaravilli, F., Barker, G. J., Tofts, P. S., & Miller, D. H. (2008). Quantitative magnetic resonance of postmortem multiple sclerosis brain before and after fixation. *Magn Reson Med*, *59*(2), 268-277. https://doi.org/10.1002/mrm.21487

Schmitt, O., Modersitzki, J., Heldmann, S., Wirtz, S., & Fischer, B. (2007). Image Registration of Sectioned Brains. *International Journal of Computer Vision*, *73*(1), 5-39. https://doi.org/10.1007/s11263-006-9780-x

Schneider, C., Thompson, S., Totz, J., Song, Y., Allam, M., Sodergren, M. H., Desjardins, A. E., Barratt, D., Ourselin, S., Gurusamy, K., Stoyanov, D., Clarkson, M. J., Hawkes, D. J., & Davidson, B. R. (2020). Comparison of manual and semi-automatic registration in augmented reality image-guided liver surgery: a clinical feasibility study. *Surg Endosc*, *34*(10), 4702-4711. https://doi.org/10.1007/s00464-020-07807-x

Schnell, S. A., Staines, W. A., & Wessendorf, M. W. (1999). Reduction of Lipofuscin-like Autofluorescence in Fluorescently Labeled Tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *47*(6), 719-730. https://doi.org/10.1177/002215549904700601

Scholtz, C. L., Swettenham, K., Brown, A., & Mann, D. M. (1981). A histoquantitative study of the striate cortex and lateral geniculate body in normal, blind and demented subjects. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *7*(2), 103-114. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1981.tb00080.x

Schrag, M., McAuley, G., Pomakian, J., Jiffry, A., Tung, S., Mueller, C., Vinters, H. V., Haacke, E. M., Holshouser, B., Kido, D., & Kirsch, W. M. (2010). Correlation of hypointensities in susceptibility-weighted images to tissue histology in dementia patients with cerebral amyloid angiopathy: a postmortem MRI study. *Acta Neuropathol*, *119*(3), 291-302. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0615-z

Schwab, B., & Hülskamp, M. (2010). Neutral red staining for plant vacuoles. *Cold Spring Harb Protoc*, *2010*(6), pdb.prot4953. https://doi.org/10.1101/pdb.prot4953

Selvaraji, S., Efthymios, M., Foo, R. S. Y., Fann, D. Y., Lai, M. K. P., Chen, C. L. H., Lim, K. L., & Arumugam, T. V. (2022). Time-restricted feeding modulates the DNA methylation landscape, attenuates hallmark neuropathology and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia. *Theranostics*, *12*(7), 3007-3023. https://doi.org/10.7150/thno.71815

Sewell, T., Bouloukos, C., & von Holt, C. (1984). Formaldehyde and glutaraldehyde in the fixation of chromatin for electron microscopy. *Journal of Microscopy*, *136*, 103-112.

Shah, M., Xiao, Y., Subbanna, N., Francis, S., Arnold, D. L., Collins, D. L., & Arbel, T. (2011). Evaluating intensity normalization on MRIs of human brain with multiple sclerosis. *Med Image Anal*, *15*(2), 267-282. https://doi.org/10.1016/j.media.2010.12.003

Sharma, M., & Grieve, J. H. (2006). Rapid fixation of brains: a viable alternative? *J Clin Pathol*, *59*(4), 393-395. https://doi.org/10.1136/jcp.2005.028274

Shatil, A. S., Matsuda, K. M., & Figley, C. R. (2016). A Method for Whole Brain Ex Vivo Magnetic Resonance Imaging with Minimal Susceptibility Artifacts. *Frontiers in neurology*, *7*, 208-208. https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00208

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 (Lausanne)*, *5*, 31. https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00031

Sheedy, D., Garrick, T., Dedova, I., Hunt, C., Miller, R., Sundqvist, N., & Harper, C. (2008). An Australian Brain Bank: a critical investment with a high return! *Cell Tissue Bank*, *9*(3), 205-216. https://doi.org/10.1007/s10561-008-9076-1

SheikhBahaei, S., Morris, B., Collina, J., Anjum, S., Znati, S., Gamarra, J., Zhang, R., Gourine, A. V., & Smith, J. C. (2018). Morphometric analysis of astrocytes in brainstem respiratory regions. *J Comp Neurol*, *526*(13), 2032-2047. https://doi.org/10.1002/cne.24472

Sheng, W., Zhang, C., Mohiuddin, T. M., Al-Rawe, M., Zeppernick, F., Falcone, F. H., Meinhold-Heerlein, I., & Hussain, A. F. (2023). Multiplex Immunofluorescence: A Powerful Tool in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, *24*(4). https://doi.org/10.3390/ijms24043086

Shepherd, T. M., Flint, J. J., Thelwall, P. E., Stanisz, G. J., Mareci, T. H., Yachnis, A. T., & Blackband, S. J. (2009). Postmortem interval alters the water relaxation and diffusion properties of rat nervous tissue--implications for MRI studies of human autopsy samples. *Neuroimage*, *44*(3), 820-826. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.09.054

Shepherd, T. M., Thelwall, P. E., Stanisz, G. J., & Blackband, S. J. (2009). Aldehyde fixative solutions alter the water relaxation and diffusion properties of nervous tissue. *Magn Reson Med*, *62*(1), 26-34. https://doi.org/10.1002/mrm.21977

Sherwood, K. R., Head, M. W., Walker, R., Smith, C., Ironside, J. W., & Fazakerley, J. K. (2011). RNA integrity in post mortem human variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) and control brain tissue. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *37*(6), 633-642. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01162.x

Shetty, J. K., Babu, H. F., & Hosapatna Laxminarayana, K. P. (2020). Histomorphological Assessment of Formalin versus Nonformalin Fixatives in Diagnostic Surgical Pathology. *J Lab Physicians*, *12*(4), 271-275. https://doi.org/10.1055/s-0040-1722546

Shi, S. R., Cote, R. J., & Taylor, C. R. (2001). Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem*, *49*(8), 931-937. https://doi.org/10.1177/002215540104900801

Shi, S. R., Imam, S. A., Young, L., Cote, R. J., & Taylor, C. R. (1995). Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *43*(2), 193-201. https://doi.org/10.1177/43.2.7822775

Shi, S. R., Key, M. E., & Kalra, K. L. (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *39*(6), 741-748. https://doi.org/10.1177/39.6.1709656

Shi, S. R., Liu, C., Pootrakul, L., Tang, L., Young, A., Chen, R., Cote, R. J., & Taylor, C. R. (2008). Evaluation of the value of frozen tissue section used as "gold standard" for immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*, *129*(3), 358-366. https://doi.org/10.1309/7cxuyxt23e5al8kq

Shi, S. R., Shi, Y., & Taylor, C. R. (2011). Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem*, *59*(1), 13-32. https://doi.org/10.1369/jhc.2010.957191

Shi, S. R., Shi, Y., Taylor, C. R., & Gu, J. (2019). New Dimensions of Antigen Retrieval Technique: 28 Years of Development, Practice, and Expansion. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *27*(10), 715-721. https://doi.org/10.1097/pai.0000000000000778

Shiotani, S., Kohno, M., Ohashi, N., Yamazaki, K., & Itai, Y. (2002). Postmortem intravascular high-density fluid level (hypostasis): CT findings. *J Comput Assist Tomogr*, *26*(6), 892-893. https://doi.org/10.1097/00004728-200211000-00006

Shirai, T., Hayashi, S., Matsumura, H., Kawata, S., Nagahori, K., Miyawaki, M., Ida, Y., & Itoh, M. (2022). Training on skin flap elevation in hand surgery using cadavers embalmed by the saturated salt solution method: effectiveness and usefulness. *Anat Sci Int*, *97*(3), 283-289. https://doi.org/10.1007/s12565-022-00668-5

Shoja, M. M., Benninger, B., Agutter, P., Loukas, M., & Tubbs, R. S. (2013). A historical perspective: infection from cadaveric dissection from the 18th to 20th centuries. *Clin Anat*, *26*(2), 154-160. https://doi.org/10.1002/ca.22169

Shuvaev, S., Lazutkin, A., Kiryanov, R., Anokhin, K., Enikolopov, G., & Koulakov, A. A. (2022). Spatiotemporal 3D image registration for mesoscale studies of brain development. *Sci Rep*, *12*(1), 3648. https://doi.org/10.1038/s41598-022-06871-8

Simons, M., Krämer, E.-M., Macchi, P., Rathke-Hartlieb, S., Trotter, J., Nave, K.-A., & Schulz, J. r. B. (2002). Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes : implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *Journal of Cell Biology*, *157*(2), 327-336. https://doi.org/10.1083/jcb.200110138

Singer, S. J. (1963). The Properties of Proteins in Nonaqueous Solvents. In C. B. Anfinsen, K. Bailey, M. L. Anson, & J. T. Edsall (Eds.), *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 17, pp. 1-68). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60051-0

Singh, M., Rajagopalan, A., Kim, T. S., Hwang, D., Chui, H., Zhang, X. L., Lee, A. Y., & Zarow, C. (2008). Co-registration of In-Vivo Human MRI Brain Images to Postmortem Histological Microscopic Images. *Int J Imaging Syst Technol*, *18*(5-6), 325-335. https://doi.org/10.1002/ima.v18:5/6

Singh-Bains, M. K., Linke, V., Austria, M. D. R., Tan, A. Y. S., Scotter, E. L., Mehrabi, N. F., Faull, R. L. M., & Dragunow, M. (2019). Altered microglia and neurovasculature in the Alzheimer's disease cerebellum. *Neurobiology of Disease*, *132*, 104589. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104589

Sled, J. G., & Nossin-Manor, R. (2013). Quantitative MRI for studying neonatal brain development. *Neuroradiology*, *55 Suppl 2*, 97-104. https://doi.org/10.1007/s00234-013-1235-9

Sled, J. G., Zijdenbos, A. P., & Evans, A. C. (1998). A nonparametric method for automatic correction of intensity nonuniformity in MRI data. *IEEE Trans Med Imaging*, *17*(1), 87-97. https://doi.org/10.1109/42.668698

Snyder, J. M., Radaelli, E., Goeken, A., Businga, T., Boyden, A. W., Karandikar, N. J., & Gibson-Corley, K. N. (2022). Perfusion with 10% neutral-buffered formalin is equivalent to 4% paraformaldehyde for histopathology and immunohistochemistry in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Vet Pathol*, *59*(3), 498-505. https://doi.org/10.1177/03009858221075588

Sobel, R. A., Eaton, M. J., Jaju, P. D., Lowry, E., & Hinojoza, J. R. (2019). Anti-Myelin Proteolipid Protein Peptide Monoclonal Antibodies Recognize Cell Surface Proteins on Developing Neurons and Inhibit Their Differentiation. *J Neuropathol Exp Neurol*, *78*(9), 819-843. https://doi.org/10.1093/jnen/nlz058

Solé-Guardia, G., Custers, E., de Lange, A., Clijncke, E., Geenen, B., Gutierrez, J., Küsters, B., Claassen, J., de Leeuw, F. E., Wiesmann, M., & Kiliaan, A. J. (2023). Association between hypertension and neurovascular inflammation in both normal-appearing white matter and white matter hyperintensities. *Acta Neuropathol Commun*, *11*(1), 2. https://doi.org/10.1186/s40478-022-01497-3

Sonoda, A., Nihei, M., Shinkawa, N., Kakizaki, E., & Yukawa, N. (2025). Perls' Prussian blue staining and chemistry of Prussian blue and Turnbull blue. *Forensic Science International: Synergy*, *11*, 100627. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsisyn.2025.100627

Souchon, E. (1908). Embalming of bodies for teaching purposes. *Anat Rec*, *2*(6), 244-247. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ar.1090020605

Štajduhar, A., Lipić, T., Lončarić, S., Judaš, M., & Sedmak, G. (2023). Interpretable machine learning approach for neuron-centric analysis of human cortical cytoarchitecture. *Scientific Reports*, *13*(1), 5567. https://doi.org/10.1038/s41598-023-32154-x

Stetzik, L., Mercado, G., Smith, L., George, S., Quansah, E., Luda, K., Schulz, E., Meyerdirk, L., Lindquist, A., Bergsma, A., Jones, R. G., Brundin, L., Henderson, M. X., Pospisilik, J. A., & Brundin, P. (2022). A novel automated morphological analysis of Iba1+ microglia using a deep learning assisted model. *Front Cell Neurosci*, *16*, 944875. https://doi.org/10.3389/fncel.2022.944875

Stille, M., Smith, E. J., Crum, W. R., & Modo, M. (2013). 3D reconstruction of 2D fluorescence histology images and registration with in vivo MR images: application in a rodent stroke model. *J Neurosci Methods*, *219*(1), 27-40. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.06.003

Stolp, H. B., Ball, G., So, P. W., Tournier, J. D., Jones, M., Thornton, C., & Edwards, A. D. (2018). Voxel-wise comparisons of cellular microstructure and diffusion-MRI in mouse hippocampus using 3D Bridging of Optically-clear histology with Neuroimaging Data (3D-BOND). *Scientific Reports*, *8*(1), 4011. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22295-9

Stüber, C., Morawski, M., Schäfer, A., Labadie, C., Wähnert, M., Leuze, C., Streicher, M., Barapatre, N., Reimann, K., Geyer, S., Spemann, D., & Turner, R. (2014). Myelin and iron concentration in the human brain: a quantitative study of MRI contrast. *Neuroimage*, *93 Pt 1*, 95-106. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.02.026

Stumptner, C., Pabst, D., Loibner, M., Viertler, C., & Zatloukal, K. (2019). The impact of crosslinking and non-crosslinking fixatives on antigen retrieval and immunohistochemistry. *N Biotechnol*, *52*, 69-83. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.003

Sukswai, N., & Khoury, J. D. (2019). Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Curr Hematol Malig Rep*, *14*(5), 368-375. https://doi.org/10.1007/s11899-019-00533-9

Sun, D., & Jakobs, T. C. (2012). Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *Neuroscientist*, *18*(6), 567-588. https://doi.org/10.1177/1073858411423441

Switzer, R. C., 3rd. (2000). Application of silver degeneration stains for neurotoxicity testing. *Toxicol Pathol*, *28*(1), 70-83. https://doi.org/10.1177/019262330002800109

Syrbu, S. I., & Cohen, M. B. (2011). An enhanced antigen-retrieval protocol for immunohistochemical staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol*, *717*, 101-110. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-024-9_6

Tabata, H. (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front Neurosci*, *9*, 114. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00114

Takamura, K., Fischer, H., & Morrow, N. R. (2012). Physical properties of aqueous glycerol solutions. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, *98-99*, 50-60. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.petrol.2012.09.003

Taqi, S. A., Sami, S. A., Sami, L. B., & Zaki, S. A. (2018). A review of artifacts in histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol*, *22*(2), 279. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_125_15

Tatsumi, S., Ayaki, T., Shinohara, M., & Yamamoto, T. (2008). Type of gradient recalled-echo sequence results in size and number change of cerebral microbleeds. *AJNR Am J Neuroradiol*, *29*(4), e13. https://doi.org/10.3174/ajnr.A0908

Tax, C. M. W., Bastiani, M., Veraart, J., Garyfallidis, E., & Okan Irfanoglu, M. (2022). What's new and what's next in diffusion MRI preprocessing. *Neuroimage*, *249*, 118830. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.118830

Testen, A., Kim, R., & Reissner, K. J. (2020). High-Resolution Three-Dimensional Imaging of Individual Astrocytes Using Confocal Microscopy. *Curr Protoc Neurosci*, *91*(1), e92. https://doi.org/10.1002/cpns.92

Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V. K., Elizabeth, J., Rao, U. K., & Ranganathan, K. (2012). Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol*, *16*(3), 400-405. https://doi.org/10.4103/0973-029x.102496

Thiagarajan, T. (2017). *From mouse brain to human brain*. Lab Talk, Neurodiversity. https://sapienlabs.org/lab-talk/mouse-brain-human-brain/

Thiel, W. (1992). [The preservation of the whole corpse with natural color]. *Ann Anat*, *174*(3), 185-195. (Die Konservierung ganzer Leichen in natürlichen Farben.)

Thomsen, H., Kaatsch, H. J., & Krisch, B. (1999). How and why does the platelet count in postmortem blood change during the early postmortem interval? *Forensic Sci Int*, *101*(3), 185-194. https://doi.org/10.1016/s0379-0738(99)00023-7

Tippett, L. J., Waldvogel, H. J., Thomas, S. J., Hogg, V. M., van Roon-Mom, W., Synek, B. J., Graybiel, A. M., & Faull, R. L. (2007). Striosomes and mood dysfunction in Huntington's disease. *Brain*, *130*(Pt 1), 206-221. https://doi.org/10.1093/brain/awl243

Tiveron, M. C., Rossel, M., Moepps, B., Zhang, Y. L., Seidenfaden, R., Favor, J., König, N., & Cremer, H. (2006). Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *J Neurosci*, *26*(51), 13273-13278. https://doi.org/10.1523/jneurosci.4162-06.2006

Tolhurst, D. E., & Hart, J. (1990). Cadaver preservation and dissection. *European Journal of Plastic Surgery*, *13*(2), 75-78. https://doi.org/10.1007/BF00177811

Tomalty, D., Pang, S. C., & Ellis, R. E. (2019). Preservation of neural tissue with a formaldehyde-free phenol-based embalming protocol. *Clin Anat*, *32*(2), 224-230. https://doi.org/10.1002/ca.23290

Tovi, M., & Ericsson, A. (1992). Measurements of T1 and T2 over time in formalin-fixed human whole-brain specimens. *Acta Radiol*, *33*(5), 400-404.

Trampel, R., Bazin, P. L., Pine, K., & Weiskopf, N. (2019). In-vivo magnetic resonance imaging (MRI) of laminae in the human cortex. *Neuroimage*, *197*, 707-715. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.09.037

Tremblay, C., Abbasi, N., Zeighami, Y., Yau, Y., Dadar, M., Rahayel, S., & Dagher, A. (2020). Sex effects on brain structure in de novo Parkinson's disease: a multimodal neuroimaging study. *Brain*, *143*(10), 3052-3066. https://doi.org/10.1093/brain/awaa234

Tremblay, C., Rahayel, S., Pastor-Bernier, A., St-Onge, F., Vo, A., Rheault, F., Daneault, V., Morys, F., Rajah, N., Villeneuve, S., & Dagher, A. (2025). Uncovering atrophy progression pattern and mechanisms in individuals at risk of Alzheimer's disease. *Brain Commun*, *7*(2), fcaf099. https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaf099

Trucas, M., Dervan, A., & Quondamatteo, F. (2024). Are spinal cord and medulla samples from embalmed donors suitable for histological examination? A pilot study. *Journal of Anatomy*, *246*(6), 1042-1052. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/joa.14188

Turkoglu, E., Seckin, H., Gurer, B., Ahmed, A., Uluc, K., Pulfer, K., Arat, A., Niemann, D., & Baskaya, M. K. (2014). The cadaveric perfusion and angiography as a teaching tool: imaging the intracranial vasculature in cadavers. *J Neurol Surg B Skull Base*, *75*(6), 435-444. https://doi.org/10.1055/s-0034-1386653

Tutsch, H. (1975). [An odorless, well-preserving injectable solution for cadavers used in classes]. *Anat Anz*, *138*(1-2), 126-128. (Eine geruchsfreie, gut konservierende Injektionslösung für Kursleichen.)

Uchihara, T. (2007). Silver diagnosis in neuropathology: principles, practice and revised interpretation. *Acta Neuropathol*, *113*(5), 483-499. https://doi.org/10.1007/s00401-007-0200-2

Ueda, H. R., Ertürk, A., Chung, K., Gradinaru, V., Chédotal, A., Tomancak, P., & Keller, P. J. (2020). Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, *21*(2), 61-79. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0250-1

UQTR, D. d. a. (1993). *Laboratoire d'anatomie de l'Université du Québec à Trois-Rivières*. https://oraprdnt.uqtr.uquebec.ca/pls/public/gscw031?owa_no_site=1313

Vachha, B., & Huang, S. Y. (2021). MRI with ultrahigh field strength and high-performance gradients: challenges and opportunities for clinical neuroimaging at 7 T and beyond. *Eur Radiol Exp*, *5*(1), 35. https://doi.org/10.1186/s41747-021-00216-2

Vakrakou, A. G., Brinia, M. E., Svolaki, I., Argyrakos, T., Stefanis, L., & Kilidireas, C. (2022). Immunopathology of Tumefactive Demyelinating Lesions-From Idiopathic to Drug-Related Cases. *Frontiers in neurology*, *13*, 868525. https://doi.org/10.3389/fneur.2022.868525

van Duijn, S., Nabuurs, R. J., van Rooden, S., Maat-Schieman, M. L., van Duinen, S. G., van Buchem, M. A., van der Weerd, L., & Natté, R. (2011). MRI artifacts in human brain tissue after prolonged formalin storage. *Magn Reson Med*, *65*(6), 1750-1758. https://doi.org/10.1002/mrm.22758

Van Essen, D. C. (2004). Surface-based approaches to spatial localization and registration in primate cerebral cortex. *Neuroimage*, *23 Suppl 1*, S97-107. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.07.024

van Essen, H. F., Verdaasdonk, M. A., Elshof, S. M., de Weger, R. A., & van Diest, P. J. (2010). Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde: influence on immunohistochemistry. *J Clin Pathol*, *63*(12), 1090-1094. https://doi.org/10.1136/jcp.2010.079905

van Zijl, P., & Knutsson, L. (2019). In vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy. Technological advances and opportunities for applications continue to abound. *J Magn Reson*, *306*, 55-65. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.07.034

Vargas, M. I., & Dietemann, J. L. (2017). 3D T2-SPACE versus T2-FSE or T2 Gradient Recalled-Echo: Which Is the Best Sequence? *AJNR Am J Neuroradiol*, *38*(7), E48-e49. https://doi.org/10.3174/ajnr.A5190

Venne, G., Zec, M. L., Welte, L., & Noel, G. (2020). Qualitative and quantitative comparison of Thiel and phenol-based soft-embalmed cadavers for surgery training. *Anat Histol Embryol*, *49*(3), 372-381. https://doi.org/10.1111/ahe.12539

Ventura-Antunes, L., Mota, B., & Herculano-Houzel, S. (2013). Different scaling of white matter volume, cortical connectivity, and gyrification across rodent and primate brains. *Frontiers in neuroanatomy*, *7*, 3. https://doi.org/10.3389/fnana.2013.00003

Veuthey, T., Herrera, G., & Dodero, V. I. (2014). Dyes and stains: from molecular structure to histological application. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *19*(1), 91-112. https://doi.org/10.2741/4197

Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*, *5*, 520. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520

Viktorov, I. V., & Proshin, S. S. (2003). Use of isopropyl alcohol in histological assays: dehydration of tissue, enbessing into paraffin, and processing of paraffin sections. *Bull Exp Biol Med*, *136*(1), 105-106. https://doi.org/10.1023/a:1026017719668

Vinod, K. R., Jones, D., & Venkatesha, U. (2016). A simple and effective heat induced antigen retrieval method. *MethodsX*, *3*, 315-319. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mex.2016.04.001

Vogt, O. (1910). Die myeloarchitektonische Felderung des menschlichen Stirn- hirns. . *J. Psychol. Neurol. , XV, 221–232.*

von Economo, C., & Koskinas, G. (1925). Die Cytoarchitektonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen. . *Wien, Berlin: Springer*.

Vonsattel, J. P., Amaya Mdel, P., Cortes, E. P., Mancevska, K., & Keller, C. E. (2008). Twenty-first century brain banking: practical prerequisites and lessons from the past: the experience of New York Brain Bank, Taub Institute, Columbia University. *Cell Tissue Bank*, *9*(3), 247-258. https://doi.org/10.1007/s10561-008-9079-y

Waldvogel, H. J., Bullock, J. Y., Synek, B. J., Curtis, M. A., van Roon-Mom, W. M., & Faull, R. L. (2008). The collection and processing of human brain tissue for research. *Cell Tissue Bank*, *9*(3), 169-179. https://doi.org/10.1007/s10561-008-9068-1

Waldvogel, H. J., Curtis, M. A., Baer, K., Rees, M. I., & Faull, R. L. (2006). Immunohistochemical staining of post-mortem adult human brain sections. *Nat Protoc*, *1*(6), 2719-2732. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.354

Walz, W. (2000). Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia*, *31*(2), 95-103. https://doi.org/10.1002/1098-1136(200008)31:2<95::aid-glia10>3.0.co;2-6

Wang, C., Foxley, S., Ansorge, O., Bangerter-Christensen, S., Chiew, M., Leonte, A., Menke, R. A., Mollink, J., Pallebage-Gamarallage, M., Turner, M. R., Miller, K. L., & Tendler, B. C. (2020). Methods for quantitative susceptibility and R2* mapping in whole post-mortem

brains at 7T applied to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroimage*, *222*, 117216. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.117216

Wang, J., Ho, W. Y., Lim, K., Feng, J., Tucker-Kellogg, G., Nave, K. A., & Ling, S. C. (2018). Cell-autonomous requirement of TDP-43, an ALS/FTD signature protein, for oligodendrocyte survival and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(46), E10941-e10950. https://doi.org/10.1073/pnas.1809821115

Wang, S., Celebi, M. E., Zhang, Y.-D., Yu, X., Lu, S., Yao, X., Zhou, Q., Miguel, M.-G., Tian, Y., Gorriz, J. M., & Tyukin, I. (2021). Advances in Data Preprocessing for Biomedical Data Fusion: An Overview of the Methods, Challenges, and Prospects. *Information Fusion*, *76*, 376-421. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.inffus.2021.07.001

Wang, S., Ren, X., Wang, J., Peng, Q., Niu, X., Song, C., Li, C., Jiang, C., Zang, W., Zille, M., Fan, X., Chen, X., & Wang, J. (2023). Blocking autofluorescence in brain tissues affected by ischemic stroke, hemorrhagic stroke, or traumatic brain injury [Methods]. *Frontiers in Immunology*, *Volume 14 - 2023*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1168292

Wang, T., Jin, A., Fu, Y., Zhang, Z., Li, S., Wang, D., & Wang, Y. (2021). Heterogeneity of White Matter Hyperintensities in Cognitively Impaired Patients With Cerebral Small Vessel Disease. *Front Immunol*, *12*, 803504. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803504

Wardlaw, J. M., Smith, E. E., Biessels, G. J., Cordonnier, C., Fazekas, F., Frayne, R., Lindley, R. I., O'Brien, J. T., Barkhof, F., Benavente, O. R., Black, S. E., Brayne, C., Breteler, M., Chabriat, H., Decarli, C., de Leeuw, F. E., Doubal, F., Duering, M., Fox, N. C., . . . Dichgans, M. (2013). Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol*, *12*(8), 822-838. https://doi.org/10.1016/s1474-4422(13)70124-8

Wardlaw, J. M., Valdés Hernández, M. C., & Muñoz-Maniega, S. (2015). What are white matter hyperintensities made of? Relevance to vascular cognitive impairment. *J Am Heart Assoc*, *4*(6), 001140. https://doi.org/10.1161/jaha.114.001140

Watanabe, M., Yoneyama, Y., Hamada, H., Kohno, M., Hasegawa, O., Takahashi, H., Kawase-Koga, Y., Matsuo, A., Chikazu, D., Kawata, S., & Itoh, M. (2020). The Usefulness of Saturated Salt Solution Embalming Method for Oral Surgical Skills Training: A New Cadaveric Training Model for Bone Harvesting. *Anat Sci Educ*, *13*(5), 628-635. https://doi.org/10.1002/ase.1925

Waters, B. L. (2009). *Handbook of Autopsy Practice* (4 ed.). Totowa, H. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-59745-127-7

Weber, K., Rathke, P. C., & Osborn, M. (1978). Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *75*(4), 1820-1824. https://doi.org/10.1073/pnas.75.4.1820

Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J., & Salemme, F. R. (1989). Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*, *243*(4887), 85-88. https://doi.org/10.1126/science.2911722

Webster, J. D., Miller, M. A., Dusold, D., & Ramos-Vara, J. (2009). Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. *J Histochem Cytochem*, *57*(8), 753-761. https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953877

Weiglein, A. H. (2002). Preservation and plastination. *Clin Anat*, *15*(6), 445. https://doi.org/10.1002/ca.10038

Weisbecker, V. (2011). Distortion in formalin-fixed brains: Using geometric morphometrics to quantify the worst-case scenario in mice. *Brain structure & function*, *217*, 677-685. https://doi.org/10.1007/s00429-011-0366-1

Weishaupt, D., Köchli, V. D., & Marincek, B. (2006). *How does MRI work? An Introduction to the Physics and Function of Magnetic Resonance Imaging* (2nd ed.). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-540-37845-7

Weiskopf, N., Edwards, L. J., Helms, G., Mohammadi, S., & Kirilina, E. (2021). Quantitative magnetic resonance imaging of brain anatomy and in vivo histology. *Nature Reviews Physics*, *3*(8), 570-588. https://doi.org/10.1038/s42254-021-00326-1

Welker, W. (1990). Why Does Cerebral Cortex Fissure and Fold.

Werner, M., Von Wasielewski, R., & Komminoth, P. (1996). Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*, *105*(4), 253-260. https://doi.org/10.1007/bf01463928

Wetering, J. V., Geut, H., Bol, J. J., Galis, Y., Timmermans, E., Twisk, J. W. R., Hepp, D. H., Morella, M. L., Pihlstrom, L., Lemstra, A. W., Rozemuller, A. J. M., Jonkman, L. E., & van de Berg, W. D. J. (2024). Neuroinflammation is associated with Alzheimer's disease co-pathology in dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol Commun*, *12*(1), 73. https://doi.org/10.1186/s40478-024-01786-z

Wick, M. R. (2012). Histochemistry as a tool in morphological analysis: a historical review. *Annals of Diagnostic Pathology*, *16*(1), 71-78. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2011.10.010

Wick, M. R. (2019). The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology—An often-neglected focus of quality assurance in the laboratory. *Seminars in Diagnostic Pathology*, *36*(5), 303-311. https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.06.003

Wicks, D. A., Barker, G. J., & Tofts, P. S. (1993). Correction of intensity nonuniformity in MR images of any orientation. *Magn Reson Imaging*, *11*(2), 183-196. https://doi.org/10.1016/0730-725x(93)90023-7

Wilcock, G. K., Matthews, S. M., & Moss, T. (1990). Comparison of three silver stains for demonstrating neurofibrillary tangles and neuritic plaques in brain tissue stored for long periods. *Acta Neuropathol*, *79*(5), 566-568. https://doi.org/10.1007/bf00296118

Wineski, L. E., & English, A. W. (1989). Phenoxyethanol as a nontoxic preservative in the dissection laboratory. *Acta Anat (Basel)*, *136*(2), 155-158. https://doi.org/10.1159/000146816

Wisniewski, H. M., Wen, G. Y., & Kim, K. S. (1989). Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques. *Acta Neuropathol*, *78*(1), 22-27. https://doi.org/10.1007/bf00687398

Wisse, L. E. M., Adler, D. H., Ittyerah, R., Pluta, J. B., Robinson, J. L., Schuck, T., Trojanowski, J. Q., Grossman, M., Detre, J. A., Elliott, M. A., Toledo, J. B., Liu, W., Pickup, S., Das, S. R., Wolk, D. A., & Yushkevich, P. A. (2017). Comparison of In Vivo and Ex Vivo MRI of the Human Hippocampal Formation in the Same Subjects. *Cereb Cortex*, *27*(11), 5185-5196. https://doi.org/10.1093/cercor/bhw299

Wolman, M. (1958). Studies on the impregnation of nervous tissue elements. IV. Mechanism of impregnation of oligodendroglia and microglia. *Lab Invest*, *7*(1), 52-57.
Woodburne, R. T., & Lawrence, C. A. (1952). An improved embalming fluid formula. *Anat Rec*, *114*(3), 507-514. https://doi.org/10.1002/ar.1091140309
Wu, J., Cai, Y., Wu, X., Ying, Y., Tai, Y., & He, M. (2021). Transcardiac Perfusion of the Mouse for Brain Tissue Dissection and Fixation. *Bio Protoc*, *11*(5), e3988. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3988
Wu, Y., Cai, Y., Rui, W., Tang, Y., Yang, Z., He, M., Ye, H., Wang, Y., Zhao, Y., Ma, Z., & Yao, Z. (2022). Contrast-enhanced 3D-T2-weighted SPACE sequence for MRI detection and localization of adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary microadenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*, *96*(4), 578-588. https://doi.org/10.1111/cen.14574
Xiao, G., Bloch, B. N., Chappelow, J., Genega, E. M., Rofsky, N. M., Lenkinski, R. E., Tomaszewski, J., Feldman, M. D., Rosen, M., & Madabhushi, A. (2011). Determining histology-MRI slice correspondences for defining MRI-based disease signatures of prostate cancer. *Comput Med Imaging Graph*, *35*(7-8), 568-578. https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2010.12.003
Xiao, G., Li, H., Zhao, M., & Zhou, B. (2023). Chapter Eight - Assessing metal ion transporting activity of ZIPs: Intracellular zinc and iron detection. In J. Hu (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 687, pp. 157-184). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mie.2023.05.011
Yadav, H., Bakshi, A., Anamika, Singh, V., Paul, P., Murugan, N. A., & Maurya, S. K. (2024). Co-localization and co-expression of Olfml3 with Iba1 in brain of mice. *J Neuroimmunol*, *394*, 578411. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2024.578411
Yamashita, S. (2007). Heat-induced antigen retrieval: Mechanisms and application to histochemistry. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, *41*(3), 141-200. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proghi.2006.09.001
Yang, T., Sun, Y., Lu, Z., Leak, R. K., & Zhang, F. (2017). The impact of cerebrovascular aging on vascular cognitive impairment and dementia. *Ageing Res Rev*, *34*, 15-29. https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.09.007
Yang, X., & Skoff, R. P. (1997). Proteolipid protein regulates the survival and differentiation of oligodendrocytes. *J Neurosci*, *17*(6), 2056-2070. https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-06-02056.1997
Yiannakas, M. C., Schneider, T., Yoneyama, M., Aforlabi-Logoh, I., Prados, F., Ciccarelli, O., & Wheeler-Kingshott, C. A. M. (2020). Magnetisation transfer ratio combined with magnetic resonance neurography is feasible in the proximal lumbar plexus using healthy volunteers at 3T. *Scientific Reports*, *10*(1), 14568. https://doi.org/10.1038/s41598-020-71570-1
Yong-Hing, C. J., Obenaus, A., Stryker, R., Tong, K., & Sarty, G. E. (2005). Magnetic resonance imaging and mathematical modeling of progressive formalin fixation of the human brain. *Magn Reson Med*, *54*(2), 324-332. https://doi.org/10.1002/mrm.20578
Yousef, A., Robinson, J. L., Irwin, D. J., Byrne, M. D., Kwong, L. K., Lee, E. B., Xu, Y., Xie, S. X., Rennert, L., Suh, E., Van Deerlin, V. M., Grossman, M., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2017). Neuron loss and degeneration in the progression of TDP-43 in frontotemporal

lobar degeneration. *Acta Neuropathol Commun*, *5*(1), 68. https://doi.org/10.1186/s40478-017-0471-3

Yurt, K. K., Kivrak, E. G., Altun, G., Mohamed, H., Ali, F., Gasmalla, H. E., & Kaplan, S. (2018). A brief update on physical and optical disector applications and sectioning-staining methods in neuroscience. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *93*, 16-29. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.02.009

Yushkevich, P. A., Avants, B. B., Pluta, J., Das, S., Minkoff, D., Mechanic-Hamilton, D., Glynn, S., Pickup, S., Liu, W., Gee, J. C., Grossman, M., & Detre, J. A. (2009). A high-resolution computational atlas of the human hippocampus from postmortem magnetic resonance imaging at 9.4 T. *Neuroimage*, *44*(2), 385-398. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.08.042

Zachlod, D., Kedo, O., & Amunts, K. (2022). Anatomy of the temporal lobe: From macro to micro. *Handb Clin Neurol*, *187*, 17-51. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823493-8.00009-2

Zarow, C., Kim, T. S., Singh, M., & Chui, H. C. (2004). A standardized method for brain-cutting suitable for both stereology and MRI-brain co-registration. *J Neurosci Methods*, *139*(2), 209-215. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.04.034

Zhan, Y., Ou, Y., Feldman, M., Tomaszeweski, J., Davatzikos, C., & Shen, D. (2007). Registering histologic and MR images of prostate for image-based cancer detection. *Acad Radiol*, *14*(11), 1367-1381. https://doi.org/10.1016/j.acra.2007.07.018

Zhang, K., & Sejnowski, T. J. (2000). A universal scaling law between gray matter and white matter of cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(10), 5621-5626. https://doi.org/10.1073/pnas.090504197

Zhang, Z., Ma, Z., Zou, W., Guo, H., Liu, M., Ma, Y., & Zhang, L. (2019). The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions. *BioMed Research International*, *2019*(1), 9605265. https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2019/9605265

Zhernovaia, M. (2021). *Développement et emploi d'un atlas du cortex cérébral humain réalisé sur IRM en tenant compte de la phylogénie* [Mémoire, Université de Montréal]. Papyrus, Montréal.

Zhernovaia, M., Dadar, M., Mahmoud, S., Zeighami, Y., & Maranzano, J. (2022). The PaleoArchiNeo (PAN) human brain atlas: A dataset on a standard neuroanatomical MRI template following a phylogenetic approach. *Data Brief*, *41*, 107863. https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.107863

Zhou, L., Huang, Y., Li, H., Fan, J., Zhangbao, J., Yu, H., Li, Y., Lu, J., Zhao, C., Lu, C., Wang, M., & Quan, C. (2017). MOG-antibody associated demyelinating disease of the CNS: A clinical and pathological study in Chinese Han patients. *J Neuroimmunol*, *305*, 19-28. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.01.007

Zigmond, R. E., & Echevarria, F. D. (2019). Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. *Progress in Neurobiology*, *173*, 102-121. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.001

Zimmerman, B., Rypma, B., Gratton, G., & Fabiani, M. (2021). Age-related changes in cerebrovascular health and their effects on neural function and cognition: A

comprehensive review. *Psychophysiology*, *58*(7), e13796. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/psyp.13796